

# 科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

## 食品中致癌性亞硝胺之快速篩檢與暴露危害評估(第3年)

計畫類別：整合型計畫  
計畫編號：NSC 102-2632-B-040-001-MY3  
執行期間：104年08月01日至105年07月31日  
執行單位：中山醫學大學職業安全衛生學系暨碩士班

計畫主持人：趙木榮  
共同主持人：余豐益、胡瓊文、巖正傑、王祖興  
計畫參與人員：碩士級-專任助理人員：謝樵漢  
碩士級-專任助理人員：林柏慧  
碩士級-專任助理人員：郭彥祐  
碩士級-專任助理人員：陳鈺峯  
碩士級-專任助理人員：呂權蓁  
學士級-專任助理人員：謝明晏  
學士級-專任助理人員：陳靜儀

報告附件：出席國際學術會議心得報告

中華民國 105 年 08 月 19 日

中文摘要：食品加工過程中胺類經亞硝化反應可產生亞硝胺(N-nitrosamines)，其已被證實為食品中重要的致癌物質。目前台灣尚未訂定食品亞硝胺的管制標準，同時國際上食品亞硝胺的檢驗方法也進展緩慢。飲食暴露到硝酸鹽(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)或亞硝酸鹽(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)，進入人體後也可與體內胺類生成亞硝胺，因此抑制亞硝胺的生成及其在體內作用機制成為重要研究課題。總計畫成功運用LC-MS/MS建立體液中NO<sub>2</sub><sup>-</sup>及NO<sub>3</sub><sup>-</sup>分析技術，作為追蹤硝酸鹽及亞硝酸鹽在體內代謝轉化的重要工具。子計畫一藉由亞硝胺專一性單株抗體之生產來開發酵素免疫分析法檢測食品以及香煙中的亞硝胺的含量。子計畫二建立LC-MS/MS方法分析飲料及食物中亞硝胺，為國內第一個食品中亞硝胺參考數據。成功分析112位健康人尿液中亞硝胺，可作為國人尿液中亞硝胺含量的背景值參考數據。子計畫三進行NO<sub>2</sub><sup>-</sup>及NO<sub>3</sub><sup>-</sup>之動物短期毒性與健康影響探討、長期毒性與健康或學習與記憶行為影響探討、亞硝胺體外合成試驗作為抑制劑篩選模式。子計畫四利用LC-QqQ MS 進行 DNA adductomics 分析，篩選出 N-nitrosamines 暴露所造成的關鍵 DNA adducts，有助於 N-nitrosamines 致癌機制的深入探討。子計畫五成功定義N-nitrosodimethylamine在人類臍靜脈?皮EA.hy926?胞主要的甲基化蛋白標的GRP75蛋白，同時首次提出粒線體氧化傷害在N-nitrosodimethylamine致病機制上的角色。此外，在質譜技術的支援下我們領先採用穩定同位素<sup>15</sup>N標示的亞硝酸鹽/硝酸鹽 (<sup>15</sup>N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>及<sup>15</sup>N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) 或各種亞硝胺施予小鼠，探討亞硝酸鹽/硝酸鹽及亞硝胺在體內的轉化與排出時序。

中文關鍵詞：亞硝胺、酵素免疫分析法、免疫層析試紙、液相層析串聯質譜儀、連線固相萃取、硝酸鹽、亞硝酸鹽、基因損傷、DNA共價鍵結、基因鍵結體學、蛋白質共價鍵結、蛋白質體學

英文摘要：The name N-nitrosamine is related to compounds that present the NNO characteristic group. N-nitrosamines are formed in food as a result of natural chemical interactions, but mainly through food processing activity. Many volatile N-nitrosamines are potent carcinogens, and their rapid detection and adverse health effects assessment are of great importance. This proposal contains five projects. In order to characterize/quantify the nitrosamines in food, we developed high-throughput screening assays (Project 1 and 2) for 9 common N-nitrosamines. Project 1 produced specific monoclonal antibodies for immunoassays and developed rapid gold nanoparticle immune chromatographic strips for N-nitrosamines assay. Project 2 developed isotope-dilution LC-MS/MS with automated solid-phase extraction for high-throughput analysis of N-nitrosamines. Project 2 determined the N-nitrosamines levels in various foods that are frequently consumed by Taiwanese people to characterize the N-nitrosamines distribution in food, and determined the urinary N-nitrosamines levels of residents in Taiwan to investigate the body 's internal exposure level of N-nitrosamines.

Dietary exposure to nitrates/nitrites can react with amines in vivo to produce N-nitrosamines. Its underlying mechanism and the possible suppression of endogenous N-nitrosamine formation are of interest. Project 3 investigated the formation and toxicity and of the N-nitrosamines from precursors by treating the mice with stable isotope labeled nitrate/nitrites ( $^{15}\text{N}\text{-NO}_2^-$  or  $^{15}\text{N}\text{-NO}_3^-$ ). Possible approaches to suppress the endogenous N-nitrosamine formation are also investigated. N-nitrosamines are able to cause damage to cellular constituents including DNA and proteins. However, there is limited information available in the literature. Project 4 adopted a novel DNA adductomics method using LC-MS/MS to explore/characterize putative DNA adducts that induced by different N-nitrosamine and to compare profiles of putative DNA adducts that are formed by the external exposure to N-nitrosamine. Project 5 investigated the mechanism of N-nitrosamine-induced protein modification (nitration or alkylation) in albumin, human liver cells and human blood. Overall, the results obtained from this project may help our government to establish an initiative/general standard for N-nitrosamines in food and to conduct the risk assessment of N-nitrosamine.

英文關鍵詞：N-nitrosamines, ELISA, immunochromatographic strip, electrochemical immunosensor, LC-MS/MS, on-line SPE, nitrite, nitrate, DNA damage, DNA adducts, DNA adductomics, protein adducts, proteomics

總計畫	計畫主持人：趙木榮 教授
食品中致癌性亞硝胺之快速篩檢與暴露危害評估	

### (一) 前言

亞硝胺 (*N*-nitrosamines) 為具有機官能基  $N-N=O$  化合物，是相當普遍及強烈毒性的致癌物質，常存於食物、飲用水及環境中。食品加工過程中胺類經亞硝化反應可產生亞硝胺 (*N*-nitrosamines)，其已被證實為食品中重要的致癌物質。其中二甲基亞硝胺 (*N*-nitrosodimethylamine, NDMA)、甲乙基亞硝胺 (*N*-nitrosomethylethylamine, NMEA)、亞硝基吡咯啉 (*N*-nitrosopyrrolidine, NPyr)、二乙基亞硝胺 (*N*-nitrosodiethylamine, NDEA)、亞硝基六氫吡啶 (*N*-nitrosopiperidine, NPip)、亞硝基嗎林 (*N*-nitrosomorpholine, NMor)、二丙基亞硝胺 (*N*-nitrosodi-*N*-propylamine, NDPA)、二丁基亞硝胺 (*N*-nitrosodi-*N*-butylamine, NDPA) 及二苯基亞硝胺 (*N*-nitrosodiphenylamine, NDPhA) 等 9 種揮發性亞硝胺 (volatile *N*-nitrosamines) 有強的致癌性，其中 8 種亞硝胺被國際癌症研究中心 (International Agency for Research on Cancer, IARC) 歸類為 Group 2，而 NDPhA 則被歸類為 Group 3。下表一為世界各國飲用水及食品亞硝胺管制標準。目前台灣尚未訂定食品亞硝胺的管制標準，同時國際上食品亞硝胺的快速篩檢方法也沒有進展。此外飲食暴露到硝酸鹽 ( $NO_3^-$ ) 或亞硝酸鹽 ( $NO_2^-$ )，進入人體後也可與體內胺類生成 *N*-nitrosamines。因此量測人體內 (如尿液或血液) 的 *N*-nitrosamines，所代表的是外在暴露及體內生成 *N*-nitrosamines 的總合。以非侵入性的方法 (尿液) 評估 *N*-nitrosamines 在體內的劑量，對於 *N*-nitrosamines 的暴露及健康風險評估有很大的幫助。藉由此生物偵測工具可逐年觀察國人體內 *N*-nitrosamines 濃度的改變，作為政府單位在管制食品 *N*-nitrosamines 或其前驅物成效的直接證據。然而目前並無準確及快速的分析方法能同時分析尿液中 9 種 *N*-nitrosamines。

表一、世界各國亞硝胺管制標準：以飲用水及食物為例

飲用水			
地區/組織	規範物質	限制濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	
世界衛生組織 (WHO)	NDMA	0.1	
加拿大衛生部 (Health Canada)	NDMA	0.04	
美國國家環境保護局 (USEPA)	NDMA	0.007	
	NDEA	0.002	
	NMEA	0.02	
食品			
地區/組織	產品種類	規範物質	限制濃度 ( $\mu\text{g/kg}$ )
美國農業部	香腸、所有動物肉製品及	NDMA+NDEA	2

(USDA)	含肉熟食		(煙燻製品：4)
	罐裝肉類、罐裝含肉食品	NDMA+NDEA	2
	加熱乾燥肉品	NDMA+NDEA	2
美國食品藥品管理局 (USFDA)	大麥麥芽	NDMA	10
	麥芽飲料	NDMA	5
歐洲聯盟 (European Union, EU)	罐裝肉類、罐裝含肉食品	NDMA+NDELA (diethanolnitrosamine)	2
	煙燻肉製品	NDMA+NDELA	4
	魚肉及海洋哺乳動物肉製品 (含乾燥產品)	NDMA+NDELA	3
	釀酒麥芽	NDMA+NDELA	15
	動物油、豬油及其製品	NDMA+NDELA	2
	啤酒	NDMA+NDELA	3
中國	肉製品 (罐頭除外)	NDMA	3
	水產動物及其製品 (罐頭除外)	NDMA	4

抑制亞硝胺的生成及其在體內作用機制是近年來重要研究課題，不論是在肉類加工製品中適量減少硝酸鹽、亞硝酸鹽用量 (各國添加規範請參考下表二)。此外添加維生素 C (減少亞硝胺在食物中生成)，抑或飲食攝取抗氧化劑如維生素 C、E、多酚類 (減少亞硝胺在體內生成或其代謝後傷害)，也被認為是有效措施。為能準確釐清硝酸鹽或亞硝酸鹽在體內對亞硝胺的生成及作用機制，在質譜技術的支援下，我們將領先採用穩定同位素  $^{15}\text{N}$  標示的亞硝酸鹽/硝酸鹽 ( $^{15}\text{N}\text{-NO}_2^-$  及  $^{15}\text{N}\text{-NO}_3^-$ ) 施予小鼠，並探討各種內生性亞硝胺的生成及提出解毒方案 (抑制亞硝胺生成)。

表二、硝酸鹽 (Nitrate) 和亞硝酸鹽 (Nitrite) 含量規範

飲用水		
地區/組織	規範物質	限制濃度 (mg/L)
WHO	硝酸鹽	50
	亞硝酸鹽	3
EU	硝酸鹽	50
	亞硝酸鹽	0.5
美國國家環境保護局 (USEPA)	硝酸鹽氮 (以氮計)	10

	亞硝酸鹽氮 (以氮計)	0.1
台灣環境保護署	硝酸鹽氮 (以氮計)	10
	亞硝酸鹽氮 (以氮計)	0.1

## 食品

地區/組織	產品種類	規範物質	限制濃度 (mg/kg)
USFDA	煙燻、醃製鮪魚	亞硝酸鹽	10
	煙燻、醃製魚類	亞硝酸鹽	200
	醃製肉品及肉製品	亞硝酸鹽	200
		硝酸鹽	500
EU	未加熱的醃製、乾燥肉品	亞硝酸鹽	50
	其他醃製、罐裝肉品	亞硝酸鹽	100
	醃製培根	亞硝酸鹽	175
	鵝肝、鵝肝罐頭	硝酸鹽	50
	醃製、罐裝肉品	硝酸鹽	250
	乳酪、乾酪及相似產品	硝酸鹽	50
	醃製魚類	硝酸鹽	200
台灣衛生福利部食品藥物管理署 (FDA)	鮭魚卵、鱈魚卵製品 (生鮮魚卵不得使用)	硝酸鹽	5
		亞硝酸鹽	(以 NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> 殘留量計)
	肉製品及魚肉製品 (生鮮肉、魚肉類不得使用)	硝酸鹽	70
		亞硝酸鹽	(以 NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> 殘留量計)
日本貿易振興機構 (Japan External Trade Organization, JETRO)	肉製品和鯨魚肉製品	硝酸鹽	70
		亞硝酸鹽	(以 NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> 殘留量計)
	魚肉香腸和魚肉火腿	亞硝酸鈉	50
			(以 NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> 殘留量計)
	魚卵 (鮭魚卵、鱈魚卵)	亞硝酸鈉	5
		(以 NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> 殘留量計)	
中國衛生部	蔬菜及醃製蔬菜	硝酸鹽	200
			(牛奶中以鹽類計)
	日本清酒	硝酸鹽	100
			(酒醪中以鹽類計)
		亞硝酸鹽	20
			(以 NaNO <sub>2</sub> 計)

體內亞硝胺可藉由代謝或去毒排出體外，但代謝過程中也有機會將亞硝胺活化進而與 DNA 或蛋白質產生共價鍵結 (adducts)。DNA 的四種鹼基 ATCG 分子，皆可因鍵結或氧化而造成鹼基修飾，DNA adducts 未進行修復或修復錯誤 (error-prone)，在細胞複製後將容易產生誤鑄代碼 (miscoding) 而造成突變。經年累月的在體內累積突變基因是後續癌化的主要原因。上述 9 種 *N*-nitrosamines 中，NDMA、NDEA、NMEA 及 NPyr 所造成的 DNA 鍵結損傷有較多的研究探討。然而亞硝胺在生物體內可形成的 DNA adducts 種類眾多，至今仍不斷有大量新的 DNA adducts 被報導出來，但都無法完整且同一時間描述基因損傷的全貌。運用新穎的 DNA adductomics 質譜研究法，將可全面評估亞硝胺所造成的 DNA 鹼基修飾。

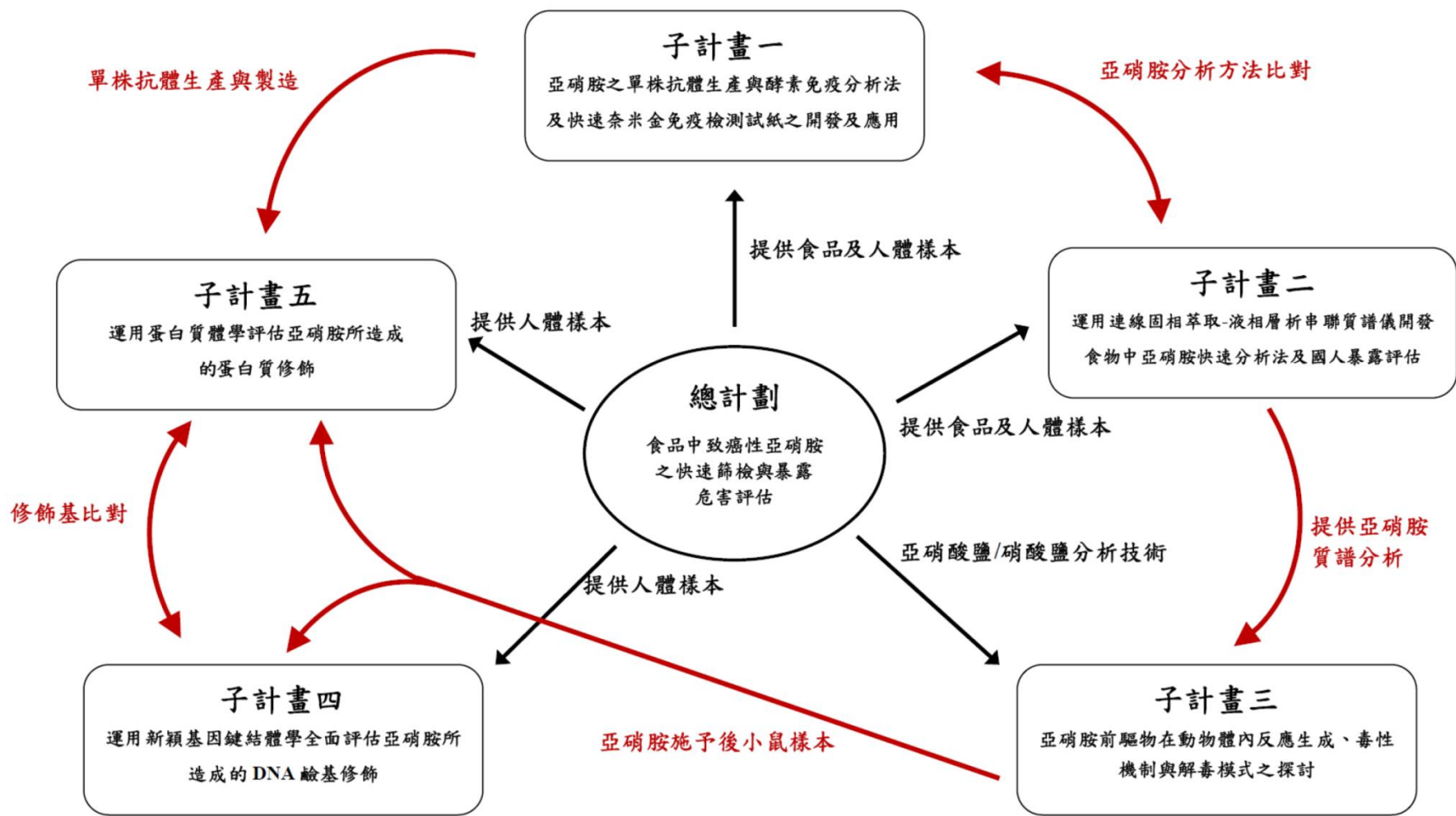
相較於 DNA，亞硝胺造成蛋白質修飾的研究很少，且侷限於少數亞硝胺在血紅素及血清白蛋白的鍵結，對於亞硝胺在細胞整體蛋白質如何造成修飾作用，又有那些特定蛋白質是亞硝胺易形成的鍵結標的，目前依然不清楚。透過蛋白質體學技術與質譜分析平台，將能找出亞硝胺在人類肝細胞及血清中蛋白質的作用標的，並進一步發展成為人類亞硝胺曝露的生物標記。

茲將計畫總體目標分述如下 (整體分工合作架構如下圖一所示)：

- a. 同時發展兩類型亞硝胺的快速分析方法：「酵素免疫分析法及快速奈米金免疫檢測試紙」及「連線固相萃取-液相層析串聯質譜儀搭配同位素稀釋法」。
- b. 以「液相層析串聯質譜儀」分析 9 種亞硝胺所得到的精準定量結果 (gold standard) 作為「酵素免疫分析法及快速奈米金免疫檢測試紙」的基準，以協助「酵素免疫分析法及快速奈米金免疫檢測試紙」的開發。
- c. 採集台灣市面上民眾常接觸各類含亞硝胺的食品，初步進行含量調查及國人的內在暴露評估。此外將分析 100 位健康自願者尿液樣本中的亞硝胺，建立亞硝胺暴露的生物偵測參考值。
- d. 探討亞硝胺的前驅物(亞硝酸鹽/硝酸鹽)對動物的健康效應；各式抗氧化劑在降低亞硝胺生成的效果。
- e. 將穩定同位素  $^{15}\text{N}$  標示的亞硝酸鹽/硝酸鹽 ( $^{15}\text{N}\text{-NO}_2^-$  及  $^{15}\text{N}\text{-NO}_3^-$ ) 或各種亞硝胺施予小鼠，在各子計畫與總計劃質譜技術支援下，探討亞硝酸鹽/硝酸鹽及亞硝胺在體內的排出時序。
- f. 運用新穎 DNA adductomics 研究方法，全面評估 *N*-nitrosamines 所造成的 DNA 鹼基修飾。
- g. 利用 adductome map 的疊圖比對探究各種亞硝胺暴露造成 DNA 鹼基修飾的重要特徵，並試圖以修飾鹼基的結構鑑定結果，作為人類 *N*-nitrosamines 暴露及效應的指標。
- h. 探討亞硝胺在特定蛋白質、人類肝細胞及血清蛋白質造成的修飾特性及特定修飾產物。

## (二) 總計畫研究目的：

- (1) 負責各子計畫整合與進度推動 (參考下圖一)。
- (2) 運用連線固相萃取-液相層析串聯質譜儀 (on-line SPE LC-MS/MS) 建立體液中  $^{15}\text{N}\text{-NO}_2^-$  及  $^{15}\text{N}\text{-NO}_3^-$  分析技術，協助子計畫三進行小鼠體液中  $^{15}\text{N}\text{-NO}_2^-$  及  $^{15}\text{N}\text{-NO}_3^-$  的精準定量。



圖一、整體分工合作架構



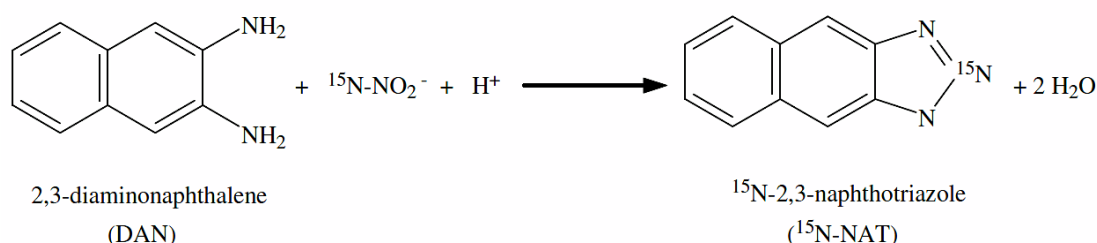
### (三) 研究方法

#### (a) 材料

本研究所使用的化學藥劑均為分析級。穩定同位素內標準品  $^{15}\text{N-NaNO}_2$  和  $^{15}\text{N-NaNO}_3$  購自 Cambridge Isotope Laboratories 公司， $^{15}\text{N-NaNO}_2$  和  $^{15}\text{N-NaNO}_3$  將用於質譜方法開發及子計畫三餵食小鼠試驗並收集尿液。Nitrate reductase (from *Aspergillus niger*) 及 2,3-diaminonaphthalene (DAN) 購自 Sigma-Aldrich 公司。

#### (b) $^{15}\text{N-NO}_2^-$ 衍生化形成 $^{15}\text{N-NAT}$

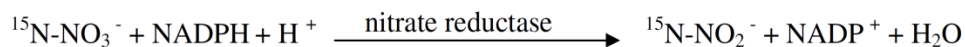
本研究衍生化方法是參考 Misko et al. (1993) 程序，並依實驗分析基質進行修飾。將含  $^{15}\text{N-NO}_2^-$  尿液稀釋 5 倍後與 DAN 在  $37^\circ\text{C}$  酸性環境下反應 30 分鐘，隨後加入 NaOH 終止反應，其衍生化生成產物為  $^{15}\text{N-2,3-naphthotriazole}$  ( $^{15}\text{N-NAT}$ )，生成機制如下圖二所示。



圖二、 $^{15}\text{N-NAT}$  衍生化形成機制

#### (c) $^{15}\text{N-NO}_3^-$ 經酵素轉化還原成 $^{15}\text{N-NO}_2^-$ 再衍生化生成 $^{15}\text{N-NAT}$

本研究採用 nitrate reductase 將  $^{15}\text{N-NO}_3^-$  轉化還原成  $^{15}\text{N-NO}_2^-$  的程序係參考 Gilliam et al. (1993) 和 Verdon et al. (1995) 文獻，並依實驗分析基質進行修飾。取  $^{15}\text{N-NO}_3^-$  含溶液加入 phosphate buffered saline (PBS)、flavin adenine dinucleotide (FAD)、nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) 和 nitrate reductase，在室溫下培養 1 小時（酵素轉化還原機制如下圖三）；將混合溶液以去離子水稀釋 10 倍後與 DAN 進行衍生反應生成  $^{15}\text{N-NAT}$ 。



圖三、 $^{15}\text{N-NO}_3^-$  經 nitrate reductase 轉化還原成  $^{15}\text{N-NO}_2^-$

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

本研究所採用的 on-line SPE LC-MS/MS 由 Agilent 1100 series 自動注射器、二套雙幫浦送液系統 (binary pump, Agilent 1100 series) 並搭配 API 4000 QTrap 三級式四極桿串聯式質譜儀 (triple-quadrupole LC-MS/MS, Applied Biosystems) 所組成。Trap column 為 Inertsil ODS-3 管柱 ( $33\text{ mm} \times 2.1\text{ mm}$ ,  $5\text{ }\mu\text{m}$  particle size)，而 analytical column 為 Inertsil ODS-3 管柱 ( $75\text{ mm} \times 2.1\text{ mm}$ ,  $5\text{ }\mu\text{m}$  particle size)。層析流動相及時間梯度如下表三所示。相關的分析技術成果已發表於知名國際期刊 Free Radical Biology and Medicine (Impact factor = 5.784) [Chao et al., 2016]。

表三、<sup>15</sup>N-NAT 分析的層析梯度與管柱切換運作流程

Time (min)	Eluent I (trap column)		Eluent II (analytical column)		Valve position	Flow rate (mL/min)
	Solvent Ia <sup>a</sup> (%)	Solvent Ib <sup>b</sup> (%)	Solvent IIa <sup>a</sup> (%)	Solvent IIb <sup>b</sup> (%)		
0	40	60	40	60	A	0.2
2.0	40	60	40	60	B	0.2
4.5	40	60	40	60	A	0.2
6.0	0	100	40	60	A	0.2
7.0	0	100	0	100	A	0.2
8.0	0	100	0	100	A	0.2
9.0	40	60	0	60	A	0.2
10.0	40	60	40	60	A	0.2
12.0	40	60	40	60	A	0.2

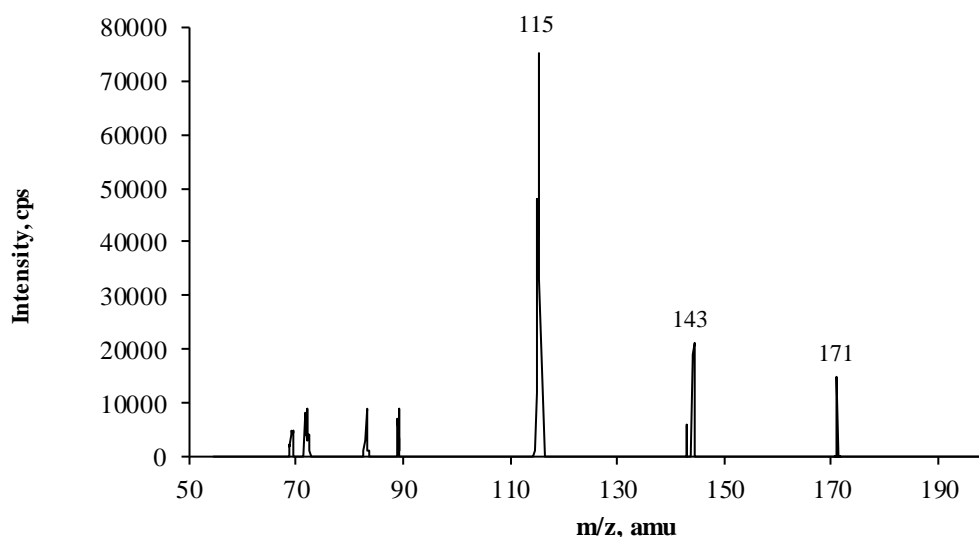
<sup>a</sup> 10 % (v/v) methanol containing 1 mM ammonium acetate

<sup>b</sup> 75 % (v/v) methanol containing 1 mM ammonium acetate

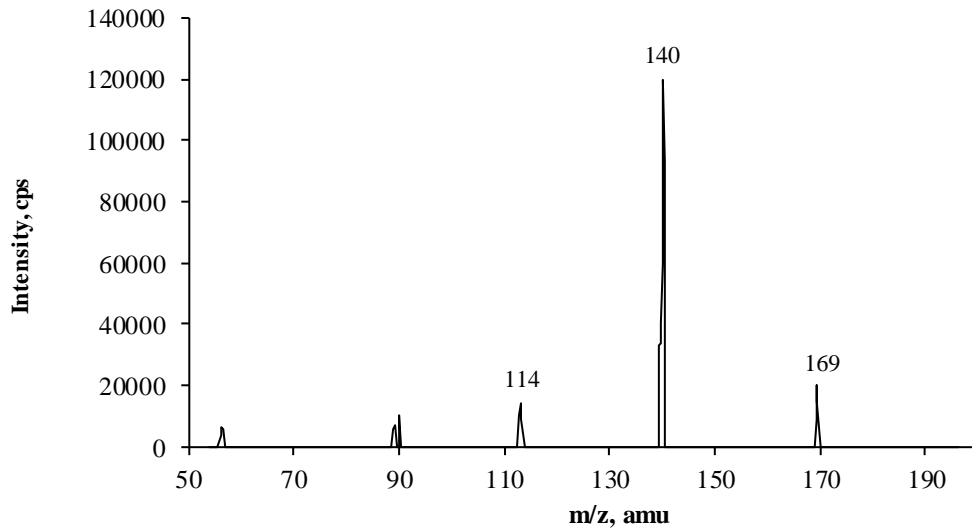
#### (四) 結果與討論

##### 1. 建立 <sup>15</sup>N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 與 DAN 衍生化物 <sup>15</sup>N-NAT 分析技術

<sup>15</sup>N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 與 DAN 衍生化反應形成衍生化物 <sup>15</sup>N-NAT，其分子量為 170；我們運用電灑離子法 (electrospray ionization, ESI)，在正電模式下操作進行全質譜掃描 (full scan)，*m/z* 171 有最佳的強度；接著進行子離子掃描，以 *m/z* 171 作為母離子，在 Q2 給予碰撞能量後，產生的子離子訊號強度最佳為 *m/z* 115 (如下圖四)。在負電模式下操作時 *m/z* 169 有最佳的強度；接著進行子離子掃描，以 *m/z* 169 做為母離子，經碰撞碎裂後產生的子離子訊號強度最大者為 *m/z* 140，但第二訊號強度斷片感度不佳 (如圖五)。表四為 <sup>15</sup>N-NAT 在正電和負電模式下質譜參數表。



圖四、<sup>15</sup>N-NAT 標準品在正電模式下的子離子掃描圖譜



圖五、 $^{15}\text{N}$ -NAT 標準品在負電模式下的子離子掃描圖譜

表四、 $^{15}\text{N}$ -NAT 的正電和負電模式質譜參數

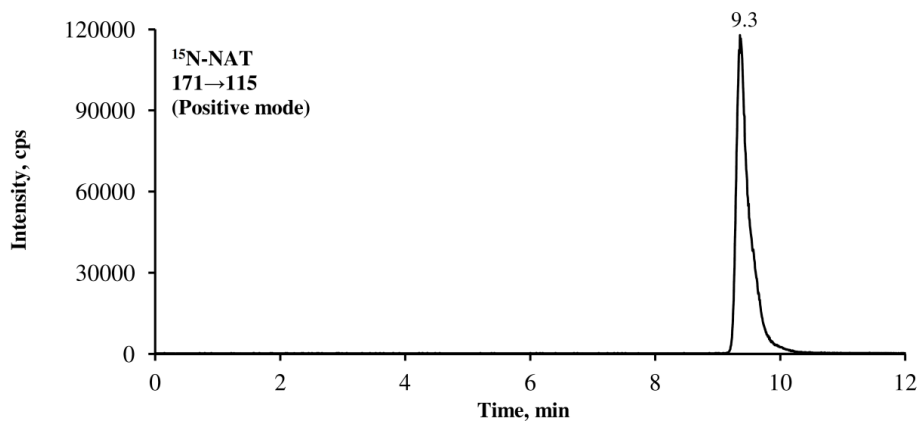
ESI mode	Precursor ion, amu	Product ion, amu	DP <sup>a</sup> , V	FP <sup>b</sup> , V	CE <sup>c</sup> , V
Positive	171	115	30	150	30
Negative	169	140	-60	-200	-30

<sup>a</sup> 錐體電壓 (declustering potential, DP)

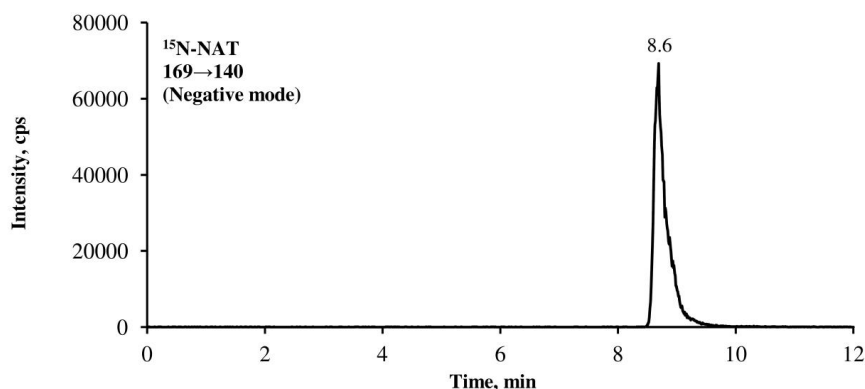
<sup>b</sup> 聚焦電壓 (focusing potential, FP)

<sup>c</sup> 碰撞能量 (collision energy, CE)

圖六及圖七分別為  $^{15}\text{N}$ -NAT 在正電和負電模式下的層析圖譜， $^{15}\text{N}$ -NAT 的滯留時間為 8.6-9.3 分鐘。由於正電模式與負電模式在質譜分析感度無顯著差異，因此我們將同時採用的正電模式進行定性與定量。



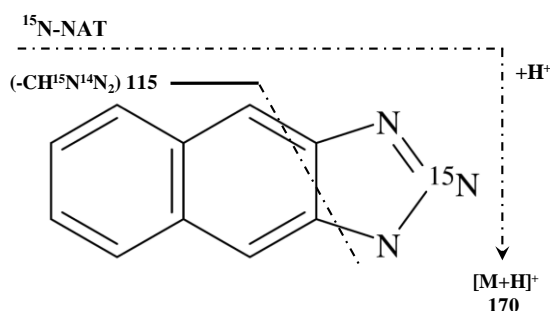
圖六、 $^{15}\text{N}$ -NAT 標準品在正電模式下的層析圖譜 (濃度為  $3.12\ \mu\text{M}$   $^{15}\text{N}$ -NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)



圖七、 $^{15}\text{N-NAT}$  標準品在負電模式下的層析圖譜 (濃度為  $3.12 \mu\text{M } ^{15}\text{N-NO}_2^-$ )

## 2. 尿液中 $^{15}\text{N-NO}_2^-$ 的定量技術開發

下圖八為  $^{15}\text{N-NAT}$  於 LC-MS/MS 中  $m/z$  171→115 的分子碎裂模式，推測母離子  $[\text{C}_{10}\text{H}_7\text{N}_3 + \text{H}]^+$   $m/z$  171 中性丟失  $\text{CHN}_3$  後，獲得子離子  $[\text{C}_9\text{H}_6 + \text{H}]^+$   $m/z$  115。



圖八、 $^{15}\text{N-NAT}$  在 MS/MS 質譜中分子碎裂推測

在一般未施予  $^{15}\text{N-NO}_2^-$  的動物尿液中，亞硝酸鹽主要的存在形式以  $^{14}\text{N-NO}_2^-$  為主，但仍有極微量的  $^{15}\text{N-NO}_2^-$  自然存在 (natural abundance)，其含量相對於  $^{14}\text{N-NO}_2^-$  約為 0.368%；此外，自然存在的  $\text{NO}_2^-$  經 DAN 衍生化形成 NAT，經 ESI 電灑離子化帶  $\text{H}^+$  電荷的母離子  $m/z$  以 170 為主，但 NAT 中  $^{13}\text{C}$ 、 $^2\text{H}$  及  $^{15}\text{N}$  也會自然存在，因此由理論計算  $m/z$  為 171 的母離子含量相對於 170 約為 12.2%。但在 MS/MS 模式下監測  $m/z$  171→115，NAT 中自然存在的  $^{13}\text{C}$ 、 $^2\text{H}$  及  $^{15}\text{N}$  須位於中性丟失的  $\text{CHN}_3$  基團，方可通過 Q3 到達偵測器。由理論計算  $m/z$  171→115 的自然含量相對於  $m/z$  170→115 約為 2.2%。因此尿液中  $^{14}\text{N-NO}_2^-$  衍生化形成的  $^{14}\text{N-NAT}$  將影響  $^{15}\text{N-NO}_2^-$  衍生化形成的  $^{15}\text{N-NAT}$  的定量。

為了精準定量小鼠尿液中  $^{15}\text{N-NO}_2^-$  或  $^{15}\text{N-NO}_3^-$  含量，本研究參考 Tsikas et al. (2010) 利用  $^{15}\text{N-NO}_2^-$  或  $^{15}\text{N-NO}_3^-$  同位素加入尿液中以定量  $^{15}\text{N-NO}_2^-$  及  $^{15}\text{N-NO}_3^-$  的理論算式，並修正如下：

尿液樣本未添加  $^{15}\text{N-NO}_2^-$  或  $^{15}\text{N-NO}_3^-$  (內含  $^{14}\text{N-NO}_2^-$  或  $^{14}\text{N-NO}_3^-$ )，經衍生後產生  $^{15}\text{N-NAT}$  及  $^{14}\text{N-NAT}$ 。 $^{15}\text{N-NAT}$   $m/z$  171→115 與  $^{14}\text{N-NAT}$   $m/z$  170→115 的積分面積比為 Ru (公式 1)， $\text{C}^{[15\text{N}]}$  及  $\text{C}^{[14\text{N}]}$  分別代表尿液中  $^{15}\text{N-NO}_2^-$  與  $^{14}\text{N-NO}_2^-$  的濃度。

$$R_u = \frac{m/z\ 171 \rightarrow 115}{m/z\ 170 \rightarrow 115} = \frac{C[^{15}\text{N}]}{C[^{14}\text{N}]} \quad (1)$$

尿液樣本添加已知濃度同位素內標準品  $^{15}\text{N-NO}_2^-$  或  $^{15}\text{N-NO}_3^-$ ， $^{15}\text{N-NAT}$   $m/z\ 171 \rightarrow 115$  與  $^{14}\text{N-NAT}$   $m/z\ 170 \rightarrow 115$  的積分面積比為  $R_s$ ，如公式 2a；而公式 2a 可重新排列成公式 2b。

$$R_s = \frac{m/z\ 171 \rightarrow 115}{m/z\ 170 \rightarrow 115} = \frac{C[^{15}\text{N}] + C[^{15}\text{N}]_{IS}}{C[^{14}\text{N}]} \quad (2a)$$

$$R_s = \frac{C[^{15}\text{N}]}{C[^{14}\text{N}]} + \frac{C[^{15}\text{N}]_{IS}}{C[^{14}\text{N}]} \quad (2b)$$

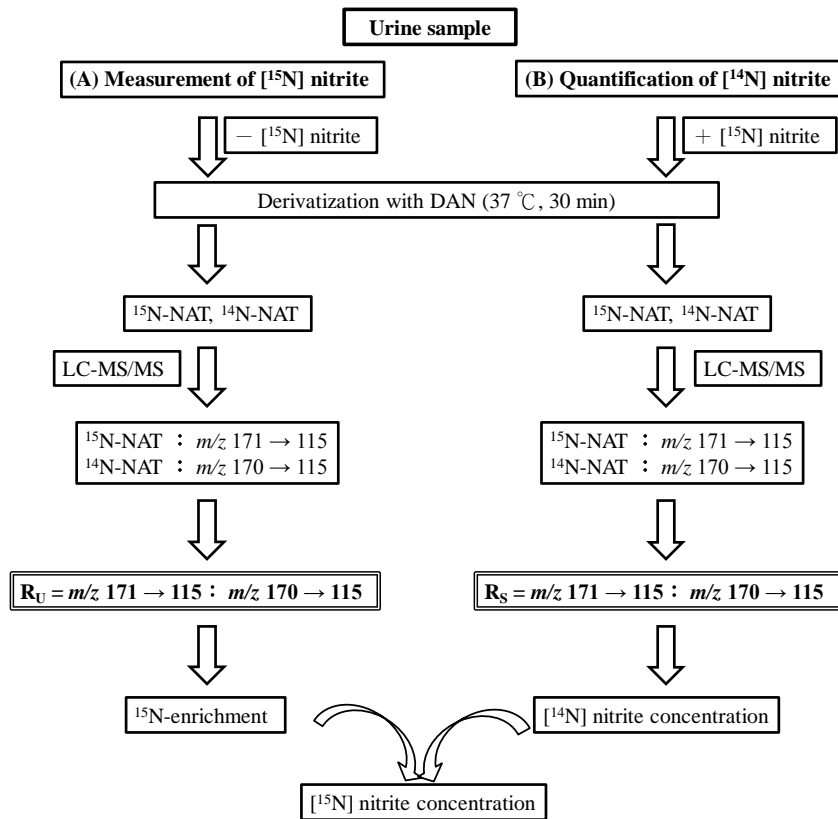
由公式 1 與 2b，可推導出公式 3，而公式 3 可再重新排列成公式 4：

$$R_s = R_u + \frac{C[^{15}\text{N}]_{IS}}{C[^{14}\text{N}]} \quad (3)$$

$$C[^{14}\text{N}] = \frac{C[^{15}\text{N}]_{IS}}{R_s - R_u} \quad (4)$$

結合公式 1 和公式 4 可獲得公式 5，以用來計算尿液樣本中  $^{15}\text{N-NO}_2^-$  或  $^{15}\text{N-NO}_3^-$  的濃度，實驗構想如下圖九所示。

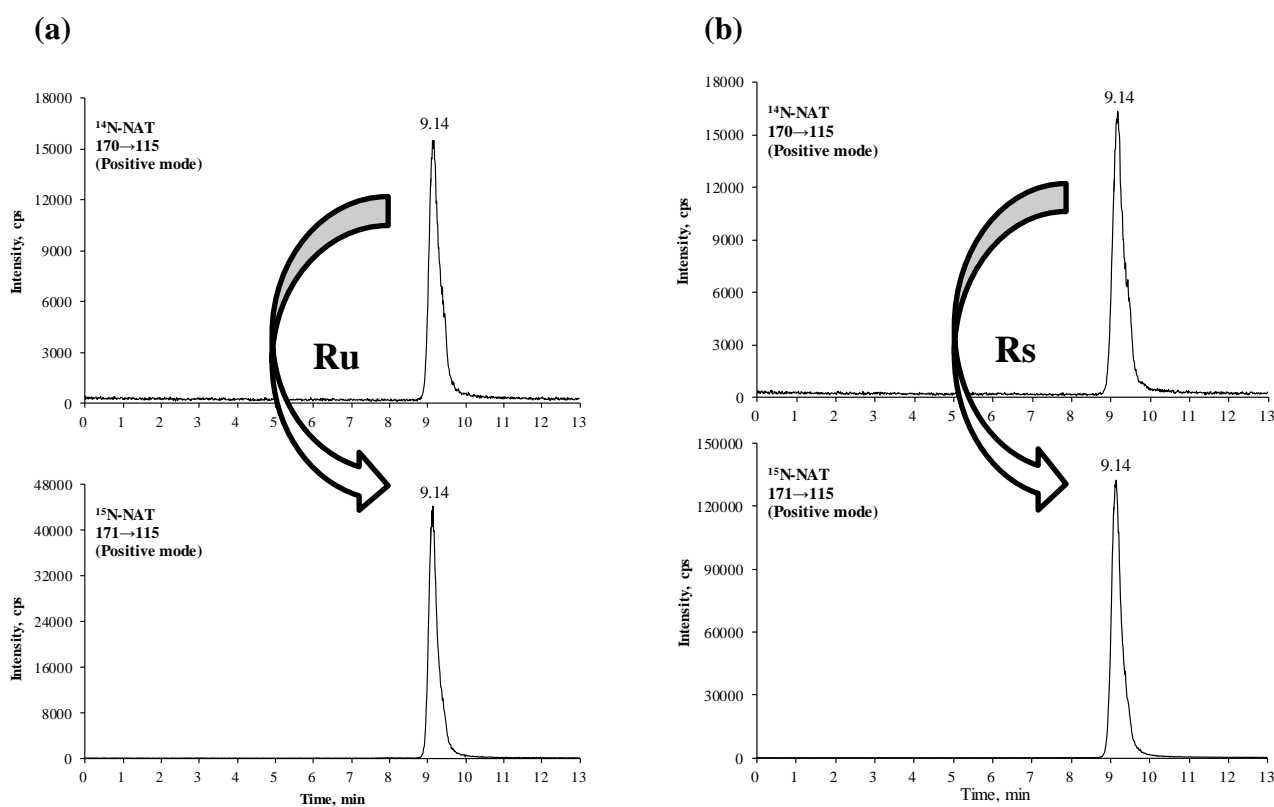
$$C[^{15}\text{N}] = C[^{15}\text{N}]_{IS} \times \frac{R_u}{R_s - R_u} \quad (5)$$



圖九、尿液不添加  $^{15}\text{N-NO}_2^-$  (A) 或  $^{15}\text{N-NO}_3^-$  (B) 以獲得  $R_u$  及  $R_s$ ，推估尿液中  $^{15}\text{N-NO}_2^-$  含量

### 3. 運用 on-line SPE LC-MS/MS 分析小鼠尿液中 $^{15}\text{N-NO}_2^-$ 及 $^{15}\text{N-NO}_3^-$ 衍生物 $^{15}\text{N-NAT}$

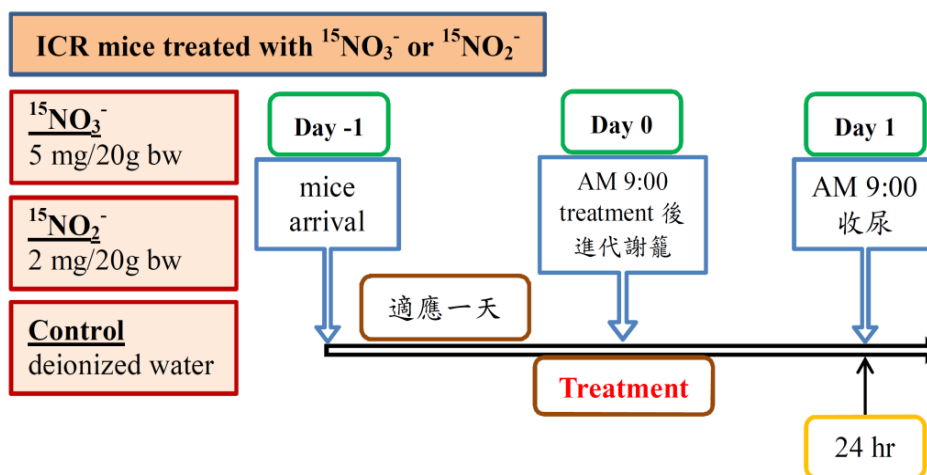
小鼠實驗採用樂斯科生技公司購買 6 週大 ICR 品系雄性小鼠，分為控制組、 $^{15}\text{N-NO}_3^-$  餵食組及  $^{15}\text{N-NO}_2^-$  餵食組。本研究運用 on-line SPE LC-MS/MS 建立尿液中  $^{15}\text{N-NO}_2^-$  及  $^{15}\text{N-NO}_3^-$  分析技術，並將此技術運用於小鼠尿液樣本分析。圖十為分析小鼠尿液樣本  $^{15}\text{N-NO}_2^-$  的定量分析範例，利用不添加或添加  $^{15}\text{N-NO}_2^-$  以獲得 Ru 及 Rs 並帶入上節公式 5。當欲分析小鼠尿液  $^{15}\text{N-NO}_3^-$  時，需經 nitrate reductase 轉化還原成  $^{15}\text{N-NO}_2^-$  後再與 DAN 衍生化生成  $^{15}\text{N-NAT}$ 。



圖十、餵食  $^{15}\text{N-NO}_2^-$  小鼠尿液在正電模式下  $^{15}\text{N-NAT}$  層析圖譜；不添加  $^{15}\text{N-NO}_2^-$  (A) 或  $^{15}\text{N-NO}_2^-$  (B) 以獲得 Ru 及 Rs (推得尿液樣本中  $^{15}\text{N-NO}_2^-$  濃度為  $21.7 \mu\text{M}$ )

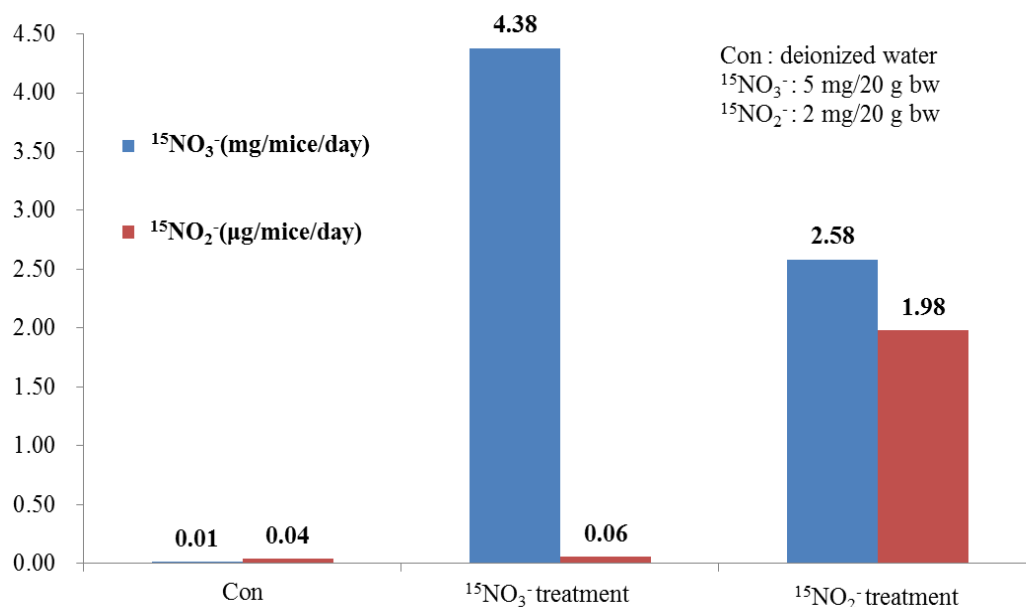
#### (1) 暴露 $^{15}\text{N-NO}_3^-$ 或 $^{15}\text{N-NO}_2^-$ 後 24 小時內尿液分析：

控制組以胃管餵食去離子水 ( $0.2 \text{ mL}/20 \text{ g body weight}$ )， $^{15}\text{N-NO}_3^-$  餵食組及  $^{15}\text{N-NO}_2^-$  餵食組分別餵食以  $^{15}\text{N}$  標定的  $^{15}\text{N-NO}_3^-$  ( $5 \text{ mg}/20 \text{ g body weight}$ ) 和  $^{15}\text{N-NO}_2^-$  ( $2 \text{ mg}/20 \text{ g body weight}$ ) 水溶液後進入代謝籠，尿收集管中預先添加  $0.1 \text{ mL}$  三合一抗生素 (Antibiotic Antimycotic Solution ( $100\times$ ), Sigma-Aldrich) 並收集 24 小時內排尿。代謝籠中飲用水內含有 Amoxicillin ( $0.25 \text{ mg/mL}$ )。實驗設計如下圖所示。



圖十一、小鼠餵食  $\text{NO}_3^-$  或  $\text{NO}_2^-$  後收集 24 小內尿液

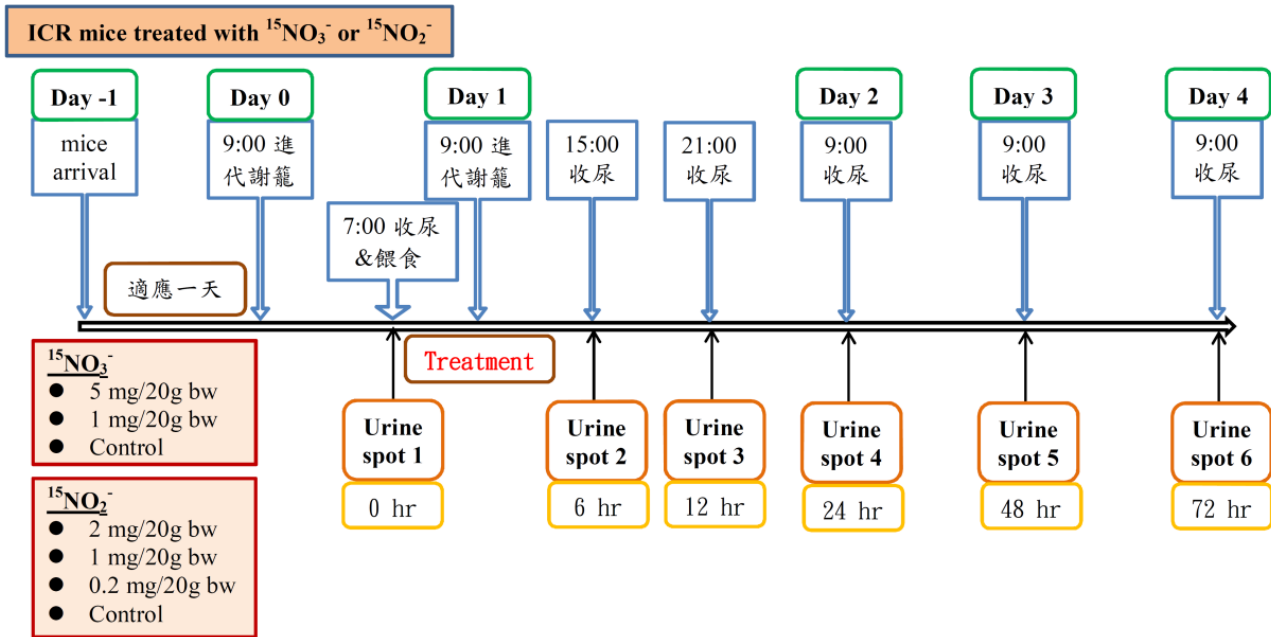
如下圖十二，分析結果發現當小鼠施予  $^{15}\text{N-NO}_3^-$  (5 mg/20 g body weight)，其排出形式主要以  $^{15}\text{N-NO}_3^-$  為主 (4.38 mg/mouse)，佔口服劑量約 62.2%；極少部分  $^{15}\text{N-NO}_3^-$  會還原轉化為  $^{15}\text{N-NO}_2^-$  (0.06  $\mu\text{g}/\text{mice}$ ，約 0.001%)。而當小鼠施予  $^{15}\text{N-NO}_2^-$  (2 mg/20 g body weight)，其排出形式仍主要以  $^{15}\text{N-NO}_3^-$  為主 (2.58 mg/mouse)，佔口服劑量約 69.3%，這表示  $^{15}\text{N-NO}_2^-$  在體內會快速氧化生成  $^{15}\text{N-NO}_3^-$ ；少部分  $^{15}\text{N-NO}_2^-$  會以原態  $^{15}\text{N-NO}_2^-$  (1.98  $\mu\text{g}/\text{mice}/\text{day}$ ，約 0.07%) 經尿液排出。因此由  $^{15}\text{N-NO}_3^-$  及  $^{15}\text{N-NO}_2^-$  餵食，我們可推斷小鼠不管外在暴露  $\text{NO}_2^-$  或  $\text{NO}_3^-$ ，排入尿液的主要形式皆為  $\text{NO}_3^-$ 。因此尿液中  $\text{NO}_3^-$  是評估飲食中  $\text{NO}_2^-$  及  $\text{NO}_3^-$  總和暴露較佳的生物指標。



圖十二、小鼠餵食  $\text{NO}_3^-$  或  $\text{NO}_2^-$  後尿液中  $^{15}\text{NO}_3^-$  及  $^{15}\text{NO}_2^-$  排出量 (n=3)

(2)  $^{15}\text{N-NO}_3^-$  或  $^{15}\text{N-NO}_2^-$  經由尿液排出體外的縱貫性研究：

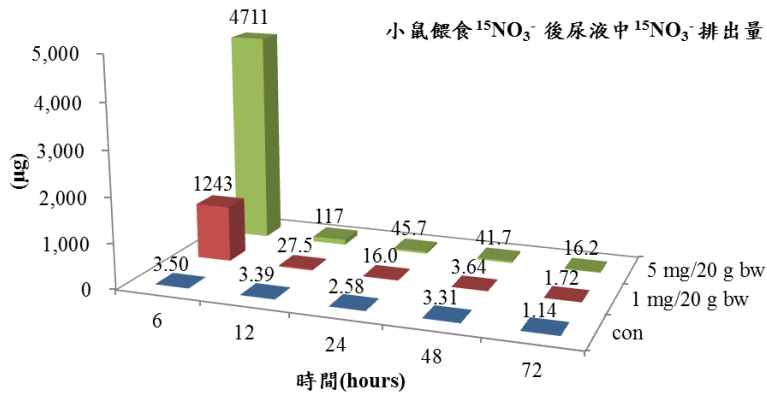
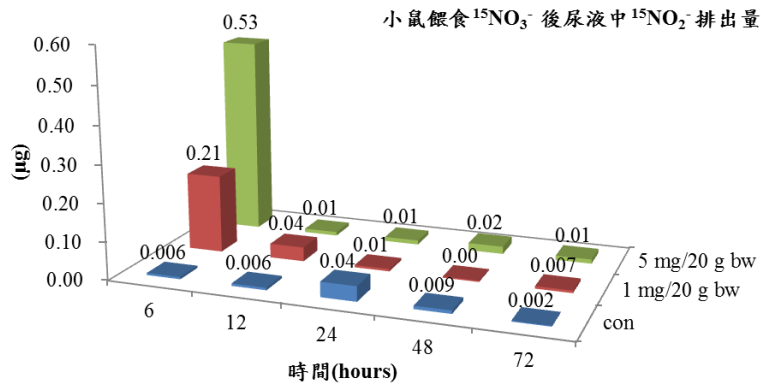
為了進一步得知  $\text{NO}_2^-$  及  $\text{NO}_3^-$  在不同暴露劑量下的排出時序，控制組以胃管餵食去離子水 (0.2 mL/20 g body weight)， $^{15}\text{N-NO}_3^-$  餵食組及  $^{15}\text{N-NO}_2^-$  餵食組分別餵食以  $^{15}\text{N}$  標定的  $^{15}\text{N-NO}_3^-$  (5 及 1 mg per 20 g body weight) 和  $^{15}\text{N-NO}_2^-$  (2、1 及 0.1 mg per 20 g body weight) 水溶液後進入代謝籠，尿收集管中預先添加 0.1 mL 三合一抗生素 (Antibiotic Antimycotic Solution (100×), Sigma-Aldrich) 並收集 6, 12, 24, 48 及 72 小時內排尿。實驗設計如下圖所示。



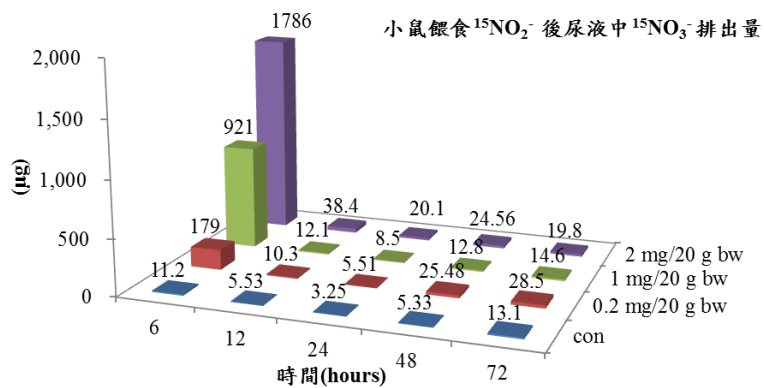
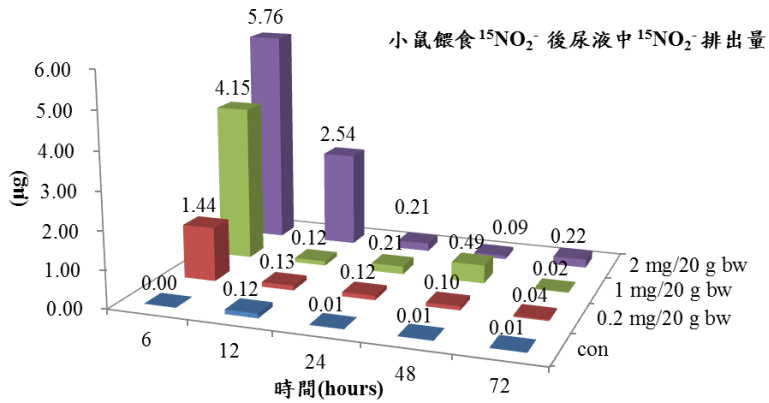
圖十三、小鼠餵食  $\text{NO}_3^-$  或  $\text{NO}_2^-$  後收集 72 小時內不同時段尿液

如下圖十四，研究結果發現當小鼠施予  $^{15}\text{N-NO}_3^-$ ，其排出形式主要以  $^{15}\text{N-NO}_3^-$  為主，並且在 6 個小時內排出絕大部分劑量。1 mg/20 g body weight 及 5 mg/20 g body weight 的  $^{15}\text{N-NO}_3^-$  施予劑量分別在 6 個小時內以  $^{15}\text{N-NO}_3^-$  形式排出 79.5% 及 71.1% 口服劑量；極少部分  $^{15}\text{N-NO}_3^-$  會還原轉化為  $^{15}\text{N-NO}_2^-$ ，約有 0.01~0.02% 主要在 6 個小時內以  $^{15}\text{N-NO}_2^-$  形式排出。如下圖十五，而當小鼠施予  $^{15}\text{N-NO}_2^-$ ，其排出形式仍主要以  $^{15}\text{N-NO}_3^-$  為主，且在 6 個小時內排出絕大部分劑量。0.2 mg/20 g body weight、1 mg/20 g body weight 及 2 mg/20 g body weight 的  $^{15}\text{N-NO}_2^-$  施予劑量分別在 6 個小時內以  $^{15}\text{N-NO}_3^-$  形式排出 57.9%、58.3% 及 56.1% 口服劑量；少部分  $^{15}\text{N-NO}_2^-$  (0.2~0.6%) 會以原態  $^{15}\text{N-NO}_2^-$  在 6 個小時內經尿液排出。因此由  $^{15}\text{N-NO}_3^-$  及  $^{15}\text{N-NO}_2^-$  餵食後的縱貫性研究，我們發現推斷小鼠不管外在暴露  $\text{NO}_2^-$  或  $\text{NO}_3^-$ ，大部分在 6 個小時內排出，其在尿液中的主要形式皆為  $\text{NO}_3^-$ 。因此尿液中  $\text{NO}_3^-$  的量測所代表的是短時間內 (< 6 小時)  $\text{NO}_2^-$  及  $\text{NO}_3^-$  的總暴露量。此外，尿液中  $\text{NO}_2^-$  的量測不易作為外在暴露  $\text{NO}_2^-$  的指標，因絕大部分  $\text{NO}_2^-$  會在體內氧化成  $\text{NO}_3^-$  再排入尿液中。





圖十四、小鼠餵食 $^{15}\text{NO}_3^-$ 後72小時內尿液中 $^{15}\text{NO}_2^-$ 及 $^{15}\text{NO}_3^-$ 排出量變化(n=6)



圖十五、小鼠餵食 $^{15}\text{NO}_2^-$ 後72小時內尿液中 $^{15}\text{NO}_2^-$ 及 $^{15}\text{NO}_3^-$ 排出量變化(n=6)

## (五) 參考文獻

- Chao MR, Shih YM, Hsu YW, Liu HH, Chang YJ, Lin BH, Hu CW. 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.
- Gilliam MB, Sherman MP, Griscavage JM, Ignarro LJ. A spectrophotometric assay for nitrate using NADPH oxidation by *Aspergillus* nitrate reductase. *Anal Biochem* 1993; 212: 359-365.
- Tsikis D, Schwarz A, Stichtenoth DO. (2010). Simultaneous Measurement of [<sup>15</sup>N]Nitrate and [<sup>15</sup>N]Nitrite Enrichment and Concentration in Urine by Gas Chromatography Mass Spectrometry as Pentafluorobenzyl Derivatives. *Anal Chem* 2010; 86: 2585–2587.
- Misko TP, Schilling RJ, Salvemini D, Moore WM, Currie MG. A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples. *Anal Biochem* 1993; 214: 11-16.
- Verdon CP, Burton BA, Prior RL. Sample pretreatment with nitrate reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase quantitatively reduces nitrate while avoiding interference by NADP+ when the Griess reduction is used to assay for nitrite. *Anal Biochem*. 1995; 224: 502-508.

## (六) 成果自評

動物外在暴露 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>及 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>後，量測體內 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>及 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>易遭受本身內生性 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>及 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>的干擾問題。總計畫成功運用 on-line SPE LC-MS/MS 搭配 DAN 衍生化法建立體液中 <sup>15</sup>N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>及 <sup>15</sup>N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>分析技術，此方法具有高敏感度及高特異性，可以準確量測體液中的 <sup>15</sup>N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>及 <sup>15</sup>N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>，作為追蹤硝酸鹽及亞硝酸鹽在動物體內代謝轉化的重要工具。此分析技術提供子計畫三餵食 <sup>15</sup>N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>小鼠體液中 <sup>15</sup>N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>及 <sup>15</sup>N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>的精準定量且能排除內生性干擾問題。NO<sub>2</sub><sup>-</sup>及 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>的質譜量測成果部分已發表於國際重要自由基期刊 *Free Radical Biology and Medicine* (Impact factor = **5.784**)及兩篇研討會論文發表在 *Clinical Applications of Mass Spectrometry Conference, 2014, Barcelona, Spain*。同時，在本研究的支持下發表蛋白質的硝化產物質譜分析法”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”於國際期刊 *Chemical Research in Toxicology* (2015)。

子計畫一	計畫主持人：余豐益 教授
亞硝胺之單株抗體生產與酵素免疫分析法及快速奈米金免疫檢測試紙之開發及應用	

### (一)前言

亞硝胺 (nitrosamin) 是四大食品污染物之一，葉菜類、加工食品、酒和香煙中都含有亞硝胺，而且亞硝胺也被應用於化妝品和塑膠製品的製程中，此外，食物中的亞硝酸鹽類和胺在酸性環境中會進行胺化反應而生成亞硝胺，而食品中亞硝胺的含量也因此提高。亞硝胺已經被世界認為三大致癌物質之一，過去文獻中已經證實被餵食 N-nitrosodimethylamine (NDMA) 的大鼠有肝衰竭的現象發生 (Hultin et al., 1960)，在許多文獻中已經證明亞硝胺對實驗動物具有致癌性，而且從流行病學的統計結果中顯示食入亞硝胺的多寡與食道癌、胃癌和肝癌的發生率成正相關係 (Eichholzer, 1998 ; Jakszyn and Gonzalez, 2006)，但是目前還沒有直接的實驗數據指出亞硝胺在人體的致癌性，因此亞硝胺中的 N-Nitrosodimethylamine (NDMA) 及 N-Nitrosomethylethylamine (NMEA) 已被 International Agency for Research on Cancer (IARC) 分類為 2A，而 N-Nitrosopyrrolidine (NPyr) 被歸類為 2B 類致癌物質，而香煙中含有三種高劑量的亞硝胺分別是：N-Nitrosornicotine (NNN)、4-(nitrosomethylamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) 和 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-Pyridyl)-1-Butanol (NNAL)，也被證實於癌症進程習習相關，此外過去文獻指出當嬰兒長期攝取含有過量的硝酸鹽的食物，會導致嬰兒有呼吸急促、震抖、心律困難和窒息的風險 (1995; Sanchez-Echaniz et al., 2001)，因此各國對亞硝胺的使用提出各項規定和限制，歐盟禁止亞硝酸鹽用於嬰兒食品，而且規定嬰兒的塑膠製品內亞硝胺的含量不可以超過 0.05 mg/kg，在乳酪中硝酸鹽含量需要少於 50 mg/kg，醃製肉品中不可以超過 250 mg/kg，而新鮮蔬菜（菠菜和萵苣）中最高硝酸鹽含量不可以高於 4,500 mg/kg；美國則規定應用於煙燻肉類及煙燻鮭魚其最終成品之硝酸鹽及亞硝酸鹽殘留限量分別為 500 ppm 及 200 ppm，而應用於煙燻鮪魚其最終成品之亞硝酸鹽限量為 10 ppm。我國規定硝酸鹽及亞硝酸鹽添加於肉類品及魚肉製品，用量以 NO<sub>2</sub> 殘留量計需要在 70 ppm 以下，但生鮮肉類、魚類不得檢出。因為亞硝胺的致癌性及其對於食品的污染，因此分析食品中亞硝胺的含量是非常重要的，目前可以利用氣相層析儀 (Gas Chromatography, GC)、分光光度儀 (Spectrophotometry) 以及液相層析串聯式質譜儀 (Liquid chromatograph tandem mass spectrometry, LC MS/MS) 等儀器檢測食品、香菸、化妝品和塑膠製品中亞硝胺的含量多寡，但是因為以上檢測方式的過程過於繁瑣，而且需要專業人員的操作，因此開發一套快速且簡易操作的檢測方式是非常重要的。

## (二)研究目的

有鑑於亞硝胺對於人體有致癌風險的存在，因此本計劃希望藉由開發檢測方式，來降低社會大眾誤食的機率，並提升農業及食品加工業對硝酸鹽類使用的憂患意識。因此，本計畫擬藉由亞硝胺專一性單株抗體之生產來開發一快速且費用低廉的酵素免疫分析法以及便利的快速奈米金免疫檢測試紙來檢測食品以及香煙中的亞硝胺的含量，期望可藉由免疫快速檢測方式的開發，協助人民免於亞硝胺食品安全的恐懼。

## (三)研究方法

### 3.1. 製備不同的亞硝胺接合物

由於亞硝胺鹽類的分子量小，而且不具有抗原性，因此必須利用不同的衍生方法以增加亞硝胺的分子量，接著與載體蛋白質接合，進而對實驗動物進行免疫，製備抗體。

#### 3.1.1. 利用 EDC/NHS 修飾法合成 NMU-BSA

為了將 N-Nitroso-N-methylurea (NMU) 接合至牛血清蛋白質 (Bovine serum albumin, BSA) 接合，於是首先取 3 mg BSA 溶於 0.6 ml 0.1 M carbonate buffer pH 9.6 中，接著加入 4.5 mg 1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride (EDC) 及 2.25 mg N-hydroxysuccinimide (NHS) 溶於 DMF 溶液，室溫反應 30 分鐘後，緩慢加入 3 mg NMU 溶於 0.3 mL DMF 中，室溫下攪拌兩小時後，於 4°C 反應 16 小時，最後以 0.01 M PBS 透析三次，並且將蛋白質保存於 -20°C 的環境中。

#### 3.1.2. 利用高碘酸鹽 (Sodium Periodate) 法合成 NMU-HRP

取 3 mg 辣根過氧化氫酵素 (Horseradish peroxidase HRP) 溶於 0.6 mL d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O，接著加入 0.6 mL 0.1M Sodium Periodate，在室溫反應 30 分鐘後，以 2 L 0.001 M Acetate buffer 透析三次，接著加入 0.05 ml 0.2 M Carbonate buffer pH 9.6，接著加入 0.5 mg NMU 溶於 0.05 mL DMF 中，在室溫且避光環境中反應 4 小時之後，再加入 0.12 mL 的 4 mg/mL Sodium borohydeide，室溫反應 1 小時，最後以 2 L 的 0.01 M PBS 進行透析三次。

#### 3.1.3. 利用 EDC/NHS 修飾法合成 NMU-CA(PEG)<sub>4</sub>-BSA

##### 3.1.3.1 合成 NMU-CA(PEG)<sub>4</sub>

首先取 2 mg 的 CA(PEG)<sub>4</sub> 溶於 0.4 mL 0.01 M PBS 中，接著加入 6 mg 的 EDC 和 3 mg 的 NHS 溶解於 DMF 溶液中，在室溫下反應 30 分鐘使 CA(PEG)<sub>4</sub> 活化，接著加入 1 mg 的 NMU 溶於 0.2 mL 的 DMF 溶液，先在室溫中反應 2 小時，接著再移至 4°C 中反應 16 小時。

### 3.1.3.2. 合成 NMU-CA(PEG)<sub>4</sub>-BSA

首先取 2 mg 的 BSA 溶在 0.3 mL 0.01 M PBS 中，接著加入 3 mg 的 EDC 和 1.5 mg 的 NHS 溶解於 DMF 溶液中，在室溫中反應 1 小時，接著加入 1.8 mL 的 2-mercaptoethanol (最終濃度為 20 mM)，在室溫中反應 15 分鐘，接著將 NMU-CA(PEG)<sub>4</sub> 加入上述反應中，並且先在室溫中反應 2 小時，接著再移至 4°C 中反應 16 小時，最後以 0.01 M PBS 透析三次，並且將蛋白質保存於 -20°C 的環境中。

### 3.1.4. 利用 EDC/NHS 修飾法合成 NMU-BTG-NMBA

首先取 8 mg 的牛甲狀腺素球蛋白 (thyroglobulin from bovine thyroid, BTG) 溶於 0.8 mL 的 0.1 M carbonate buffer pH 9.6，接著加入 1 mg 的 NMU 和 1 mg 的 N-Nitroso-N-methyl-4-aminobutyric Acid (NMBA) 分別溶於 0.2 mL 的 DMSO 溶液中，最後加入 3 mg EDC 和 1.5 mg NHS 溶解於 DMSO 溶劑中，先在室溫中反應 2 小時，接著再移至 4°C 中反應 16 小時，最後以 0.01 M PBS 透析三次，並且將蛋白質保存於 -20°C 的環境中。

### 3.1.5. 利用 EDC/NHS 修飾法合成 NMBA-HRP

首先取 1 mg N-Nitroso-N-methyl-4-aminobutyric Acid (NMBA) 溶於 0.05 ml DMSO 溶液中，接著加入 3 mg EDC 及 2 mg NHS 溶於 DMSO 溶液，室溫反應 30 分鐘後，緩慢加入 3 mg HRP 溶於 0.15 mL carbonate buffer 中，室溫下攪拌兩小時後，於 4°C 反應 16 小時，最後以 0.01 M PBS 透析三次，並且將蛋白質保存於 -20°C 的環境中。

### 3.1.6. 利用 EDC/NHS 修飾法合成 NLP-KLH/BSA NLP(N-Nitroso-L-Proline)

首先取 1 mg 的 N-Nitroso-L-Proline (NLP) 溶於 0.1 mL DMF 中，接著加入 3 mg EDC 及 1.5 mg NHS 溶於 DMF 溶液，室溫反應 30 分鐘後，接著加入 2 mg 鎮眼帽貝血藍蛋白 (Keyhole-Limpet Hemocyanin, KLH) 或 2 mg BSA 溶於 0.3 ml 0.1 M carbonate buffer pH 9.6，室溫下攪拌 2 小時後，於 4°C 反應 16 小時，以 0.01 M PBS 中透析三次，並且將蛋白質保存於 -20°C 的環境中。

### 3.1.7. 利用 EDC/NHS 修飾法合成 NLP-HRP

首先取 1 mg NLP 溶於 0.1 mL DMF 中，接著加入 3 mg EDC 及 1.5 mg NHS 溶於 DMF 溶液，室溫反應 30 分鐘後，接著加入 4 mg HRP 溶於 0.3 ml 0.1 M carbonate buffer pH 9.6，室溫下攪拌 2 小時後，於 4°C 反應 16 小時，以 0.01 M PBS 中透析三次，並且將蛋白質保存於 -20°C 的環境中。

### 3.1.8. 利用琥珀酸酐法 (succinic anhydride) 衍生 NLP, NNA

為了將 NLP 和 N-Nitroso Nipecotic Acid (NNA) 中的羥基 (hydroxide group, -OH) 衍生成羧基 (carboxyl group, -COOH), 以利接合至載體蛋白質上, 因此, 首先各取 1 mg 的 NLP 和 NNA 溶於 50  $\mu$ L 的吡啶 (pyridine), 接著加入 0.5 mg 的 succinic anhydride 溶於 120  $\mu$ L pyridine 中, 在室溫而且含有氮氣的環境中反應 60 小時後, 利用減壓濃縮的方法將 pyridine 移除, 並且用 250 $\mu$ L 的 DMF 和 1,4-dioxane (比例為 1:1) 混合液回溶。

### 3.1.9. 利用 EDC/NHS 修飾法合成 NLP-SH-BSA, NNA-SH-BSA

首先分別取 1 mg 的 NLP-SH 或 1 mg 的 NNA-SH 溶於 0.5 mL DMF 中, 接著加入 2 mg EDC 及 1.5 mg NHS 溶於 DMF 溶液, 室溫反應 2 小時後, 接著分別加入 4 mg 或 3 mg BSA 溶於 0.8 ml 0.1 M carbonate buffer pH 9.6, 室溫下攪拌 2 小時後, 移至 4 $^{\circ}$ C 環境中反應 16 小時, 再以 0.01 M PBS 中透析三次, 並且將蛋白質保存於 -20 $^{\circ}$ C 的環境中。

### 3.1.10. 利用 EDC/NHS 修飾法合成 NNA-BSA/ $\gamma$ -globulin/HRP

取 1 mg 的 NNA 溶於 0.1 mL DMF 中, 接著加入 3 mg EDC 及 1 mg NHS 溶於 DMF 溶液, 室溫反應 30 分鐘後, 接著分別加入 1 mg BSA 或 1 mg  $\gamma$  球蛋白 ( $\gamma$ -globulin) 溶於 0.15 ml 0.1 M carbonate buffer pH 9.6, 在 4 $^{\circ}$ C 環境中反應 16 小時後, 再以 0.01 M PBS 中透析三次, 並且將蛋白質保存於 -20 $^{\circ}$ C 的環境中。

### 3.1.11. 利用乙二胺法 (Ethylenediamine, EDA) 衍生 BTG/BSA

為了增加毒素與載體蛋白質接合的機率, 所以利用 EDA 的修飾將蛋白質上的羧基衍生成胺基 (amide group, -NH<sub>2</sub>)。首先取 50 mg 的 BTG 或 BSA 溶於 2.5 mL 的 d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O 中, 接著加入 70 mg 的 EDC, 並且加入 200  $\mu$ L 的 10% EDA, 並將 pH 值調到 5.5, 在室溫中反應 2 小時後加入 80 mg 的 EDC, 在室溫中反應 16 小時後, 以 0.01 M PBS 中透析三次, 並且將蛋白質保存於 -20 $^{\circ}$ C 的環境中。

### 3.1.12. 利用甲醛法 (Formaldehyde) 修飾法合成 NNK-EDA-BTG/BSA, NNK-HRP 和 NNAL-EDA-BTG, NNAL- $\gamma$ -globulin

取 1 mg 的 Nicotine-derived nitrosamine ketone (NNK) 或 1 mg 的 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-Pyridyl)-1-Butanol (NNAL) 溶於 1 ml 0.1 M sodium acetate buffer pH 4.4, 接著加入 2 mg 的 EDA-BTG/BSA 或 6 mg HRP 或 8 mg 的  $\gamma$ -globulin 溶於 0.1 M sodium acetate buffer pH 4.4 中, 最後加入 100  $\mu$ L 的 36.5% 的 formaldehyde, 在室溫而且避光的環境中反應 72 小時後, 以 0.01 M PBS 中透析三次, 並且將蛋白質保存於 -20 $^{\circ}$ C 的環境中。

### 3.1.13. 利用琥珀酸酐法 (succinic anhydride) 衍生 NNAL

為了將 NNAL 中的羥基衍生成羧基，以利接合至載體蛋白質上，因此，首先各取 0.5 mg 的 NNAL 溶於 100  $\mu$ L pyridine，接著加入 0.5 mg 的 succinic anhydride 溶於 200  $\mu$ L pyridine 中，在室溫而且含有氮氣的環境中反應 48 小時後，利用減壓濃縮的方法將 pyridine 移除，並且用 100 $\mu$ L 的 甲醇 (Methanol) 回溶。

### 3.1.14. 利用 EDC/NHS 修飾法合成 NNAL-SH-BTG/BSA/OVA/ $\gamma$ -globulin

取 1 mg 的 NNAL-SH 溶於 0.1 mL 的 DMSO 中，接著加入 2 mg EDC 和 1 mg NHS 溶於 0.1 mL DMSO 中，在室溫反應 2 小時，最後加入 8 mg 的載體蛋白質，在室溫中反應 16 小時後，以 0.01 M PBS 中透析三次，並且將蛋白質保存於 -20 $^{\circ}$ C 的環境中。

### 3.1.15. 利用羧基二咪唑法 (Carbonyldiimidazole, CDI) 修飾法合成 NNAL-CDI-NMU

為了使 NNAL 與 NMU 接合進而增加分子量，因此首先取 1 mg NNAL 溶於 0.3 mL 丙酮 (acetone)，接著加入 2 mg CDI 溶於 0.3 mL Acetone，在 37 $^{\circ}$ C 而且避光的環境中反應 3 小時，接著加入 1 mg NMU 溶在 0.39 mL 0.05 M carbonate buffer pH 9.6，在室溫而且含有氮氣的環境中反應 48 小時，最後用薄層色層分析法分析衍生結果。

### 3.1.16. 利用甲醛法 (Formaldehyde) 修飾法合成 NNAL-CDI-NMU-BSA/OVA

取 1 mg 的 NNAL-CDI-NMU 溶於 1 mL 0.1 M Sodium acetate buffer pH 4.4，接著加入 2 mg BSA 溶於 1 mL 0.1 M Sodium acetate buffer pH 4.4，最後加入 0.1 mL 36.5% formaldehyde，在室溫而且避光的環境中反應 72 小時，接著在 4 $^{\circ}$ C 環境中反應 16 小時後，以 0.01 M PBS 中透析三次，並且將蛋白質保存於 -20 $^{\circ}$ C 的環境中。

## 3.2. 檢測亞硝胺衍生結果

### 3.2.1 薄層色層分析法

將亞硝胺的衍生後的產物包含 NLP-SH、NNA-SH 和 NNAL-SH 以減壓濃縮的方式將有機溶劑抽乾，再以 DMSO 或 甲醇回溶衍生物，接著分別將等量的亞硝胺衍生物和標準品點在正相薄層層析片 (normal-phase thin-layer chromatography) 上，接著將層析片置於含有 10 ml 的展開液 (NKP-SH 的展開液是 Dichloromethane : Methanol : Acetic acid = 8:2:1，NNA-SH 的展開液是 Ethyl Acetate : Hexane : Acetic Acid = 5:5:0.1，NNAL-SH 的展開液是 Dichloromethane : Methanol = 9:1) 的展開槽中進行層析實驗，待溶液被牽引至終止線時停止層析，並以 254 nm 波長的紫外光下觀察結果。

### 3.2.3 十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳分析法 (SDS-PAGE electrophoresis assay)

取 10  $\mu$ g 的毒素-蛋白質衍生物進行 10% SDS-PAGE，其中堆積層膠體 (stacking gel)

內含有  $d_2H_2O$ 、5% poly-acrylamide (Acrylamide : Bis = 29 : 1)、126 mM Tris pH 6.8、0.1% SDS、0.1% APS、0.1% TEMED，而分離層膠體 (separating gel) 內含有  $d_2H_2O$ 、10% poly-acrylamide (Acrylamide : Bis = 29 : 1)、375 mM Tris pH 8.8、1% SDS、1% APS、0.04% TEMED。以 80-120 伏特室溫下進行約 90 分鐘的電泳分析，接著將 SDS-PAGE 置入考馬斯亮藍溶液 (Coomassie brilliant blue solution) 中在室溫中染色 30 分鐘，接著利用退染劑 (destain buffer) 將 SDS-PAGE 退染至背景質變透明，即可以利用掃描的方式記錄實驗結果。

### 3.3. 製備亞硝胺抗體 (Immunization)

#### 3.3.1 免疫小鼠

為了產生亞硝胺專一性的單株抗體，因此每隻老鼠被接種 50  $\mu g$  的亞硝胺的載體蛋白質 (nitrosamine-conjugated carrier proteins)，實驗步驟為將 100  $\mu g$  的亞硝胺的載體蛋白質溶於 400  $\mu L$  的 0.01 M PBS，並加入等體積的費氏完全佐劑 (complete Freund's adjuvant) 混合均勻，分別以腹腔注射方式接種至 2 隻雌性週齡 4 週 Balb/c 品種的小鼠，兩週後再以 100  $\mu g$  的亞硝胺的載體蛋白質溶於 400  $\mu L$  的 0.01 M PBS，以腹腔注射方式接種至小鼠腹腔中，並以尾部採血以及離心的方式 (13,000 rpm; 30 分鐘; 4  $^{\circ}C$ ) 獲得血清，接著利用 cdELISA 或 ciELISA 測試是否有亞硝胺專一性抗體的產生，而且在每週採血結束時打入與初次接種等劑量的抗原，以加強免疫反應。

#### 3.3.2 免疫紐西蘭大白兔

為了使紐西蘭大白兔對亞硝胺產生專一性的多株抗體，因此將 0.5 mg 的 NNAL- $\gamma$ -globulin 溶於 1000  $\mu L$  的 0.01 M PBS，並加入等體積的費氏完全佐劑 (complete Freund's adjuvant) 混合均勻，並將混合物以表皮注射的方式平均接種在兔子背部表皮，四週後再進行增強免疫的動作，取 0.5 mg 的 NNAL- $\gamma$ -globulin 溶於 1000  $\mu L$  0.01 M PBS，並加入等體積的費氏不完全佐劑 (incomplete Freund's adjuvant) 混合均勻，接著以皮下注射的方式注射在兔子的四肢皮下，第五週後即可對兔子進行耳動脈採血，並利用 ciELISA 檢測血清中是否產生亞硝胺的專一性抗體。

### 3.4. 非直接競爭型酵素連結免疫吸附分析法 (Competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay, ciELISA)

在 96 孔盤中分別加入 100  $\mu L$  不同的亞硝胺的載體蛋白質 (nitrosamine conjugated carrier proteins) (以 0.01 M PBS 稀釋:1:1,000)，於 4  $^{\circ}C$  環境中反應 16 小時後，以 washing buffer (0.05 % Tween 20 in 0.01 M PBS) 洗去未反應的物質，接著加入 170  $\mu L$  的 blocking solution (0.1 %



BSA in 0.01 M PBS), 置於 37 °C 環境中反應 30 分鐘後, 以 washing buffer 洗去未反應的物質, 接著加入 50  $\mu$ L 的亞硝酸標準品並同時加入 50  $\mu$ L 亞硝酸的抗體 (以 0.01 M PBS 稀釋成不同比例), 於 37 °C 環境中反應 1 小時後, 以 washing buffer 洗去未反應的物質, 接著加入 100  $\mu$ L 二級抗體 (以 0.01 M PBS 稀釋: 1:20,000), 置於 37 °C 環境中反應 1 小時後, 以 washing buffer 洗去未反應的物質, 接著加入 100  $\mu$ L 的 TMB substrate, 在室溫且避光的環境中反應 30 分鐘後, 加入 100  $\mu$ L 1 N HCl 終止反應, 最後利用 ELISA reader 測量波長 450 nm 和 650 nm 的吸光值。

### 3.5. 直接競爭型酵素連結免疫吸附分析法 (Competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay, cdELISA)

首先在 96 孔盤中加入 100  $\mu$ L anti mouse Fc 的抗體 (以 0.01 M PBS 稀釋: 1:2,000), 於 37 °C 環境中反應 2 小時後, 以 washing buffer 洗去未反應物質, 再加入 100  $\mu$ L 亞硝酸的抗體 (以 0.01 M PBS 稀釋), 於 37 °C 環境中反應 1 小時後, 以 washing buffer 洗去未反應的物質, 接著加入 170  $\mu$ L 的 blocking solution, 在 37 °C 環境中反應 30 分鐘後, 以 washing buffer 洗去未反應的物質, 接著加入 50  $\mu$ L 的亞硝酸的標準品(濃度 1 ng/mL ~1,000 ng/mL), 而且同時加入 50  $\mu$ L 的亞硝酸-HRP (以 0.01 M PBS 稀釋), 於 37 °C 環境中反應 1 小時後, 以 washing buffer 洗去未反應的物質, 並加入 100  $\mu$ L 的 TMB substrate, 在室溫且避光的環境中反應 30 分鐘後, 加入 100  $\mu$ L 1 N HCl 終止反應, 最後利用 ELISA reader 測量波長 450 nm 和 650 nm 的吸光值。

#### (四)結果與討論

由於 NDMA 和 NMEA 的分子量小, 而且不具有抗原性, 加上其中無適當的官能基與載體蛋白質接合, 因此我們選擇 NDMA 的結構類似物 NMU 和 NMBA 以及 NPyr 的結構類似物 NLP 及 NNA 作為目標物置備免疫抗原, 根據過去實驗室的經驗, 先前置備出六種不同的免疫抗原, 包含 NMU-BSA、NMU-KLH、NMU- $\gamma$ -globulin、NMU-CA(PEG)<sub>4</sub>-BSA 及 NMU-CA(PEG)<sub>4</sub>- $\gamma$ -globulin, 其中只有 NMU-BSA (1:1) 抗原可以使老鼠產生抗體, 但是產生之抗體不穩定而且競爭效果不好, 因此推測 NMU 與載體蛋白質的比例尚不適合, 故後續嘗試改變 NMU 與載體蛋白質的接合比例成 1:2 及 1:3, 卻未有增加競爭效果的現象, 此外我們也嘗試利用其他的亞硝酸類化合物 NLP、NNA 及 NMBA 製備免疫抗原, 其中包含 NLP-BSA、NLP- $\gamma$ -globulin、NLP-KLH, NLP-suc-BSA (NLP-SH-BSA)、NNA-BSA、NNA- $\gamma$ -globulin、NNA-suc-BSA (NNA-SH-BSA) 和 NMU-BSA-NMBA。根據 SDS-PAGE (圖一和圖二)的結果顯示免疫抗原 NLP-BSA、NLP-suc-BSA 皆呈現模糊帶狀, 推測因為 BSA 與 NLP 接合程度不一致, 導致蛋白質片段大小不一, 因此我們認為免疫抗原應該置備成功。而

NMU-BSA-NMB 在 SDS-PAGE 的結果中的模糊帶狀較不明顯，NNA-BSA 則以拖長帶狀出現在分子量較高的位點，因此不確定是否接合成功，但是推測亞硝酸胺-載體蛋白質的結構大小有增加的現象，因此接著進行老鼠免疫，並採集老鼠血清並利用 ELISA 檢測抗體產生的狀況，ELISA (圖三和圖四)的結果指出，目前 NLP、NNA 接合蛋白質以及嘗試 NMU-BSA-NMBA 結合方式免疫老鼠之抗體測試皆未有明顯的競爭效果出現。

因為以上的免疫抗原無法使老鼠產生較穩定的抗體，因此我們推測原因可能為 NMU、NMBA、NLP 和 NNA 的分子量太小的原因，因此接著我們嘗試將分子量較大的亞硝酸胺-NNK 及 NNAL 與不同的載體蛋白質接合，並且免疫老鼠，除了利用不同結合方式直接將 NNK 或 NNAL 接合至載體蛋白質上之外，我們也嘗試利用 succinic anhydride 方法改變 NNAL 的官能基以利接合至載體蛋白質上，另外我們也利用 Carbonyldiimidazole 結合法將 NNAL 以及 NMU 接合在一起，已達到增加分子量的目的，從 TLC (圖五)的結果得知 NNAL-CDI-NMU 的極性與原本的 NNAL 和 NMU 有差異，因此我們推測此衍生方法成功，而從 SDS-PAGE 的結果 (圖六)顯示當 NNAL-CDI-NMU 接合到載體蛋白質後，使載體蛋白質的分子量產生改變，因此推測該次接合實驗成功。免疫實驗中，我們將 NNK-EDA-BTG、NNK-EDA-BSA、NNAL-SH-BTG、NNAL-SH-BSA、NNAL-SH- $\gamma$ -globulin、NNAL- $\gamma$ -globulin、NNAL-EDA-BTG 或 NNAL-CDI-NMU-BSA 分別接種至老鼠中，從 ELISA (圖七和圖八)的結果中得知 NNK-EDA-BTG、NNK-EDA-BSA、NNAL- $\gamma$ -globulin、NNAL-EDA-BTG 皆有抗體產生，但是競爭效果不佳而且老鼠產生抗體的品質也不穩定，因此仍然需要修改亞硝酸胺和載體蛋白質的比例或結合方式，此外也可以藉由增強免疫，使老鼠穩定的產生抗體。從 ELISA (圖八)的結果中顯示 NNAL- $\gamma$ -globulin 可以使老鼠產生競爭效果比較好的抗體，因此我們將該抗原對兔子進行免疫，但是從 ELISA 的檢測結果，我們發現兔子對於 NNAL- $\gamma$ -globulin 抗原仍然沒有抗體的產生，因此可以藉由增加兔子的免疫反應或改接種其他的抗原來改善此現象。

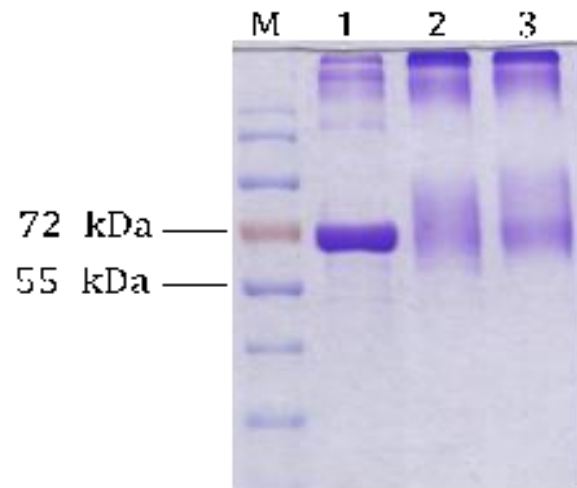
#### (五)參考文獻

1995. Evaluation of certain food additives and contaminants. *World Health Organization technical report series*. 859:1-54.
- Eichholzer, M. and Gutzwiller, F. 1998. Dietary nitrates, nitrites, and N-nitroso compounds and cancer risk: A review of the epidemiologic evidence. *Nutrition Reviews*. 56:95-105
- Hultin, T., E. Arrhenius, H. Low, and P.N. Magee. 1960. Toxic liver injury. Inhibition by dimethylnitrosamine of incorporation of labelled amino acids into proteins of rat-liver preparations in vitro. *The Biochemical journal*. 76:109-116.
- Jakszyn, P., and C.A. Gonzalez. 2006. Nitrosamine and related food intake and gastric and oesophageal cancer risk: a systematic review of the epidemiological evidence. *World journal of gastroenterology*. 12:4296-4303.

Sanchez-Echaniz, J., J. Benito-Fernandez, and S. Mintegui-Raso. 2001. Methemoglobinemia and consumption of vegetables in infants. *Pediatrics*. 107:1024-1028.

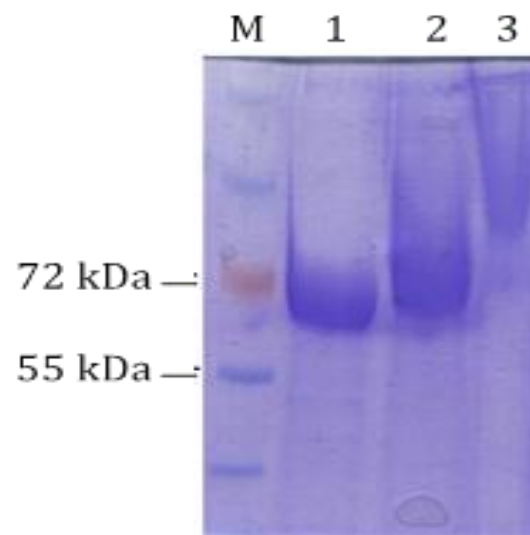
#### (六)成果自評

此一亞硝胺之單株抗體生產與酵素免疫分析法及快速奈米金免疫檢測試紙之開發及應用計畫。本計劃目前已經利用不同的接合法製備許多亞硝胺-載體蛋白質的免疫抗原，而且也嘗試將亞硝胺藉由不同的衍生方法再與載體蛋白質接合，而且從實驗結果得知我們成功開發出製備亞硝胺抗原的方法，但是抗原免疫老鼠無法獲得穩定的抗體生成，也使得融合瘤細胞無法產生，我們也嚐試利用兔子來生產多株抗體，但是遇瓶頸，這也說明了為何節至目前為止仍然沒有亞硝胺之抗體發表出來，因此未來可以嘗試不同的亞硝胺類似物與接合比例或免疫方法，以改善抗體不穩定和辨識效果不佳的問題，並進一步成功生產辨識亞硝胺的抗體並將酵素免疫分析法和快速奈米金免疫檢測試紙開發出來。



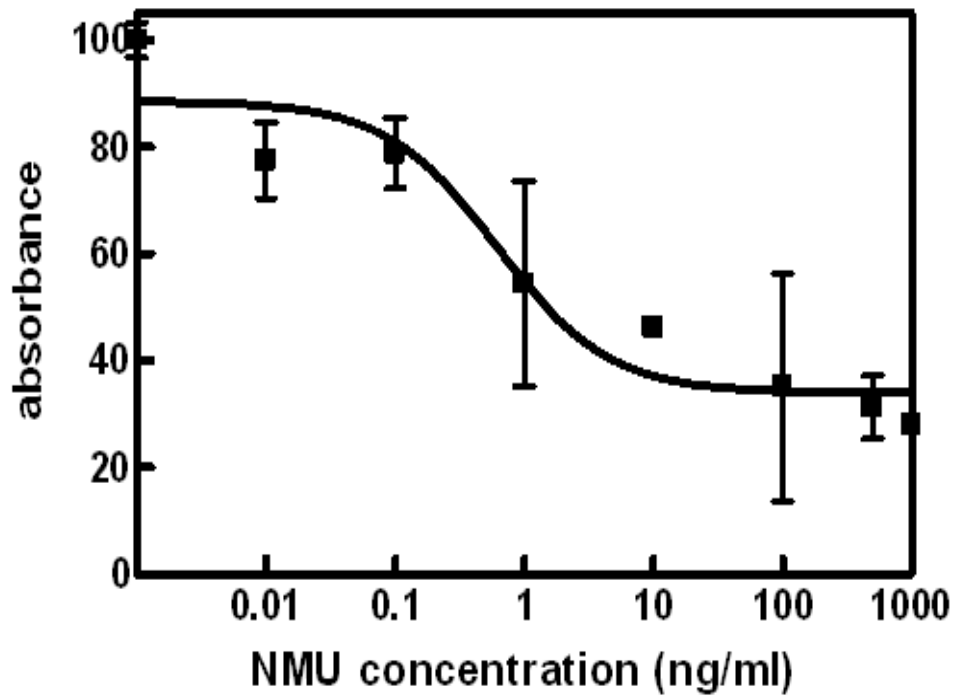
圖一、以 SDS-PAGE 分析 NMU 免疫抗原。

M : marker、Lane 1 : BSA 標準品、  
Lane 2 : NMU-BSA、Lane 3 :  
NMU-CA(PED)<sub>4</sub>-BSA。

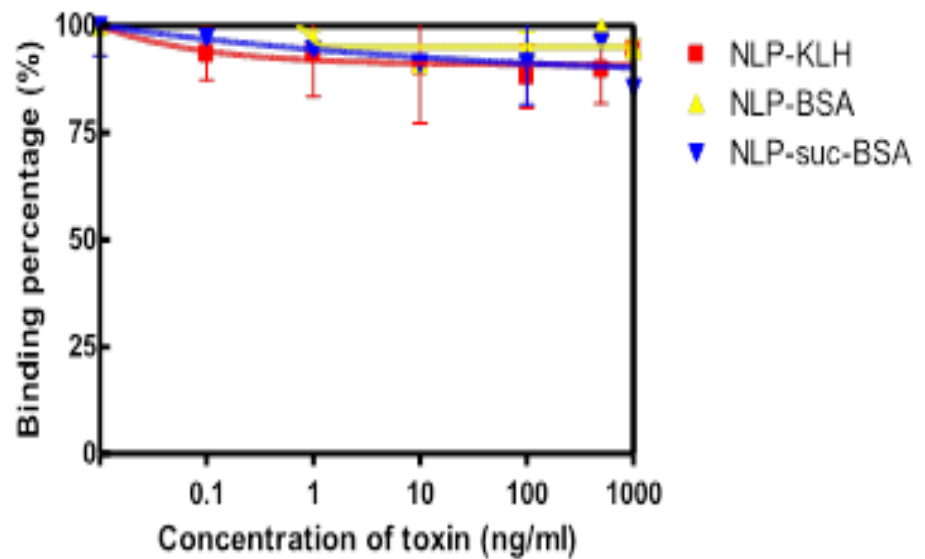


圖二、以 SDS-PAGE 分析 NLP 和 NNA 免疫抗原。

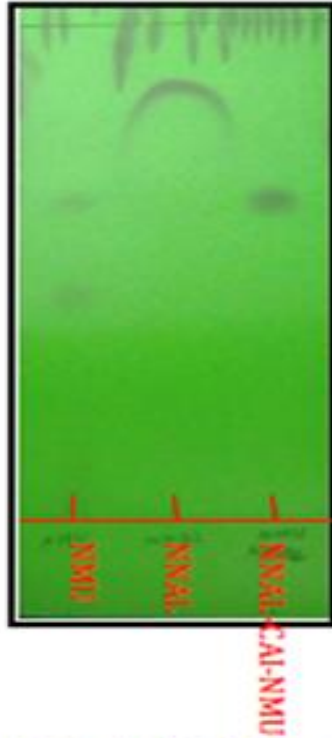
M : marker、Lane 1 : BSA 標準品、  
Lane 2 : NLP-BSA、Lane 3 :  
NNA-BSA。



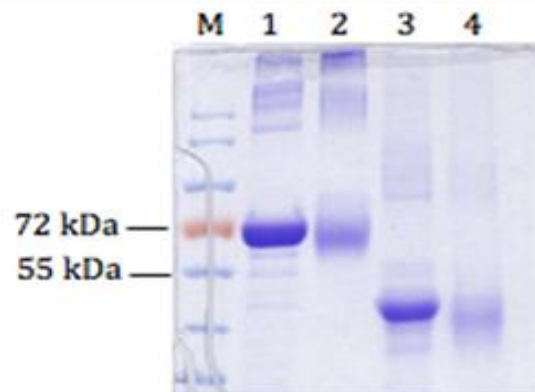
圖三、以直接競爭型 ELISA 測試老鼠產生之辨識 NMU-BSA 的抗體。



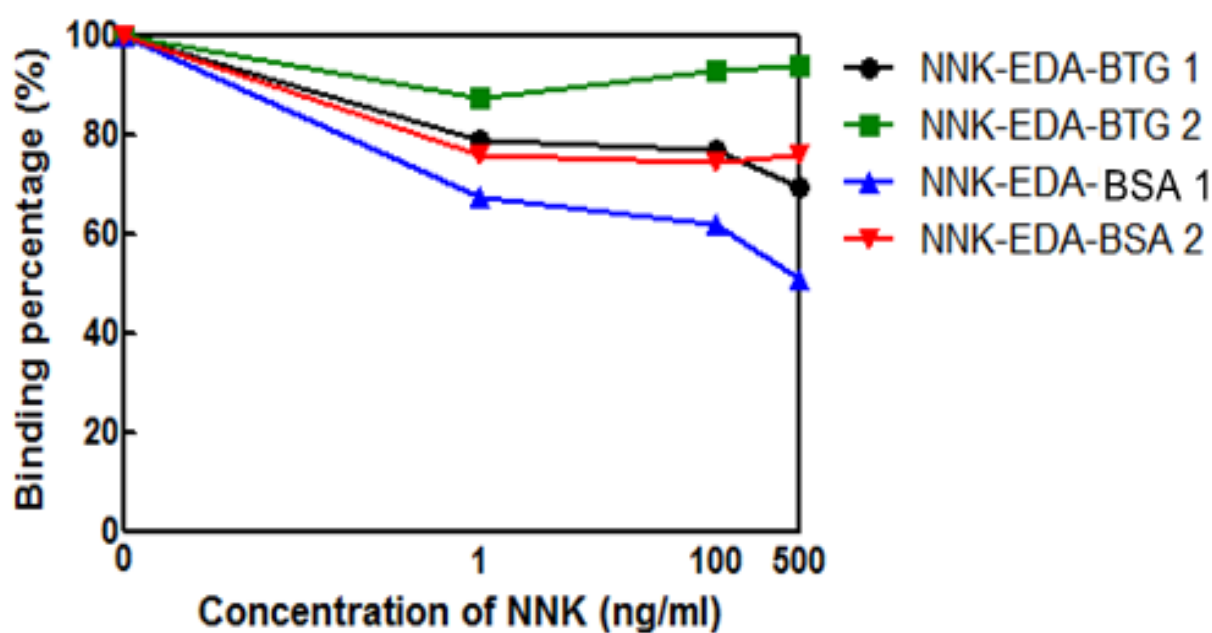
圖四、以非直接競爭型 ELISA 測試老鼠產生之辨識 NLP 之抗體。



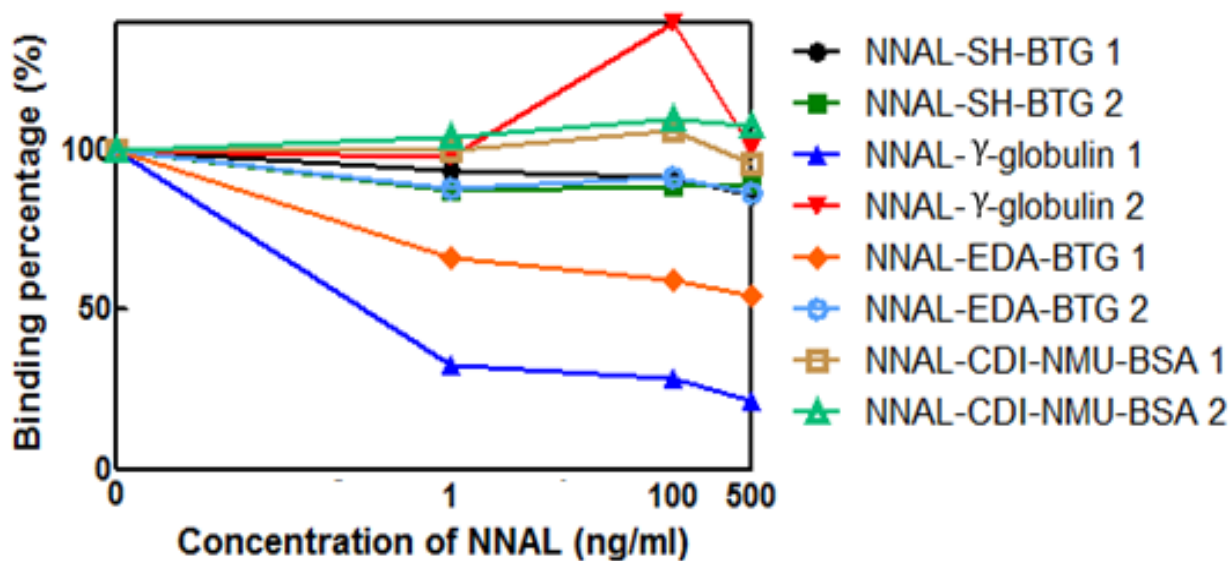
圖五、以 TLC 分析 NNAL-CDI-NMU 接合狀況。



圖六、以 SDS-PAGE 分析抗原製備狀況。  
 M: marker、Lane 1: BSA 標準品、Lane 2: NNAL-CDI-NMU-BSA、Lane 3: OVA 標準品、Lane 4: NNAL-CDI-NMU-OVA。



圖七、以非直接競爭型 ELISA 檢測老鼠產生辨識 NNK 之抗體狀況。



圖八、以非直接競爭型 ELISA 檢測老鼠產生辨識 NNAL 之抗體狀況。

子計畫二	計畫主持人：胡瓊文 教授
運用連線固相萃取-液相層析串聯質譜儀開發食物中亞硝胺快速分析法及國人暴露評估	

## (一) 前言

食物中原本就自然存有微量的 *N*-nitrosamines，但食物中的 *N*-nitrosamines 主要因人為加工而大量產生，例如啤酒、醃漬肉品、起司加工品及魚等[Tricker et al., 1991]。尤其是醃漬或加工肉品，亞硝酸鹽 ( $\text{NO}_2^-$ ) 是肉品醃漬過程中極為重要之鹽漬劑，易與肉品胺基酸形成 *N*-nitrosamines。*N*-nitrosamines 的管制只在部分國家或部分食品有管制，美國將加工肉品中總揮發性 *N*-nitrosamines 限制值設為 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ；中國則限制魚類製品中 NDMA 須低於 7 $\text{g}/\text{kg}$ 。目前台灣尚未訂定食品 *N*-nitrosamines 的管制標準，只有衛生署公告「嬰兒奶嘴之亞硝胺限量標準」為 10 ppb。此外，飲用水中的 *N*-nitrosamines 近年來受到極大的注意，尤其是 NDMA。一般自然界原水中幾乎不含 *N*-nitrosamines，但原水經由消毒後，飲用水中可發現 NDMA 顯著升高，最高可測出 65  $\text{ng}/\text{L}$  (美國飲用水 NDMA 標準為 10  $\text{ng}/\text{L}$ ) [Nawrocki and Andrzejewski, 2011]。飲水在生活中不可或缺且食品製程皆會使用到飲水，飲用水中 *N*-nitrosamines 的暴露貢獻也應考量。

雖然食物中的 *N*-nitrosamines 種類很多，1970 年至今有不少報導食物中 *N*-nitrosamines 濃度的文獻，但常只有 NDMA、NDEA、NPyr 及 NPip 被納入分析，主要的原因是直到現在食品 *N*-nitrosamines 的分析方法依然沒有進步[Crew, 2010]。目前國際上食品中的 *N*-nitrosamines 的分析方法以氣相層析熱能分析儀 (GC-TEA) 及氣相層析質譜儀 (GC-MS) 為主，這些分析方法常遭遇特異性及靈敏度不足、前處理複雜及分析時間過長等問題。

亞硝胺的暴露來源可分為外在暴露及體內生成暴露。外在暴露除了目前已知的食物中 *N*-nitrosamines 外，香菸煙霧、化妝品及職業場所 (如橡膠製程) 等也會帶來外因性 *N*-nitrosamines 暴露。體中內生性 *N*-nitrosamines 暴露係由於人類經由食物及飲用水暴露到硝酸鹽或亞硝酸鹽，它們進入人體後可與體內胺類作用生成 *N*-nitrosamines。因此量測人體內 (如尿液或血液) 的 *N*-nitrosamines，所代表的是外在暴露及體內生成 *N*-nitrosamines 的總合。特別是以非侵入性的方法 (尿液) 評估 *N*-nitrosamines 在體內的劑量，對於 *N*-nitrosamines 的暴露及健康風險評估有很大的幫助。

## (二) 研究目的

本子計畫將運用「連線固相萃取-液相層析串聯質譜儀」開發食物中亞硝胺快速分析法，應用在各式代表性食品的 *N*-nitrosamines 分析，研究結果將可提供相關單位作為管制標準制定的重要參考。同時本研究也將建立一套「on-line SPE LC-MS/MS」分析系統，搭配手動固相萃取 (off-line SPE)，以量測尿液中的亞硝胺。藉由此生物偵測工具可逐年觀察國人體內 *N*-nitrosamines 濃度的改變，作為政府單位在管制食品 *N*-nitrosamines 或其前驅物 (硝酸鹽或亞硝酸鹽) 成效的直接證據。

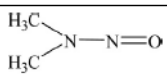
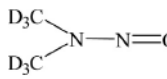
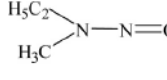
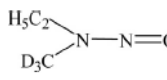
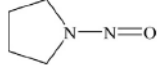
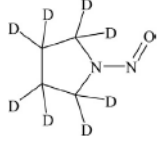
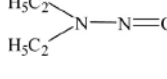
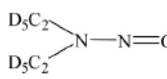
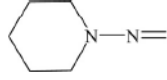
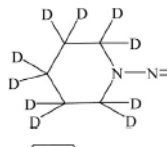
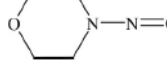
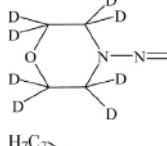
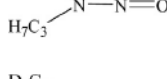
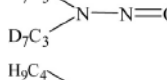
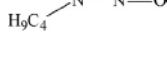


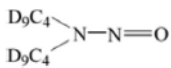
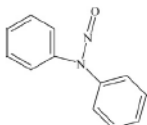
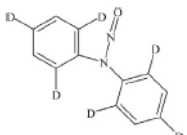
### (三) 研究方法

#### (1) 建立 on-line SPE LC-MS/MS 分析食品 N-nitrosamines:

下表為 9 種亞硝胺在 MS/MS 的最佳化偵測條件。

表一、Tandem mass spectrometry parameters for the nine N-nitrosamines

Compound	Structure	Q1 mass, amu	Q3 mass, amu	DP <sup>b</sup> , V	CE <sup>c</sup> , V	FP <sup>d</sup> , V
NDMA		75	43 <sup>a</sup>	30	23	120
		75	58	30	18	120
NDMA-d6		81	46 <sup>a</sup>	40	25	150
		89	61	30	18	140
NMEA		89	43	30	22	140
		92	64	35	18	160
NMEA-d3		89	43	30	22	140
		92	64	35	18	160
NPYR		101	55	30	23	130
		101	41	30	35	130
NPYR-d8		109	62	40	25	150
		103	75	30	16	140
NDEA		103	47	30	24	140
		113	81	40	18	150
NDEA-d10		113	81	40	18	150
		115	69	30	22	130
NPIP		115	41	30	35	130
		125	78	50	24	190
NPIP-d10		125	78	50	24	190
		117	87	30	17	110
NMOR		117	73	30	20	110
		125	95	45	19	165
NMOR-d8		125	95	45	19	165
		131	89	25	15	120
NDPA		131	43	25	23	120
		145	97	40	17	155
NDPA-d14		145	97	40	17	155
		159	103	30	16	120
NDBA		159	103	30	16	120

Compound	Structure	Q1 mass, amu	Q3 mass, amu	DP <sup>b</sup> , V	CE <sup>c</sup> , V	FP <sup>d</sup> , V
NDBA-d18		159	57	30	22	120
		177	66	45	20	160
NDPhA		199	169	25	17	120
		199	66	25	40	120
NDPhA-d6		205	175	40	19	160

<sup>a</sup> Quantifier transition.

<sup>b</sup> Declustering potential.

<sup>c</sup> Collision energy.

<sup>d</sup> Focusing potential.

由於 9 種亞硝胺在不同的游離源下各自的敏感度不同(如表二)。表三及表四分別為大氣壓力化學離子化法(atmospheric pressure chemical ionisation, APCI)及電灑離子化法(electrospray ionization, ESI)於 on-line SPE LC 的層析條件。NDMA、NMEA、NPyr 及 NMor 在 APCI 下有較佳的敏感度。而 NDPA、NDBA 和 NDPhA 在 ESI 下有較佳的敏感度。NDPhA 因熱不穩定在 APCI 中易裂解難以偵測此外 NDEA 和 NPip 在兩種離子源感度差異不大，但分析中發現 NDEA 和 NPip 在 APCI 離子源下食品基質干擾嚴重，所以 NDEA 和 NPip 未來分析皆在 ESI 離子源下。圖一及圖二分別是 9 種亞硝胺標準品在 APCI 及 ESI 的游離源下的層析圖譜。

表二、9 種亞硝胺在 APCI 與 ESI 離子源下偵測極限 (LOD) 比較

Compound	APCI	ESI
	LOD (ng/mL)	LOD (ng/mL)
<b>NDMA</b>	0.32	6.51
<b>NMEA</b>	0.27	1.36
<b>NPyr</b>	0.41	1.13
<b>NMor</b>	0.02	0.39
<b>NDEA</b>	0.39	0.93
<b>NPip</b>	0.71	0.89
<b>NDPA</b>	0.29	0.17
<b>NDBA</b>	0.13	0.04
<b>NDPhA</b>	ND	0.007

表三、Column-switching programming and the gradients for both online SPE cleanup and LC separation for the APCI source

Time (min)	Eluent I (trap column)		Eluent II(analytical column)		Valve position	Flow rate (mL/min)	Remarks
	Solvent Ia, <sup>a</sup> (%)	Solvent Ib, <sup>b</sup> (%)	Solvent IIa, <sup>c</sup> (%)	Solvent IIb, <sup>d</sup> (%)			
0	100	0	86	14	A	0.2	Injection and washing of sample
1.8	100	0	86	14	B	0.2	Start of elution to the analytical column
2.5	100	0	86	14	B	0.2	
6.0	80	20	12	88	B	0.2	
8.0	80	20	12	88	B	0.2	
9.0	0	100	12	88	A	0.2	End of elution; trap column cleanup and reconditioning
11	0	100	12	88	A	0.2	
13	0	100	0	100	A	0.2	
16	0	100	0	100	A	0.2	
17	100	0	0	100	A	0.2	
20	100	0	0	100	A	0.2	
20.1	100	0	86	14	A	0.2	
22	100	0	86	14	A	0.2	

<sup>a</sup> 5% (v/v) acetonitrile containing 0.1% (v/v) formic acid.

<sup>b</sup> 75% (v/v) acetonitrile containing 0.1% (v/v) formic acid.

<sup>c</sup> 10% (v/v) acetonitrile containing 0.1% (v/v) formic acid.

<sup>d</sup> 80% (v/v) acetonitrile containing 0.1% (v/v) formic acid.

表四、Column-switching programming and the gradients for both online SPE cleanup and LC separation for the ESI source

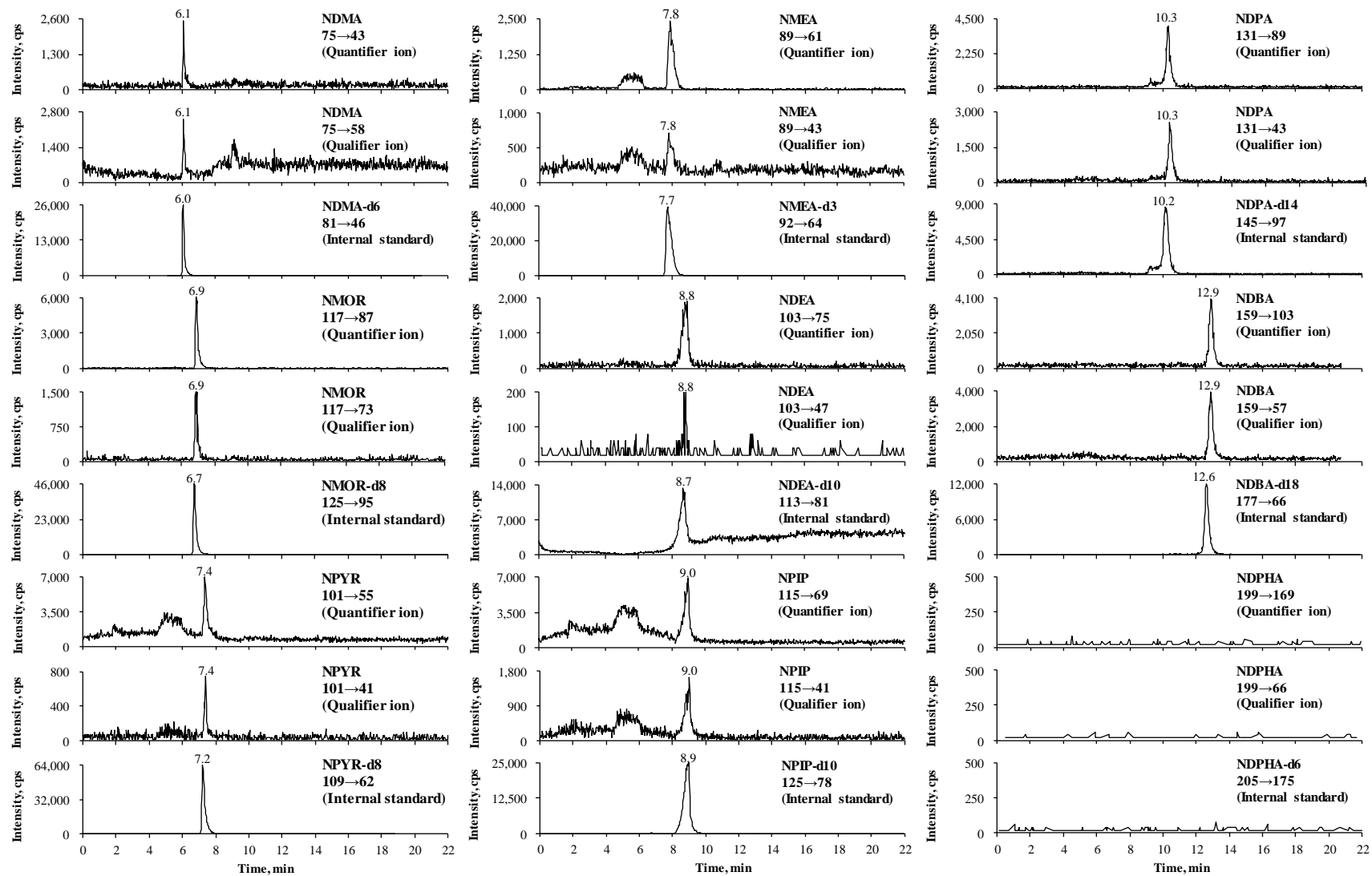
Time (min)	Eluent I (trap column)		Eluent II (analytical column)		Valve position	Flow rate (mL/min)	Remarks
	Solvent Ia, <sup>a</sup> (%)	Solvent Ib, <sup>b</sup> (%)	Solvent IIa, <sup>c</sup> (%)	Solvent IIb, <sup>d</sup> (%)			
0.0	100	0	86	14	A	0.2	Injection and washing of sample
2.1	100	0	86	14	B	0.2	Start of elution to the analytical column
5.0	100	0	86	14	A	0.2	End of elution, continue washing
6.5	80	20	12	88	B	0.2	Start of elution to the analytical column
8.0	80	20	12	88	B	0.2	
12	0	100	12	88	B	0.2	
13	0	100	0	100	A	0.2	End of elution; trap column cleanup and reconditioning
14	0	100	0	100	A	0.2	
16	100	0	0	100	A	0.2	
20	100	0	0	100	A	0.2	
20.1	100	0	86	14	A	0.2	
22	100	0	86	14	A	0.2	

<sup>a</sup> 5% (v/v) methanol containing 1 mM (v/v) ammonium acetate.

<sup>b</sup> 75% (v/v) methanol containing 1 mM (v/v) ammonium acetate.

<sup>c</sup> 10% (v/v) methanol containing 1 mM (v/v) ammonium acetate.

<sup>d</sup> 80% (v/v) methanol containing 1 mM (v/v) ammonium acetate.



圖一、Online SPE LC-APCI-MS/MS chromatograms of nine *N*-nitrosamines and their isotope internal standards from a calibration standard

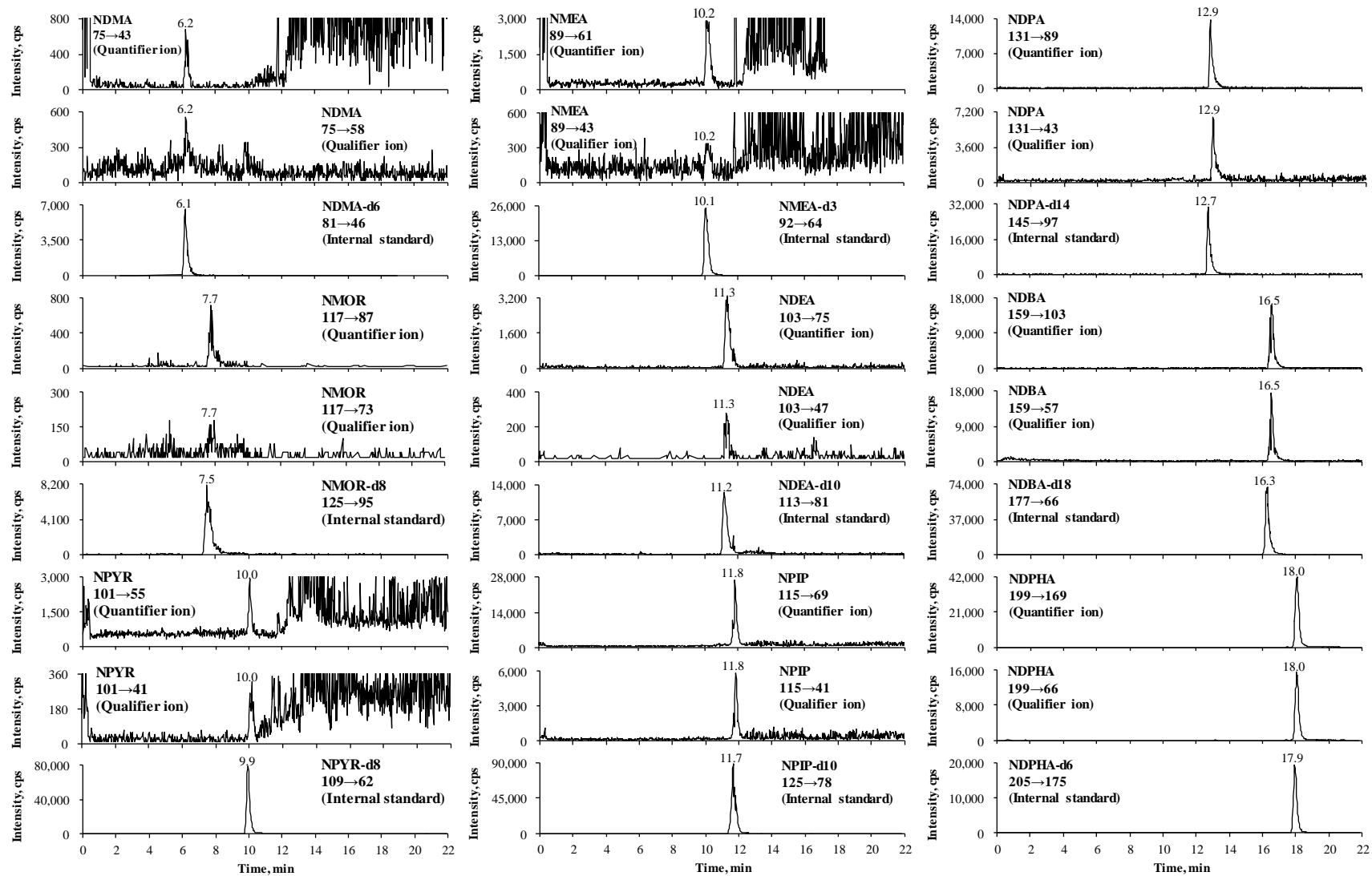
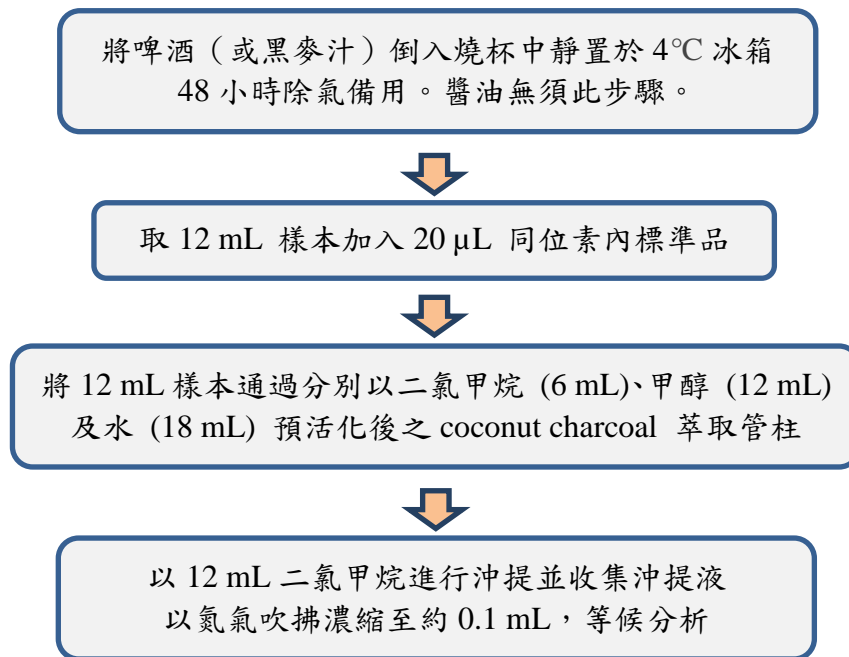


图 11、Online SPE LC-ESI-MS/MS chromatograms of nine *N*-nitrosamines and their isotope internal standards from a calibration standard

## (2) 樣本前處理：

(a) 啤酒/黑麥汁/醬油樣品：啤酒/黑麥汁/醬油皆購自於一般大賣場。我們選擇 15 種品牌市售啤酒，產地分別來自台灣、大陸、其他亞洲及歐洲國家。黑麥汁 5 種品牌產地分別來自台灣及歐洲國家。台灣製造的市售醬油共 4 個品牌包括 2 個純釀造醬油及 2 個化學醬油。如下圖所示，將啤酒（或黑麥汁）倒入燒杯中靜置於 4°C 冰箱 48 小時除氣備用。醬油無須此除氣步驟。啤酒（或黑麥汁/醬油）加入定量的同位素混合內標準品 (NDMA-d<sub>6</sub>, NMEA-d<sub>3</sub>, NPyr-d<sub>8</sub>, NDEA-d<sub>10</sub>, NPip-d<sub>10</sub>, NMor-d<sub>8</sub>, NDPA-d<sub>14</sub>, NDBA-d<sub>18</sub>, NDPhA-d<sub>6</sub>) 後進行手動固相萃取。手動固相萃取是參考美國環保局 (Environmental Protection Agency, EPA 521) 方法。選用 coconut charcoal 萃尿管(2g/6 mL)分別以二氯甲烷、甲醇及水予以活化後，加入啤酒（或黑麥汁/醬油）後，最後以二氯甲烷沖提出，再以氮氣吹拂裝置下濃縮，以備 on-line SPE LC-MS/MS 分析。

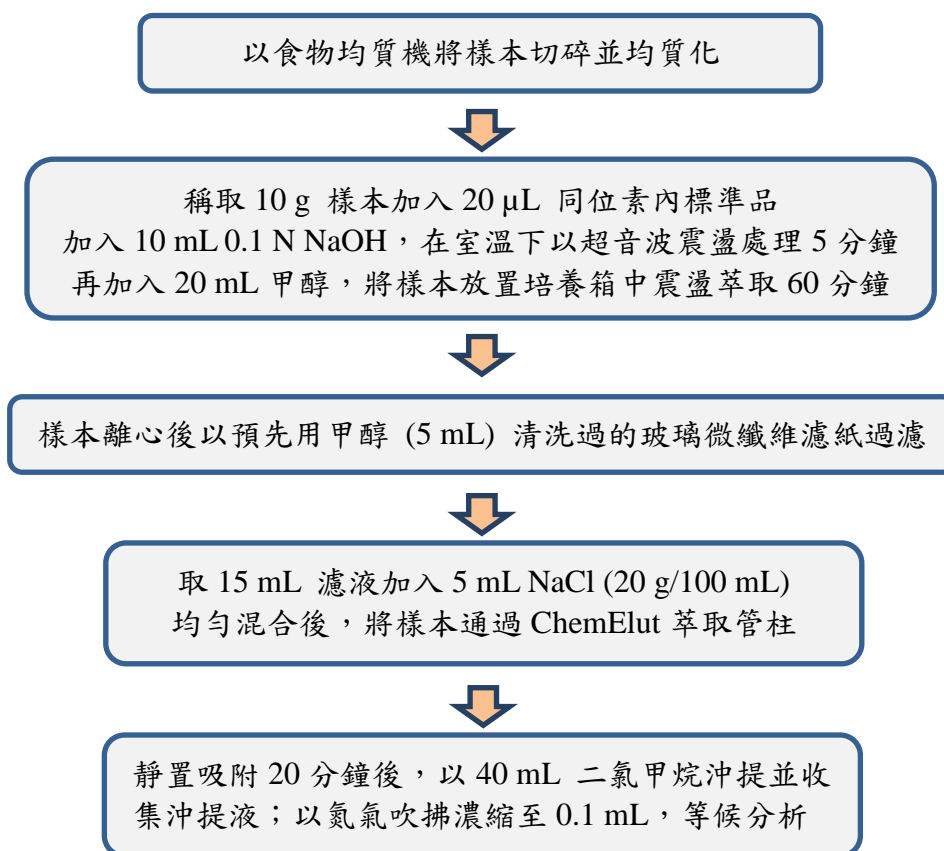


圖三、液態樣本前處理程序

(b) 鼠尿樣品：子計畫二為協助子計畫三「亞硝酸胺前驅物在動物體內反應生成、毒性機制與解毒模式探討」，我們亦利用 on-line SPE LC-MS/MS 搭配 isotope-dilution 方法同時分析鼠尿中 9 種亞硝酸胺。協助子計畫三量測小鼠被施予硝酸鹽類後，體內亞硝酸胺的生成情形。收集鼠尿 6 mL，加入定量的同位素混合內標準品後進行手動固相萃取。萃取處理程序如圖一。

(c) 肉類及魚類製品：樣本前處理方法參考 Sannino and Bolzoni [2013] 進行修改。如下圖四所示，樣本預儲放於 -80°C，取出後在未解凍下均質化後稱取 10 g 樣本，並添加九種同位素內標準品混和液 (NDMA-d<sub>6</sub>, NMEA-d<sub>3</sub>, NPyr-d<sub>8</sub>, NDEA-d<sub>10</sub>, NPip-d<sub>10</sub>, NMor-d<sub>8</sub>, NDPA-d<sub>14</sub>, NDBA-d<sub>18</sub>, NDPhA-d<sub>6</sub>)。加入 0.1 N NaOH 溶液後，以超音波震盪處理 5 分鐘，再加入甲醇溶液，將樣本置入培養箱中搖晃混合 1 小時。萃取液以預先用甲醇清洗過的玻璃微纖維濾紙 (Glass Fiber Filter, 1.0 μm, 47 mm, Type AE, SKC Inc.) 過濾，取 15 mL 濾液加入 5 mL NaCl (20 g/100 mL) 溶液充分混合，以 ChemElut column (20 mL, Agilent technologies Inc.) 進

行吸附萃取，最後使用二氯甲烷沖提待測物，沖提液經氮氣吹拂濃縮，以 on-line SPE LC-MS/MS 進行分析。



圖四、固態樣本前處理程序

#### (四) 結果與討論

(1) **以 on-line SPE LC-MS/MS 搭配同位素稀釋法同時分析啤酒中 9 種亞硝胺：**由於麥芽飲品（如啤酒及黑麥汁）是國人廣泛飲用的飲料而醬油是國人日常生活使用頻率極高的調味品。我們因此選擇啤酒、黑麥汁及醬油作為首要液體食品亞硝胺分析對象。初步檢驗結果發現 15 種市售品牌啤酒皆檢測出 NDMA，其濃度也最高 (0.248-0.559 ng/mL)。檢出率其次為 NDPhA (檢出率:80%; ND-0.026 ng/mL)、NPYR (檢出率:60%; ND-0.263 ng/mL) 及 NDEA (檢出率:53%; ND-0.396 ng/mL)。其他亞硝胺如 NMEA、NPip、NMor、NDPA 及 NDPA 則皆未檢出 (低於 LODs)。9 種亞硝胺檢測結果整理如下表五。圖五為典型的啤酒亞硝胺 on-line SPE LC-MS/MS 層析圖譜檢測出 NDMA 及 NDPhA 為例。

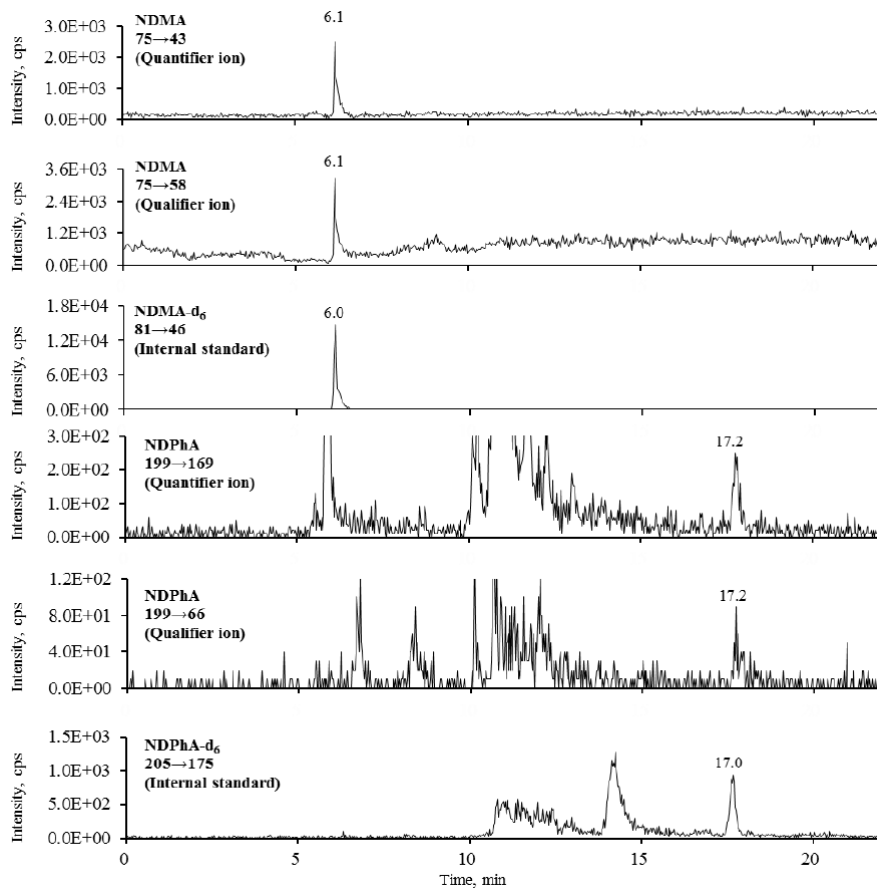
表五、15 種市售啤酒亞硝胺含量 (ng/mL)

Source/Sample		NDMA	NPyr	NDEA	NDPhA
Taiwan	B1	0.364	0.263	0.104	0.006
	B2	0.32	ND	ND	0.006
	B3	0.344	0.094	ND	0.013
China	B4	0.484	ND	0.106	0.006



	B5	0.403	ND	0.103	0.026
	B6	0.248	ND	ND	0.009
	B7	0.419	ND	0.06	ND
Japan	B8	0.409	0.259	0.073	0.011
	B9	0.421	0.216	ND	ND
	B10	0.548	0.155	ND	0.014
Korea	B11	0.3	0.085	0.396	0.011
Malaysia	B12	0.507	ND	0.141	0.01
	B13	0.448	0.23	ND	0.005
Netherlands	B14	0.467	0.162	0.042	0.022
Belgium	B15	0.559	0.195	ND	ND

ND: Not detected



圖五、on-line SPE LC-MS/MS 檢測出啤酒含 NDMA、NDPhA

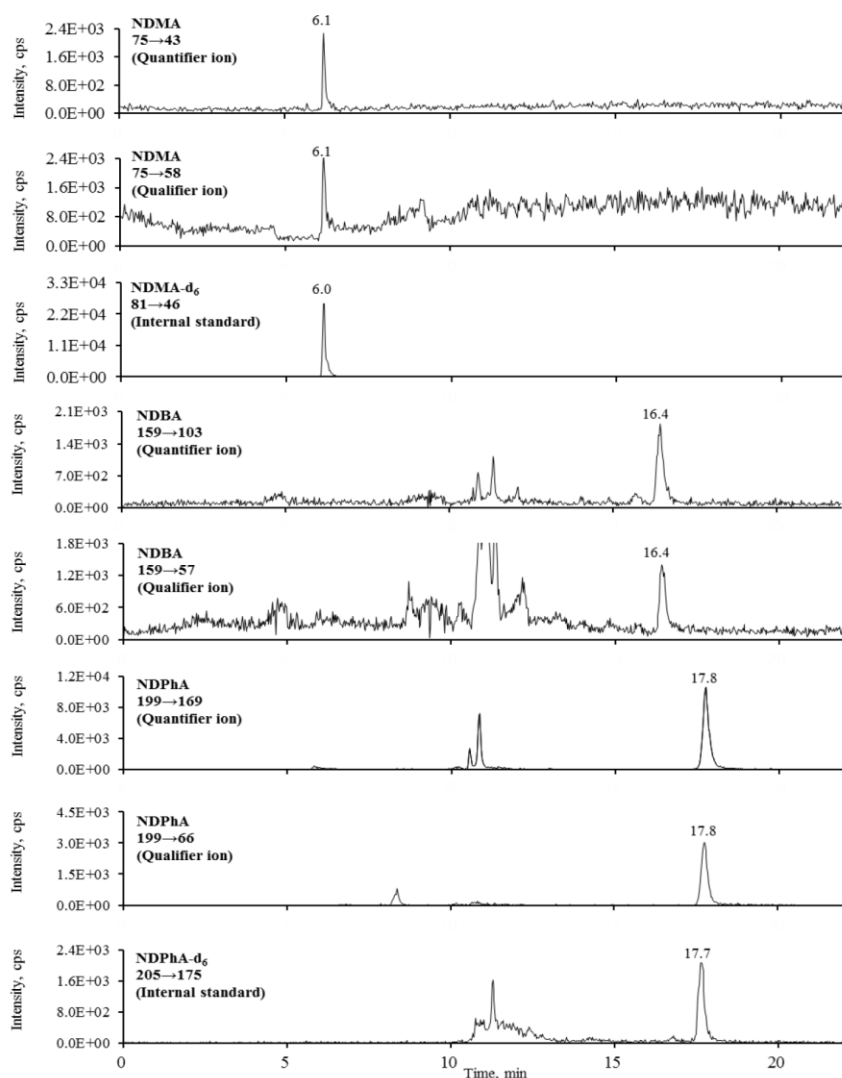
- (2) 以 on-line SPE LC-MS/MS 搭配同位素稀釋法同時分析黑麥汁中 9 種亞硝胺: 5 種市售黑麥汁 9 種亞硝胺檢測結果整理如下表六。檢驗結果發現 5 種市售品牌黑麥汁皆檢測出 NDMA (0.18-0.274 ng/mL)、NDBA (0.013-0.178 ng/mL) 及 NDPhA (0.035-0.358 ng/mL)。

其次為 NMEA 及 NPyr (檢出率:20%)。其他亞硝胺如 NDEA、NPip、NMor 及 NDPA 則皆未檢出。圖六為典型的黑麥汁亞硝胺 on-line SPE LC-MS/MS 層析圖譜檢測出 NDMA、NDBA 及 NDPhA。

表六、5 種市售黑麥汁亞硝胺含量 (ng/mL)

Source/Sample		NDMA	NMEA	NPyr	NDBA	NDPhA
Taiwan	M1	0.18	ND	ND	0.014	0.035
	M2	0.226	ND	ND	0.013	0.039
	M3	0.274	ND	ND	0.026	0.049
Germany	M4	0.195	ND	0.139	0.178	0.358
Netherlands	M5	0.217	0.004	ND	0.028	0.086

ND: Not detected



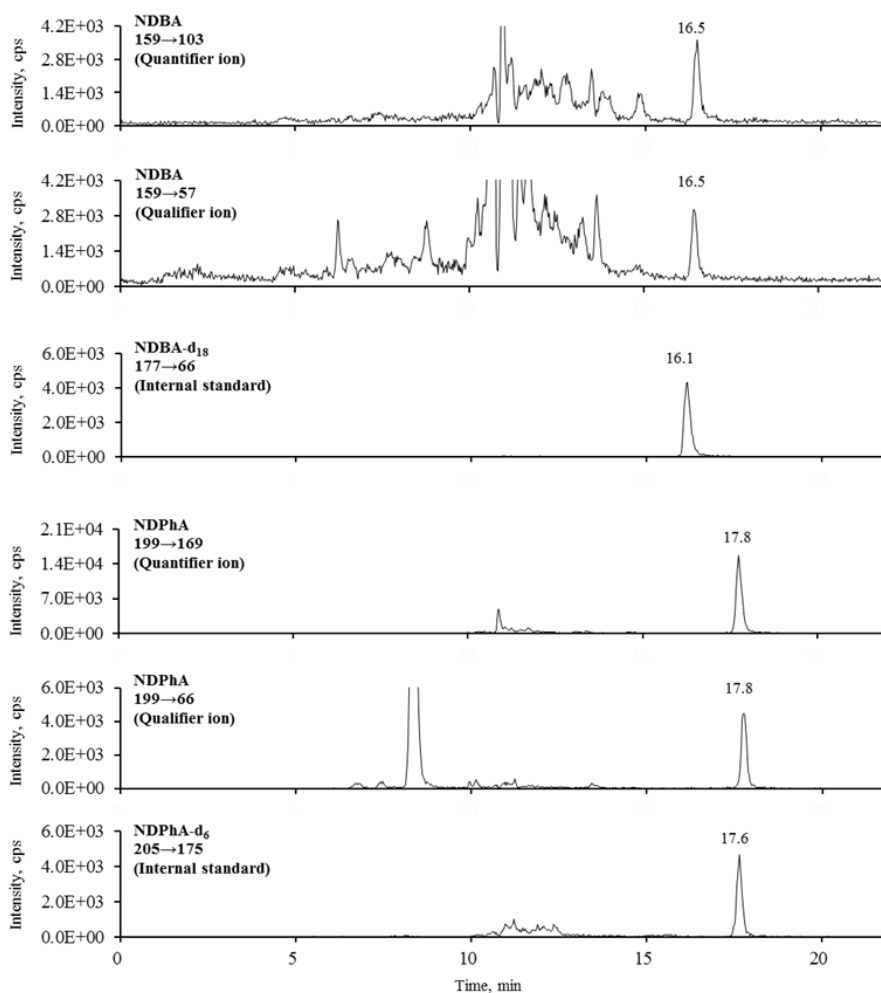
圖六、on-line SPE LC-MS/MS 檢測出黑麥汁含 NDMA、NDBA 及 NDPhA

(3) 以 on-line SPE LC-MS/MS 搭配同位素稀釋法同時分析醬油中 9 種亞硝胺: 4 種市售醬油 9 種亞硝胺檢測結果整理如下表七。不論是純釀造醬油或化學醬油皆無檢測出 NDMA、NPip、NMor 及 NDPA。但所選的市售醬油皆驗出 NDBA (0.01-0.197 ng/mL) 及 NDPhA (0.05-0.222 ng/mL)。圖七為典型純釀造醬油亞硝胺 on-line SPE LC-MS/MS 層析圖譜檢測出 NDBA 及 NDPhA。

表七、市售醬油亞硝胺含量 (ng/mL)

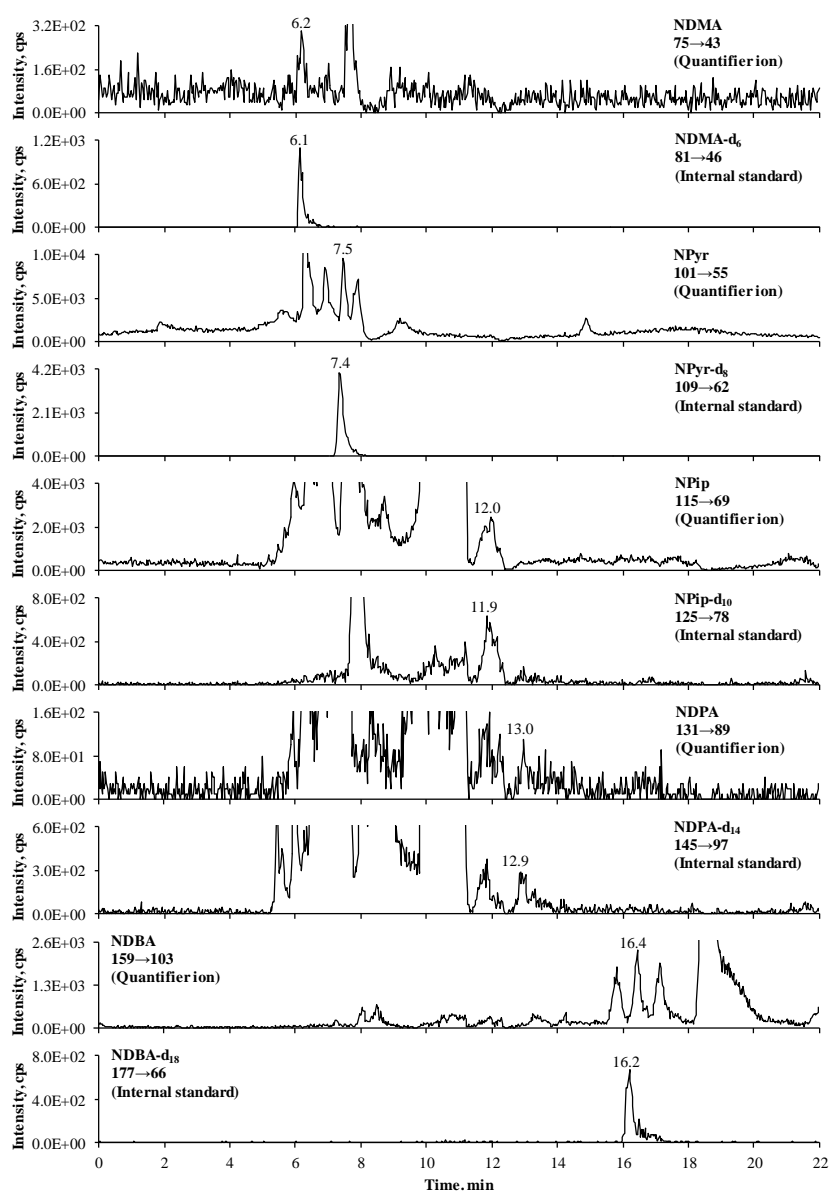
Sample	NMEA	NPyr	NDEA	NDBA	NDPhA
純釀造醬油 S1	0.029	0.512	ND	0.197	0.222
純釀造醬油 S2	ND	ND	0.642	0.072	0.170
化學醬油 S3	0.016	ND	ND	0.010	0.087
化學醬油 S4	ND	0.787	0.192	0.167	0.050

ND: Not detected



圖七、on-line SPE LC-MS/MS 檢測出醬油含 NDBA 及 NDPhA

(4) 以 on-line SPE LC-MS/MS 搭配同位素稀釋法同時分析肉類及魚類製品中 9 種亞硝胺:肉類及魚類熟食製品隨機購自傳統市場、早餐店及超市共 22 個樣本。以圖八為例，火腿經前處理後以 on-line SPE LC-MS/MS 可檢驗出 NDMA, NPyr, NPip, NDPA, NDBA。如表八所示，魚肉類中以 NDMA 及 NDBA 檢出率最高，其次為 NPyr 及 NMor，NPip、NDPA 及 NDPhA 有少數檢出，其他亞硝胺 NDEA 及 NMEA 則皆未檢出。火腿在 9 種亞硝胺的檢出率最高，其中 NPyr 及 NPip 可能來自於辛香料的添加，例如辣椒及胡椒含有 pyrrolidine 及 piperidine 在與肉類中的亞硝酸鹽在加熱過程中反應生成 NPyr 及 NPip (Herrmann et al., 2015)。此外我們以測試試紙檢測發現 22 個樣本中有 4 個樣本 nitrite 超標 (> 70 mg/kg)。



圖八、火腿中 NDMA、NPyr、NPip、NDPA 及 NDBA 層析圖譜

表八、魚肉類製品中亞硝胺分析結果

樣本名稱	來源	濃度 (µg/kg)							亞硝酸鹽超標
		NDMA	NPyr	NMor	NPip	NDPA	NDBA	NDPhA	
香腸 1 (Sausage 1)	×國市場	0.07	ND	ND	ND	ND	2.44	0.06	—
香腸 2 (Sausage 2)	×國市場	ND	ND	ND	ND	ND	1.43	0.09	—
香腸 3 (Sausage 3)	××醫學大學學生餐廳	0.19	ND	ND	ND	ND	1.72	0.02	—
火腿 1 (Ham 1)	×爺早餐店	1.24	1.35	ND	6.03	0.11	1.84	ND	+
火腿 2 (Ham 2)	早餐×	0.25	2.59	0.38	ND	0.15	1.79	ND	+
培根 1 (Bacon 1)	×爺早餐店	0.31	1.12	ND	ND	ND	5.42	ND	+
培根 2 (Bacon 2)	早餐×	0.09	3.80	0.49	ND	ND	3.22	ND	—
臘腸 1 (Pepperoni 1)	×國市場	1.48	ND	ND	ND	ND	2.06	ND	—
臘腸 2 (Pepperoni 2)	×國市場	0.59	ND	ND	ND	ND	2.40	ND	—
熱狗 1 (Hot dog 1)	×爺早餐店	0.50	ND	0.04	ND	ND	1.58	ND	—
熱狗 2 (Hot dog 2)	早餐×	ND	ND	0.06	ND	ND	1.55	ND	+
熱狗 3 (Hot dog 3)	×家便利商店	ND	0.48	0.13	ND	ND	1.25	ND	—
煙燻鮭魚 (Smoked salmon)	×青超市	0.41	ND	ND	ND	0.16	1.70	0.08	—

亞硝酸鹽測試試紙：Medi-Test URYXXON® Stick 10

(+)：高於 TFDA 限制濃度 (70 mg/kg)

(-)：低於 TFDA 限制濃度 (70 mg/kg)

表八續、魚肉類製品中亞硝胺分析結果

樣本名稱	來源	濃度 (µg/kg)						亞硝酸鹽超標
		NDMA	NMor	NPip	NDPA	NDBA	NDPhA	
生豬肉	×國市場	0.32	0.06	1.35	ND	1.72	0.02	—
鯛魚排	裕×屋	0.40	ND	ND	ND	1.33	ND	—
烤秋刀魚	裕×屋	0.25	0.03	ND	ND	1.74	ND	—
燒女子小魚	裕×屋	1.19	ND	ND	ND	1.50	ND	—
草魚乾	×國市場	ND	ND	ND	ND	3.14	ND	—
四破魚乾	裕×屋	0.17	ND	ND	ND	2.14	ND	—
海鰻魚乾	×國市場	ND	ND	ND	ND	2.56	ND	—
沙丁魚	×國市場	0.56	0.02	ND	ND	1.81	ND	—
烏魚子	漁市場	ND	ND	ND	ND	3.47	ND	—

\*亞硝酸鹽測試試紙：Medi-Test URYXXON® Stick 10

(+)：高於TFDA限制濃度 (70 mg/kg)

(-)：低於TFDA限制濃度 (70 mg/kg)

\*ND: Not detected

(5) 以 on-line SPE LC-MS/MS 搭配同位素稀釋法同時分析人體尿液中 9 種亞硝胺:

為了解一般國人尿液中亞硝胺濃度分布情形，我們收集健康成人共 112 人，包含吸菸者 55 人及非吸菸者 57 人。尿液樣本經手動固相萃取純化濃縮後以 on-line SPE LC-MS/MS 分析。結果如下表九所示，9 種亞硝胺以 NDMA 及 NDPhA 檢出率最高(~100%)，其次為 NDEA、NPYR、NDBA 及 NMEA。過去研究從未量測 NDPhA，本研究首次在尿液中檢驗出 NDPhA 且檢出率達 100%。NDPhA 在國際癌症研究署(IARC)被歸類是 group 3 (證據有限無法認定是致癌物)，但在 US EPA 被認定是疑似致癌物(probable human carcinogen) [US EPA, 1986]。本研究 NDPhA 的量測結果值得進一步追蹤。

9 種亞硝胺尿液平均濃度最高的則是 NDMA (0.55-0.58 ng/mL)，其次為 NPYR (0.27-0.3 ng/mL)、NDEA (0.12-0.14 ng/mL)。NMEA、NPIP、NDBA 及 NDPhA 平均濃度皆小於 0.1 ng/mL。先前研究指出菸草及香菸煙流中含有 NDMA、NMEA、NPIP 及 NPYR [Adams et al., 1987]，但我們研究發現吸菸者與非吸菸者尿液中 9 種亞硝胺並無顯著不同。其可能原因是吸入的亞硝胺有高達 30% 會被呼出，而其餘的亞硝胺進入體內後會快速地被代謝。只有非常少的部分會以亞硝胺原態排入尿液 [Streeter et al., 1990]。此外各品牌香菸所含的亞硝胺含量都不同(4.1-31.1 ng/cigarette, Adams et al. 1987)也可能影響結果。本研究成果已發在知名期刊 Journal of Hazardous Materials [Hu et al., 2016]

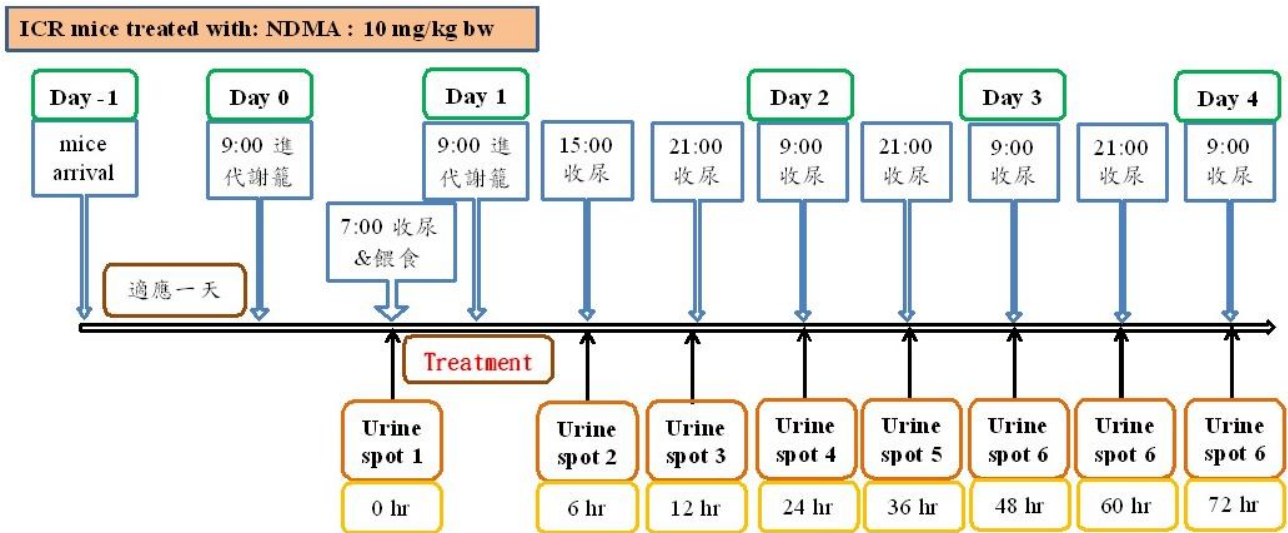
表九、人體尿液中 9 種亞硝胺濃度

	Healthy subjects: smokers (n = 55)		Healthy subjects: non-smokers (n = 57)	
	Mean ± SD	Range	Mean ± SD	Range
Age (yr)	36 ± 13	21-81	46 ± 19	21-83
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23.4 ± 3.5	17.8-33.8	23.2 ± 3.1	17.3-30.1
Cotinine (ng/mL)	1540 ± 1312	116-6091	ND	ND
NDMA (ng/mL)	0.55 ± 0.50	ND-2.97 (54/55) <sup>a</sup>	0.58 ± 0.39	0.06-1.9 (57/57)
NMEA (ng/mL)	0.09 ± 0.08	ND-0.23 (9/55)	0.09 ± 0.07	ND-0.18 (7/57)
NPYR (ng/mL)	0.30 ± 0.28	ND-1.92 (44/55)	0.27 ± 0.36	ND-2.0 (26/57)
NDEA (ng/mL)	0.12 ± 0.06	ND-0.25 (47/55)	0.14 ± 0.09	ND-0.42 (42/57)
NPIP (ng/mL)	0.02 ± 0.01	ND-0.03 (3/55)	0.03 ± 0.01	ND-0.05 (9/57)
NMOR (ng/mL)	ND	ND (0/55)	0.02 ± 0.00	ND-0.02 (2/57)
NDPA (ng/mL)	ND	ND (0/55)	ND	ND (0/57)
NDBA (ng/mL)	0.03 ± 0.02	ND-0.06 (10/55)	0.03 ± 0.02	ND-0.08 (22/57)
NDPhA (ng/mL)	0.03 ± 0.04	0.001-0.20 (55/55)	0.04 ± 0.06	ND-0.28 (55/57)

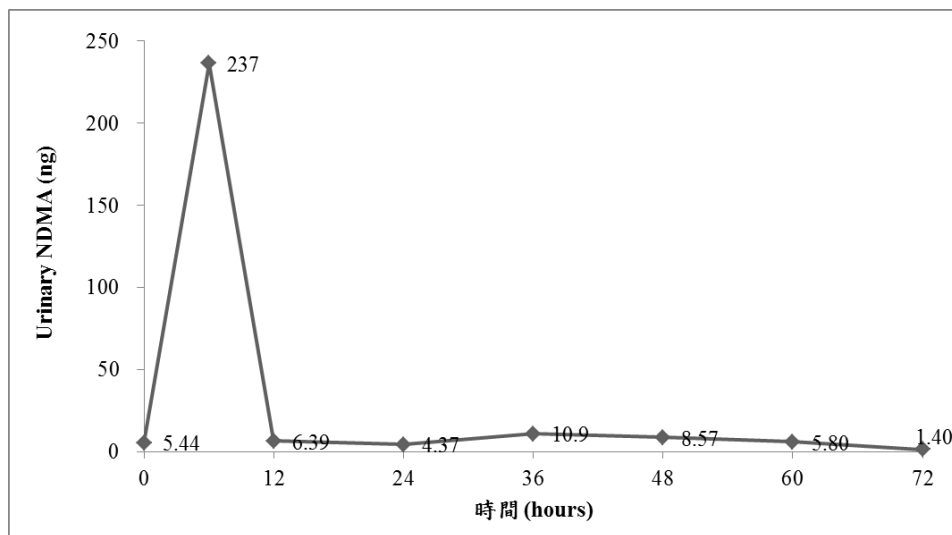
ND, not detectable; NM, not measured. <sup>a</sup>Numbers of samples with detectable concentrations.

(6) 探討小鼠口服暴露亞硝胺後經尿液的排出量:

為了探討食入暴露亞硝胺後在尿液中的排出量，我們將 ICR 品系雄性小鼠施予 10 mg/kg bw 的 NDMA 劑量，並收集 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60 及 72 小時的尿液(下圖九)。以 on-line SPE LC-MS/MS 分析尿液中 NDMA，可發現暴露 NDMA 的 6 小時內就完全排出體外(下圖十)。與原始的 NDMA 餵食劑量比較，尿液中的 NDMA 排出量僅占 0.02%；亦即絕大部分 (99.98%) 的 NDMA 在體內被代謝或以其他途徑排出體外。



圖九、小鼠餵食 NDMA 後於不同時間點收集尿液(n=4)

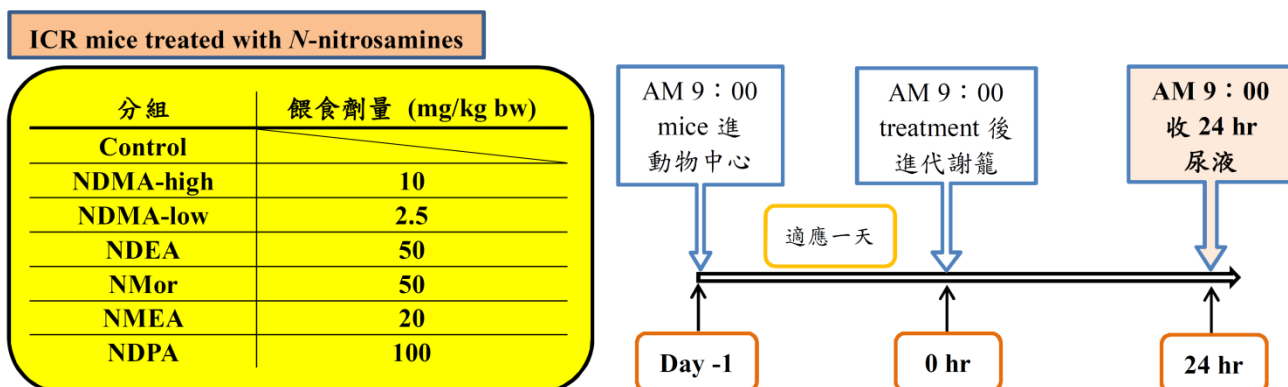


圖十、小鼠餵食 NDMA 後在不同時間點尿液中的 NDMA 排出量變化

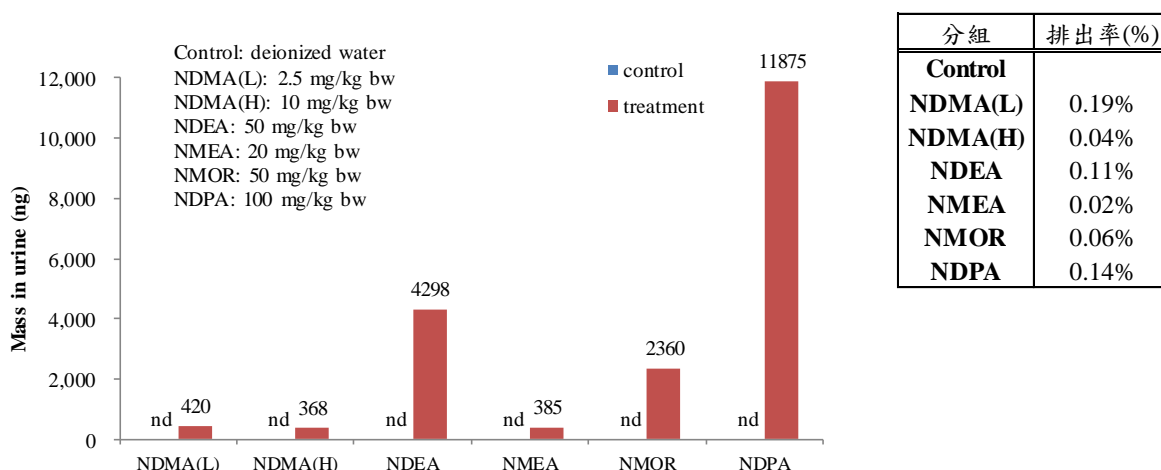
接著本研究進一步將 ICR 小鼠施予各種不同的亞硝胺，以觀察尿液中的亞硝胺排出量佔餵食劑量的比例。如下圖十所示，我們將小鼠餵食 NDMA 高低劑量、NDEA、NMor、NMEA 及 NDPA 並於 24 小時後收集尿液以 on-line SPE LC-MS/MS 分析。結果顯示餵食各種亞硝胺後，24 小時的尿液中可測出相對應的亞硝胺，如下圖十一所示。與原始各種



亞硝胺餵食劑量比較，尿液中的亞硝胺排出量僅占 0.19~0.02%；亦即絕大部分(99.8% 以上)的亞硝胺在體內被代謝或以其他途徑排出體外。



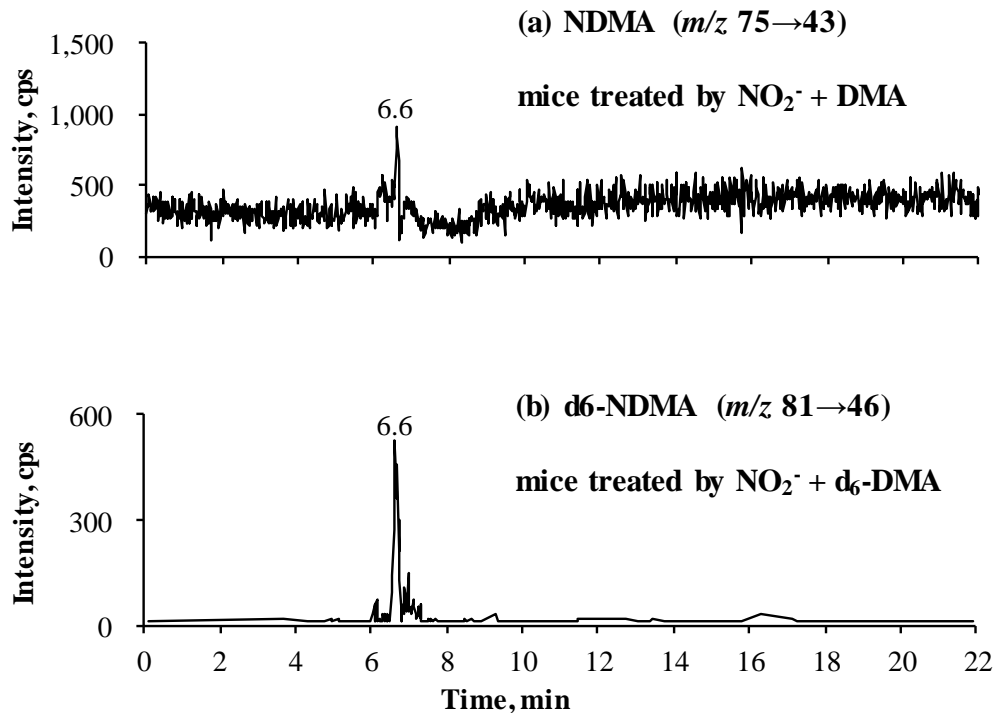
圖十、小鼠餵食各種亞硝胺後收集 24 小時尿液(n=3)



圖十一、小鼠餵食亞硝胺 24 小時內經尿液排出亞硝胺量

(7) 探討小鼠口服暴露亞硝酸鹽及二甲胺後尿液中 NDMA 的排出量:

為了探討食入暴露 NDMA 的前驅物亞硝酸鹽及二甲胺後在尿液中的排出量，我們將 ICR 小鼠施予 100 mg/kg bw  $\text{NO}_2^-$  + 200 mg/kg bw DMA (或 同位素  $\text{d}_6$ -DMA)，並收集 24 小時的尿液。以 on-line SPE LC-MS/MS 分析尿液中 NDMA (或  $\text{d}_6$ -NDMA)，可發現暴露  $\text{NO}_2^-$  + DMA (或  $\text{d}_6$ -DMA) 後，確實可在尿液中檢出增高的 NDMA (或  $\text{d}_6$ -NDMA) (下圖十二)。這證實了食入暴露 NDMA 的前驅物亞硝酸鹽及二甲胺將會在體內生成 NDMA，並可由尿液檢出。



圖十二、小鼠餵食  $\text{NO}_2^-$  加上 (a) DMA 或 (b)  $\text{d}_6$ -DMA 後，  
在尿液中可量測到 (a) NDMA (10.4 ng) 或 (b)  $\text{d}_6$ -NDMA (12.5 ng)

#### (五) 參考文獻

- Adams JD, O'Mara-Adams KJ, Hoffmann D. Toxic and carcinogenic agents in undiluted mainstream smoke and sidestream smoke of different types of cigarettes, *Carcinogenesis* 1987. 8:729-731.
- Crews C. The determination of *N*-nitrosamines in food. *Qual Assur Saf Crop Foods*. 2010. 2:2-12.
- Herrmann SS, Granby K, Duedahl-Olesen L. Formation and mitigation of *N*-nitrosamines in nitrite preserved cooked sausages. *Food Chem*. 2015. 174:516-526.
- Hu CW, Shih YM, Liu HH, Chiang YC, Chen CM, Chao MR. Elevated urinary levels of carcinogenic *N*-nitrosamines in patients with urinary tract infections measured by isotope dilution online SPE LC-MS/MS. *J. Hazard. Mater*. 2016. 310:207-216.
- Nawrocki J, Andrzejewski P. Nitrosamines and water. *J Hazard Mater*. 2011. 189:1-18.
- Sannino A, Bolzoni L. GC/CI-MS/MS method for the identification and quantification of volatile *N*-nitrosamines in meat products. *Food Chem*. 2013. 141:3925-3930.
- Streeter AJ, Nims RW, Wu PP, Logsdon DL. Toxicokinetics of *N*-nitrosodimethylamine in the Syrian golden hamster, *Arch. Toxicol*. 1990. 64:562-566.
- Tricker AR, Pfundstein B, Theobald E, Preussmann R, Spiegelhalter B. Mean daily intake of volatile *N*-nitrosamines from foods and beverages in West Germany in 1989-1990. *Food Chem Toxicol*. 1991. 29:729-732.
- US EPA, Integrated Risk Information System.  
[http://cfpub.epa.gov/ncea/iris/index.cfm?fuseaction=iris.showQuickView&substance\\_nmbr=0178](http://cfpub.epa.gov/ncea/iris/index.cfm?fuseaction=iris.showQuickView&substance_nmbr=0178). 1986.

## (六) 成果自評

我們成功建立 on-line SPE LC-MS/MS 方法搭配同位素稀釋法及手動固相萃取分析各類飲食品中亞硝胺。液體飲食品包括啤酒、黑麥汁及醬油。結果發現麥類飲料大都皆檢測出 NDMA 及 NDPhA 而醬油則檢出 NDBA 及 NDPhA。針對固體食品，我們成功建立固體食品前處理程序並完成 22 個魚肉類樣本檢測。結果發現魚肉類可檢出 NDMA、NDBA、NPyr、NMor、NPip、NDPA 及 NDPhA。本研究結果為國內第一個食品中亞硝胺含量的參考數據。此外我們也成功利用 on-line SPE LC-MS/MS 方法分析小鼠尿液中的亞硝胺，與子計畫三合作探討亞硝胺或其前驅物在動物體內反應生成機制。我們亦成功利用 on-line SPE LC-MS/MS 方法分析 112 位健康人體尿液中的亞硝胺，研究結果可作為國人尿液中亞硝胺含量的背景值參考數據，成果已發在知名期刊 Journal of Hazardous Materials (Impact factor = 4.836)。

子計畫三	計畫主持人：巖正傑 教授
亞硝胺前驅物在動物體內反應生成、毒性機制與解毒模式之探討	

### (一)前言

亞硝胺化合物常見於食品、藥物、香菸及職業暴露形成外源性來源，而其前驅物如硝酸鹽、亞硝酸鹽以及二級胺亦是廣布於各種環境中並在體內特定環境條件下（胃及大腸為主要區域）形成內生性亞硝胺而增加致癌之風險[Choi et al., 2002]。除了食物及環境來源（外源性亞硝胺）外，人體內亦會合成亞硝胺，目前有證據顯示，內生性之亞硝胺為人體接觸之最大量者且飲食型態左右了內生性亞硝胺之形式與生成量，也決定其在人體內之毒性與影響力。大腸內含有豐富之蛋白質代謝之含氮化合物及硝化試劑如硝酸鹽等，而腸內菌藉由亞硝酸鹽及硝酸鹽還原酶之作用而在此消化過程中扮演重要角色[Hughes et al., 2001]，並在致癌作用機制中占有重要地位，因為許多亞硝基化合物（*N*-nitroso compounds, NOC）已被辨識出來（ex. nitrosamines, nitrosamides, nitrosoguanidines等），部份亞硝基化合物會在細胞內扮演烷基化試劑攻擊DNA造成GC→AT轉換[Bos,1989]。此外，內生性亞硝胺亦可經由口腔內菌叢將硝酸鹽還原成亞硝酸鹽並經由消化道上端吸收進入血液循環或代謝成亞硝胺化合物[IARC,2006]。除了加工肉品外，飲食中亞硝酸鹽亦可來自穀類製品及部分蔬菜，尤其是葉菜類[IARC,2006]。

流行病學及實驗數據顯示亞硝胺化合物會誘發體內自由基傷害，例如在動物肝臟誘發活性氧化物（ROS）及脂質過氧化作用，造成氧化性壓力及抗氧化機制之傷害[Hassan et al.,2010]。而其他環境毒物之暴露、不良飲食習慣、過量使用藥物等會增加肝臟之負擔，加強亞硝胺之肝毒性[Stanca et al., 2008]。然而，亞硝酸鹽在體內除了進行亞硝化反應形成亞硝胺類化合物外，目前亦有研究探討亞硝酸鹽或硝酸鹽對心血管疾病、血流量與血壓之影響，在哺乳類動物可以將亞硝酸鹽行還原反應而形成NO，對血管舒張、增加血流量及降低血壓、減少心血管疾病之傷害等有正面之意義[Rifkind et al., 2007]，故亞硝酸鹽或硝酸鹽對健康之影響是多層面且有不同之角色與意義，而其原因應該與暴露時間與濃度、模式不同而有差異。此外，根據Chen等人(2015)的研究，C57BL/6J小鼠在每天空腹用胃管餵食亞硝酸鹽60mg/Kg體重或120mg/Kg體重達3個月後，觀察其學習與記憶功能之變化。利用水迷宮試驗模式，經過適當測試次數(天數)後讓小鼠建立學習-記憶行為後，發現未餵食亞硝酸鹽之小鼠完成迷宮測試找到平台之時間逐次縮短，相對而言餵食亞硝酸鹽之小鼠表現較差且與劑量成相關性。此外，動物的學習與記憶功能和腦部大腦皮質及海馬迴有重要關係，而這二個區域的軸突蛋白激酶如p-CaMKII(calmodulin-dependent protein kinase)與神經傳遞物是組成養分及代謝物輸送通道的蛋白並且在緊鄰相接之各神經元間傳遞訊息及資訊交換扮演重要角色，也和學習與記憶功能有關(Yang et al., 2105)。

## (二) 研究目的

飲食中之亞硝胺及亞硝胺前驅物對體內亞硝胺生成代謝及對健康 (DNA傷害及致癌風險等) 影響之劑量與效應關係仍無法有較確切之研究數據, 依據多年來對亞硝胺在人或動物體內生成代謝之研究, 仍然無法將飲食成分內容、內生性亞硝胺以及DNA傷害之形成與預防等作清楚而徹底之探討[Holtrop et al., 2012], 而亞硝酸鹽或硝酸鹽在體內之轉換也是觀察目標之一。此外, 飲食中補充亞硝酸鹽或硝酸鹽對心血管疾病、血流量與血壓之影響, 在哺乳類動物可以將亞硝酸鹽行還原反應而形成NO, 對血管舒張、增加血流量及降低血壓、減少心血管疾病之傷害等有正面之意義[Rifkind et al., 2007]。飲食或額外補充增加之亞硝胺及亞硝胺前驅物對健康影響之評估指標以及餵食硝酸鹽或亞硝酸鹽達300天後, 觀察其學習與記憶功能之變化。

## (三) 研究方法

### 短期毒性與健康影響探討:

1. 以定量未標定或<sup>15</sup>N標定之亞硝酸鹽/硝酸鹽溶液每天用胃管餵食, 建立小鼠28天亞急毒性 (未標定) 或7天 (<sup>15</sup>N標定) 短期動物試驗模式。
2. 每週定期收集尿液樣品, 測定尿液 N-nitrosamines之組成及濃度。
3. 28天後小鼠犧牲, 取器官、血液及尿液樣品, 測試肝、腎功能, 病理切片, 自由基與抗氧化功能。

本研究使用由國科會委託之樂斯科生技公司所提供之6週大ICR品系雄性小鼠, 各組10-15隻老鼠。動物實驗部份已經由中山醫學大學動物實驗委員會審核通過並准予執行。以胃管依實驗設計每天定量餵食硝酸鹽或亞硝酸鹽, 並記錄觀察試驗動物的臨床症狀與體重與食物消耗量之變化。28天餵食期間定期收取尿液並於結束時犧牲老鼠取得血液與器官樣品, 進行各項分析與測試。

4. 亞硝酸鹽或硝酸鹽對心跳速率、血壓改變之短期作用: 以腹腔注射方式給予麻醉小鼠亞硝酸鹽/硝酸鹽溶液, 並連接心電圖與血壓感測器, 收集心電圖(ECG)、心跳速率(HR)、收縮壓(SBP)、平均血壓(MBP)及舒張壓(DBP)等。

### 長期毒性與健康或學習與記憶行為影響探討:

1. 以定量未標定之亞硝酸鹽/硝酸鹽溶液每天餵食, 建立小鼠360天慢毒性 (未標定) 動物試驗模式, 或<sup>15</sup>N標定之亞硝酸鹽/硝酸鹽溶液單次用胃管餵食後連續收集尿液3天以評估亞硝酸鹽或硝酸鹽在體內之轉換。
2. 360天慢毒性測試: 國科會委託之樂斯科生技公司所提供之6週大ICR品系雄性小鼠, 各組10隻老鼠。動物實驗部份已經由中山醫學大學動物實驗委員會審核通過並准予執行。50隻ICR小鼠隨機分為控制組, NO<sub>3</sub> 45mg/30gBW(1500mg/Kg BW), NO<sub>3</sub> 22.5mg/30gBW(750mg/Kg BW), NO<sub>2</sub> 2mg/30gBW(66.7mg/Kg BW)及1mg/30gBW (33.3mg/Kg BW)共5組, 每組10隻, 飼料及飲水採足量供應。
3. 研究硝酸鹽對小鼠學習及記憶行為之影響, 經由飲水餵食硝酸鹽/亞硝酸鹽小鼠 300 天後, 利用 5 爪迷宮測試其學習與記憶功能。至 360 天測試結束後將小鼠犧牲, 取器官、血液及尿液樣品, 測試肝、腎功能, 腦部組織特定蛋白質表現與病理切片。
4. 動物學習與記憶功能評估

經 300 天硝酸鹽/亞硝酸鹽餵食之小鼠，置入 5 爪迷宮中接受尋找飼料訓練。流程為訓練前一天飼料減半供應，訓練當天將飼料置放在迷宮中特定位置，讓小鼠尋找，若經過 90 秒仍未找到，用人為引導方式讓小鼠接觸飼料，如此重複訓練 3 天後，即進行第一次正式測試。之後每周維持訓練一次，並在第 330 及 360 天經過一次練習後，在隔天即進行正式測試。

#### 5. 動物學習與記憶功能與腦組織中特定蛋白質表現之相關性

如前所述，大腦皮質及海馬迴組織中之 PCaMK II 及 connexin36 蛋白質和學習與記憶功能有關。研究取餵食一年硝酸鹽/亞硝酸鹽飲水之小鼠的腦部大腦皮質及海馬迴組織，將腦部組織加入適量的細胞溶解液 (RIPA lysis buffer: 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 % NP-40, 0.25 % Na-deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml pepstatin, 1 mM Na-orthovanadate, 1 mM NaF)，利用研磨器在冰上研磨後作用 30 分鐘，再以 14000 ×g 離心 10 分鐘，收集上清液，利用 Bradford assay 進行蛋白質含量的分析。之後利用 10% 的 SDS-PAGE 將蛋白質依分子量大小分開，再將 SDS-PAGE 上之蛋白質轉移至已用丙酮活化之 PVDF 膜上，先利用 blocking buffer (Visual Protein, Taipei, Taiwan) 進行 blocking 1 小時後，再分別與 connexin 36 和 p-CaMKII (1:100, Santa Cruz, Dallas, TX, USA)，以及  $\beta$ -actin (1:8000, Novus, Littleton, CO, USA) 之初級抗體，在 4°C 的環境之下培養隔夜。再將膜用 TBST (20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 135 mM NaCl; 0.1 % Tween 20) 清洗 3 次，繼與第二抗體 anti-rabbit IgG 或是 anti-mouse IgG (1:10000, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) 一起培養 1 小時，再以 TBST 清洗 3 次之後，以 enhanced chemiluminescence detection (ECL, PerkinElmer, Waltham, MA, USA) 偵測蛋白，並以冷光螢光數位影像分析系統 (ImageQuant LAS 4000, GE, Pittsburgh, PA, USA) 記錄與定量。

#### 亞硝酸體外合成試驗作為亞硝酸胺生成抑制劑篩選模式：

研究分別以 ICR 小鼠進行 28 天及 1 年之硝酸鹽餵食，在 28 天測試中，受測小鼠不論在飲食、體重、血液及尿液生化值及組織切片等，皆未觀察到與硝酸鹽/亞硝酸鹽直接有關之毒性作用，而藉由尿液分析  $^{15}\text{N}$  標示之亞硝酸胺濃度及硝酸鹽濃度變化，觀察到經口餵食之硝酸鹽/亞硝酸鹽在體內半衰期短，大部分皆在 24 小時排出體外。另一方面，長達 1 年的硝酸鹽/亞硝酸鹽餵食試驗，觀察到胃部組織有產生病變，且和高劑量之硝酸鹽餵食較有關係，亞硝酸鹽之給予，則未見到病變產生，其嚴重程度不如高劑量之硝酸鹽。此結果驗證胃是硝酸鹽/亞硝酸鹽的重要標的器官，且和硝酸鹽在體內可轉換成亞硝酸鹽的機制可能有關。

由於相關毒性作用皆屬長期且不易由日常觀察或測試發現(如本實驗所觀察之長期餵食的胃部病變，學習與記憶變差等)，故研究參考 Combet 等人(2007)所建立之 gastro-oesophageal-junction(GOJ)體外反應模式，模擬胃和食道的生理條件，觀察亞硝酸鹽和二級胺在此反應系統內生成亞硝酸胺之作用並藉由添加不同之抑制劑探討其保護效果。

表一、gastro-oesophageal-junction(GOJ)體外反應模式試劑組成

水相 7.5ml	(ml)
組別	
ddH <sub>2</sub> O	2.7
0.1M HCl (原液0.2M)	3.75
二甲胺 5mM (原液50mM)	0.75
EDTA 1mM (原液100mM)	0.075
NaSCN 1mM (原液100mM)	0.075
其他抗氧化劑 2mM (原液100mM)	0.15
NO <sub>2</sub> 1mM (原液NaNO <sub>2</sub> 100mM)	0.075

#### (四) 結果與討論

##### 短期毒性與健康影響探討:

##### (1) 劑量選擇：

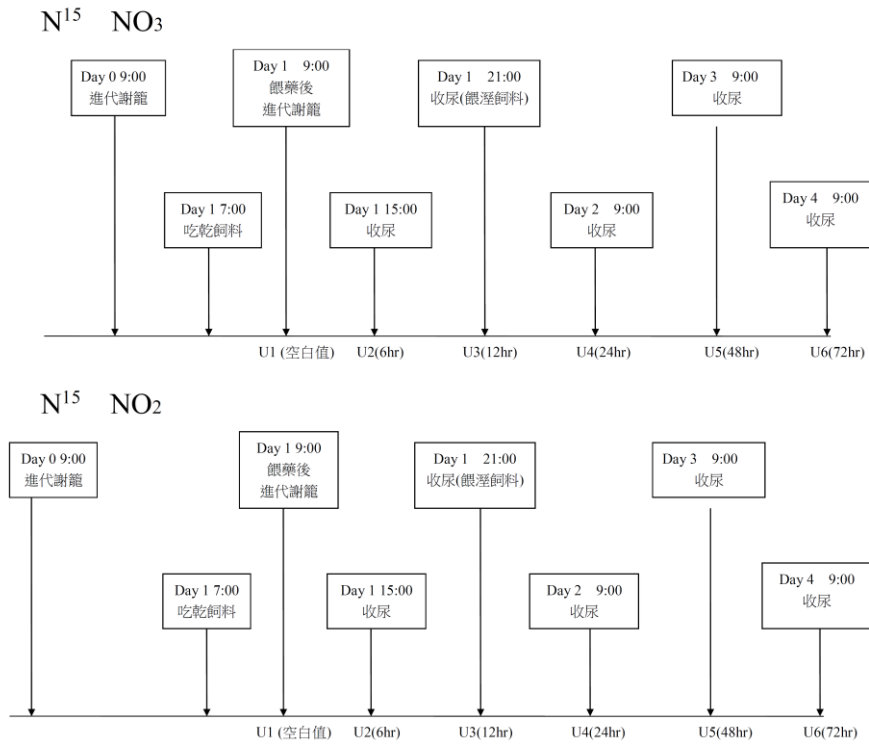
餵食動物之硝酸鹽或亞硝酸鹽劑量分別測試 50-250 mg/kg BW，結果顯示亞硝酸鹽劑量在 250 mg/kg BW 時死亡率達 70% 且皆在餵食後數小時內死亡，解剖後未發現器官損傷。150 mg/kg BW 時在 5 天內死亡率達 28%，解剖後亦未發現器官損傷。硝酸鹽劑量在 250 mg/kg BW 時未有動物死亡，故 28 天餵食之亞硝酸鹽劑量為 50 及 100 mg/kg BW，而硝酸鹽劑量為 100 及 250 mg/kg BW。

##### (2) 硝酸鹽在尿液物種濃度測試：

A. 連續餵食模式: 以 <sup>15</sup>N 標定之硝酸鈉溶液以 250 mg/kg BW 餵食小鼠 7 天，並於最後一天開始收集尿液，結果只有在第一天之尿液中分別出現 <sup>15</sup>N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 33368 ng/mg creatinine 以及 <sup>15</sup>N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 69.5 ng/mg creatinine (委託總計劃分析) 顯示硝酸鹽在體內易於轉變成其他物質 (包括亞硝酸鹽) 且半衰期短，在餵完 24 小時後即無法由尿液中檢出 <sup>15</sup>N 標示之硝酸鹽或亞硝酸鹽，進一步計算 <sup>15</sup>N 標示亞硝酸鹽莫耳濃度約佔硝酸鹽莫耳濃度之 0.38% 與 Miller 等人 (2012) 研究之人類攝取高硝酸鹽飲食 (1.9-6.5 mg/kg BW) 較正常飲食者 (0.5 mg/kg BW) 24 小時內平均血中亞硝酸鹽濃度比例增加 0.07-0.42% 之趨勢相近。

B. <sup>15</sup>N 標定之亞硝酸鹽/硝酸鹽在體內之轉換: 以 <sup>15</sup>N 標定之硝酸鈉或亞硝酸鈉溶液分別以 50 及 250 mg/kg BW (<sup>15</sup>N 標定硝酸鈉溶液) 及 10、50 和 100 mg/kg BW (<sup>15</sup>N 標定亞硝酸鈉溶液) 單次餵食小鼠，並於給藥前一天開始收集尿液並持續定時收集 3 天內尿液 (圖一)。

短時間單次暴露流程



圖一、 $^{15}N$  標定之亞硝酸鹽/硝酸鹽單次暴露與尿液收集流程

### (3) 體重與食物消耗量:

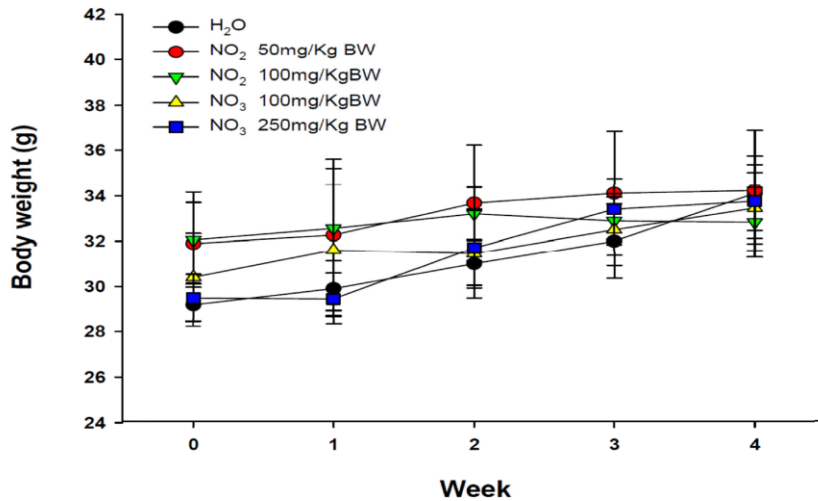


圖 2 小鼠經由 28 天餵食硝酸鹽或亞硝酸鹽之體重變化

圖 2 顯示小鼠經由 28 天餵食硝酸鹽或亞硝酸鹽，各組體重皆無明顯差異，食物消耗量亦無差異 (data not shown) 顯示選擇之劑量並無明顯毒性。

### (4) 血清生化檢驗 (Clinical Chemistry) 檢驗：

醣類的代謝、及肝與腎功能 (GOT、GPT、CHO、GLU、ALP 等) 皆以市售之分析試劑完成檢測。圖 3 顯示實驗組部分指標雖然略高於控制組，但是皆無統計上之差異。



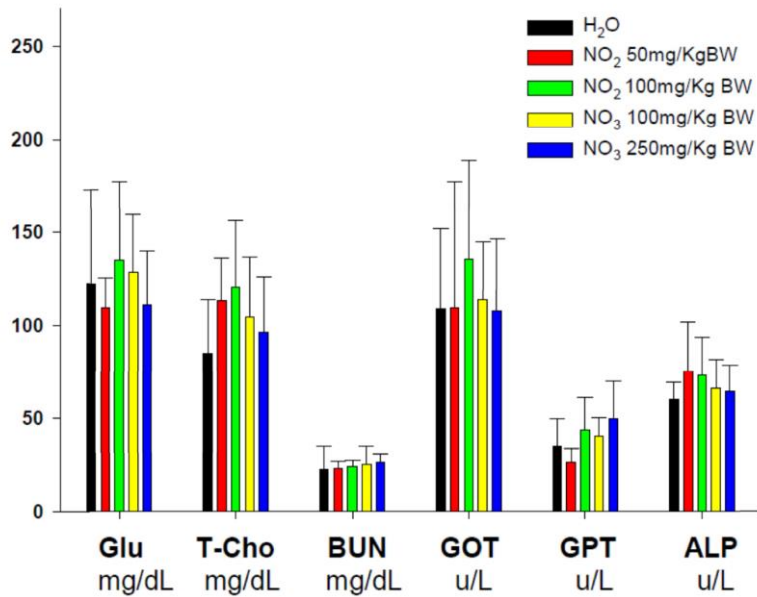


圖 3. 小鼠經由 28 天餵食硝酸鹽或亞硝酸鹽之血清生化值變化

(5) 尿液檢驗 (Urinalysis) :

測量尿液之量、酸鹼值與比重，並測量尿液中之 protein (蛋白質)、glucose (葡萄糖)、ketones (酮體) 與 occult blood (潛血反應) 等的含量。各組皆無顯著差異 (data not shown)。

(6) 生物樣品中自由基傷害分析：

血液及主要器官中抗氧化酵素如 SOD、GSH peroxidase、GSH reductase、Catalase 等，目前正在進行樣品前處理與分析流程之測試與建立。此外，在脂質過氧化產物分析，28 天餵食硝酸鹽或亞硝酸鹽，各實驗組血液中 TBA-MDA 產物濃度皆高於控制組，顯示有自由基或是過氧化物產生而對動物造成氧化性傷害，但未達嚴重損害 (圖 4)。

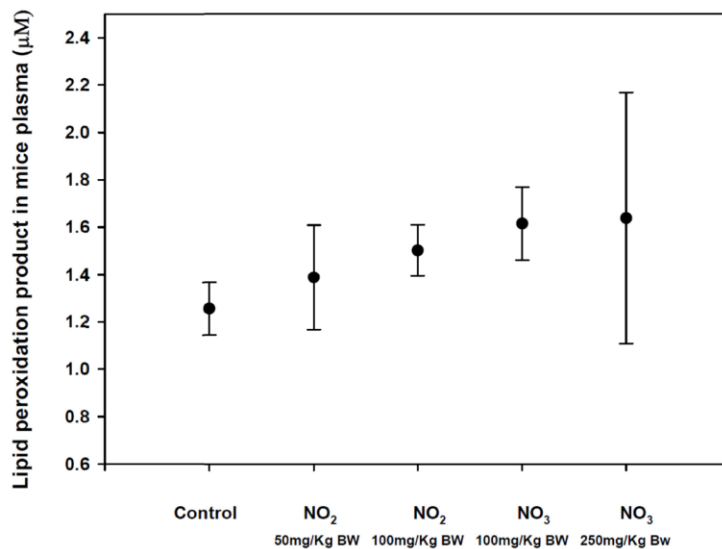


圖 4. 小鼠經由 28 天餵食硝酸鹽或亞硝酸鹽之血液脂質過氧化產物

(7) 生物樣品中亞硝胺組成及濃度分析：

尿液亞硝胺組成及濃度分析已交由總計畫與子計畫二代為測定。總計畫與子計畫二已完成尿液中9種亞硝胺之分析技術建立與驗證，初步已完成各組老鼠尿中亞硝胺之含量測定。因各種亞硝胺在尿中之檢出率不同，由未檢出之NMEA，檢出率25-50%之NDBA、NPyr、NDPhA、NPip、NMor及NDEA，而檢出率達7成之NDPA與全部皆有檢出之NDMA之數據整理於表1。雖然動物連續28天餵食硝酸鹽或亞硝酸鹽，並且每七天收集48小時尿液，但因硝酸鹽與亞硝酸鹽在體內半衰期短，尿中亞硝胺之濃度亦與餵食時間長短無關，故將同一處理之尿液樣品整合平均其濃度，以比較之間之差異。結果顯示，就高檢出率之NDPA與NDMA而言，在控制組中濃度較低，而餵食高劑量之硝酸鹽 (250 mg/kg BW) 就有偏高之趨勢。

表二、尿液中亞硝胺組成及濃度分析

	NDMA(ng/mg creatinine)	NDPA(ng/mg creatinine)
Control	14.42±4.50	0.55±0.33
NO <sub>2</sub> 50 mg/Kg BW	16.81±2.46	0.70±0.23
NO <sub>2</sub> 100 mg/Kg BW	14.60±4.22	0.69±0.02
NO <sub>3</sub> 100 mg/Kg BW	15.27±7.94	0.73±0.41
NO <sub>3</sub> 250 mg/Kg BW	17.54±5.64	0.91±0.72

(8) 亞硝酸鹽或硝酸鹽對心電圖、心跳速率與血壓改變之急急性作用分析：

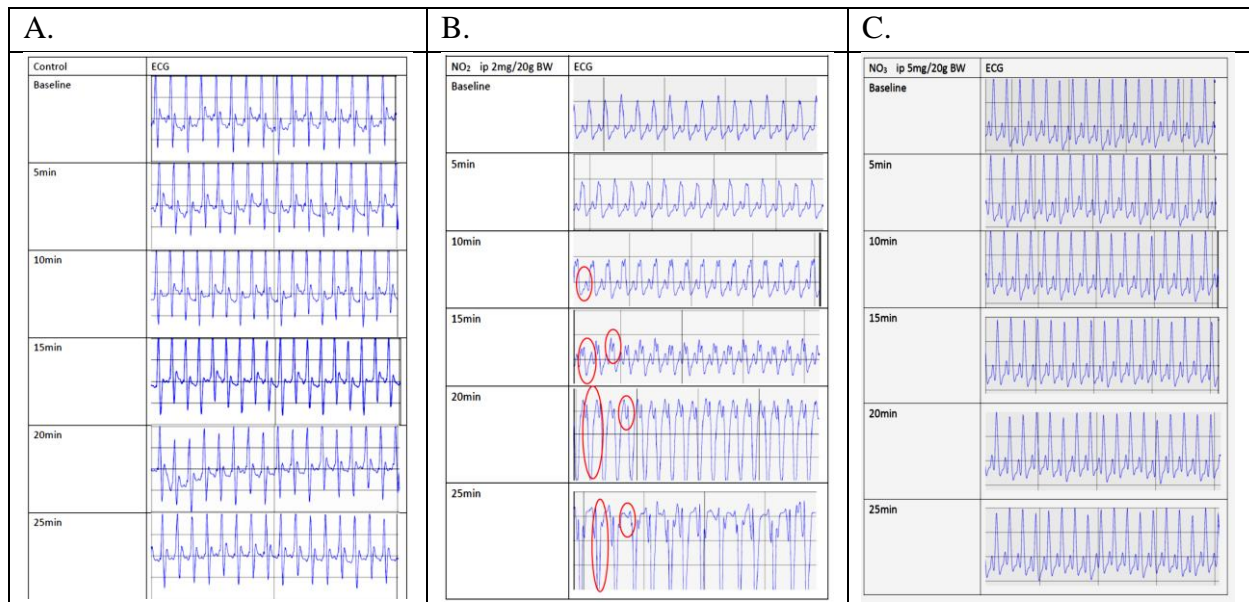
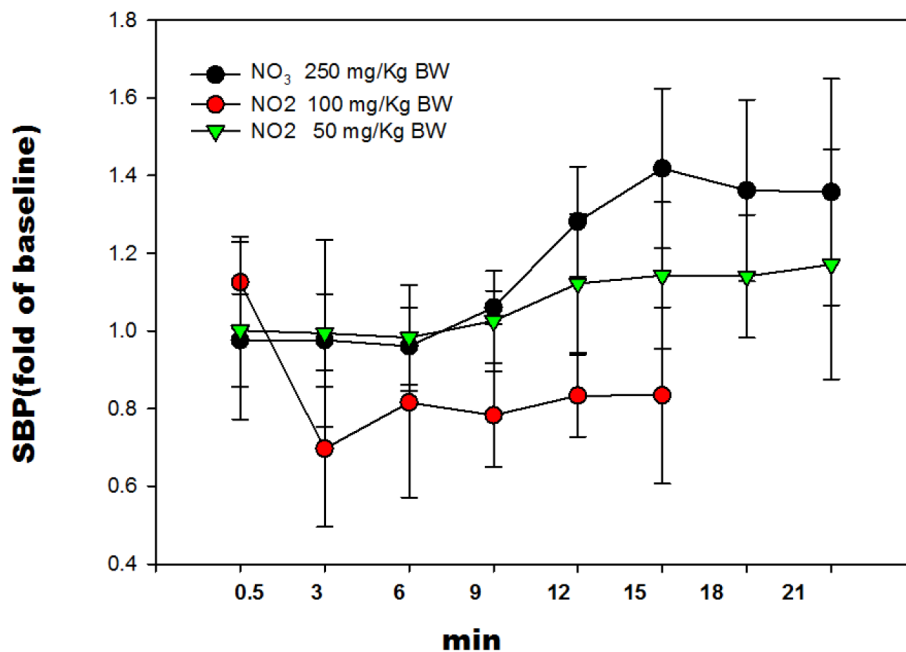


圖5、小鼠經由腹腔注射亞硝酸鹽或硝酸鹽對心電圖之影響

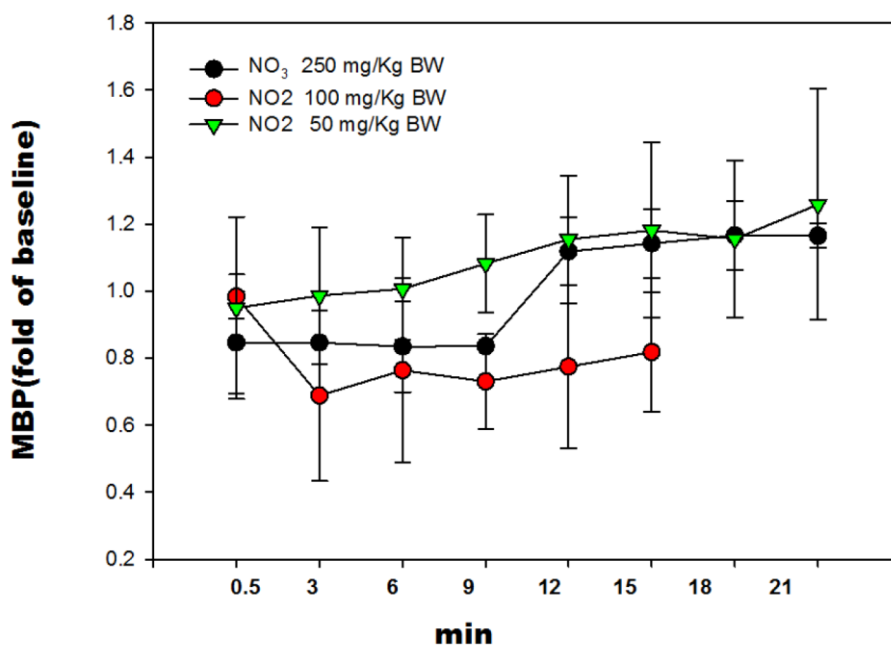
控制組老鼠經麻醉後持續觀察心電圖變化(A)以及老鼠經麻醉後腹腔注射100 mg/Kg BW劑量之亞硝酸鈉溶液(B)或250 mg/Kg BW 劑量之硝酸鈉溶液持續觀察心電圖變化

由圖5可以觀察到腹腔注射100 mg/Kg BW劑量之亞硝酸鈉溶液可以在十分鐘後即影響心電圖之波型，而且在更低劑量(50 mg/Kg BW)亦能在二十幾分鐘時產生影響。腹腔注射250 mg/Kg BW劑量之硝酸鈉溶液則影響不明顯。

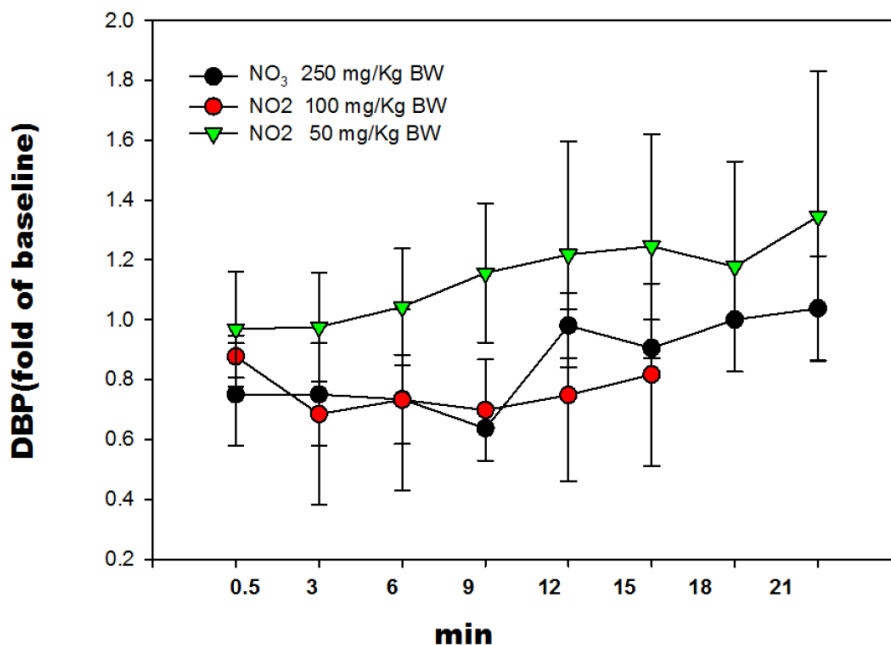
A.



B.



C.



D.

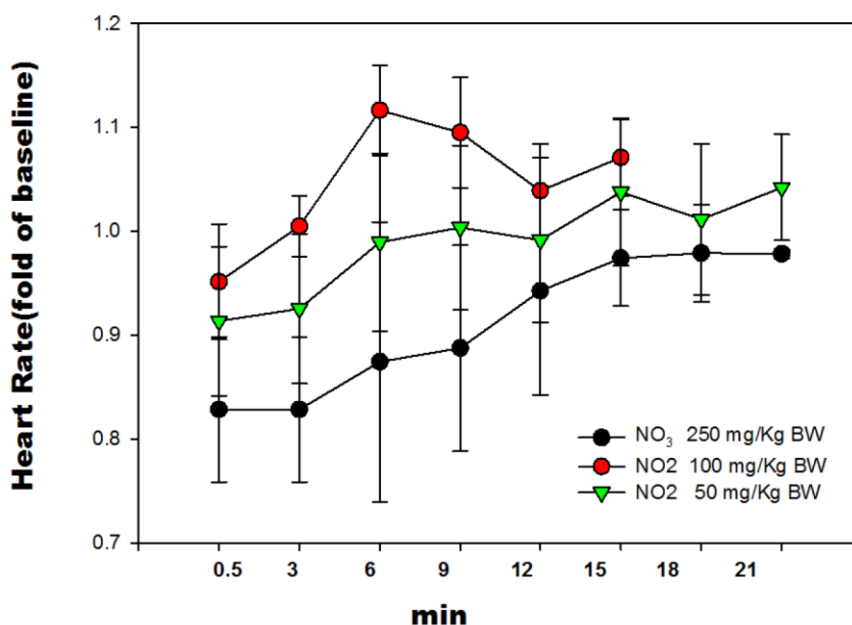


圖6、小鼠經由腹腔注射亞硝酸鹽或硝酸鹽對血壓與心跳速率之影響

老鼠經麻醉後腹腔注射50或100 mg/Kg BW劑量之亞硝酸鈉溶液以及250 mg/Kg BW劑量之硝酸鈉溶液持續觀察收縮壓(A)平均血壓(B)舒張壓(C)以及心跳速率(D)之變化

由圖5可以觀察到腹腔注射100 mg/Kg BW劑量之亞硝酸鈉溶液可以在十分鐘後即影響心電圖之波型，因此在觀察心血管參數時容易受影響以致在十五分鐘後之數據收集暫時無法具代表性，而在初期降血壓反應較明顯，而微幅使心跳加快。腹腔注射250 mg/Kg BW劑量之硝酸鈉溶液雖然對心電圖影響不明顯，但是由圖6可以觀察反應出其可明顯降低心跳與血壓，亞硝酸鈉溶液50 mg/Kg BW反應較和緩。

## 長期毒性與健康或學習與記憶行為影響探討:

### (1)劑量選擇:

360 天慢毒性測試:餵食動物之硝酸鹽或亞硝酸鹽長期飲水劑量, 在 28 天測試基礎上與急性試驗中皆觀察到 NOx 體內半衰期短毒性作用不明顯。進行經口飲水供給硝酸鹽或亞硝酸鹽水溶液評估, 分別測試 250-1500 mg/kg BW(硝酸鈉溶液)與 25-250 mg/kg BW(亞硝酸鈉溶液), 結果顯示亞硝酸鈉溶液劑量在 75 mg/kg BW(含)以上時, 動物拒絕飲用, 故劑量選擇 33.3 及 66.7 mg/kg BW, 在預實驗測試時並無外觀與行為異常。硝酸鈉飲水劑量 1500 mg/kg BW 在預實驗測試時, 動物並無外觀與行為異常, 故劑量選擇 750 及 1500 mg/kg BW, 因選擇經飲水中供給, 接近日常暴露途徑且體內瞬間濃度低於單次胃管給予, 故濃度可適量調整增加。

### (2)體重與食物消耗量:

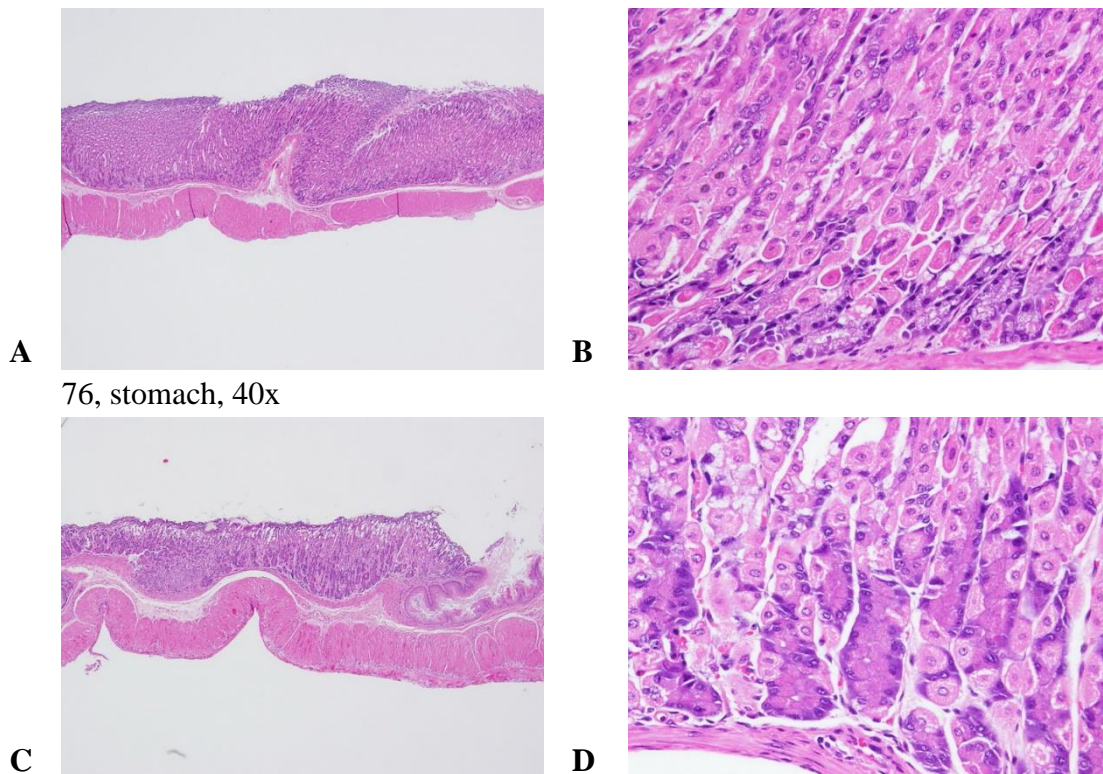
小鼠經由長期試驗經由飲水給予硝酸鹽或亞硝酸鹽, 各組體重皆無明顯差異, 食物消耗量亦無差異 (data not shown) 顯示選擇之劑量並無明顯毒性。

### (3)尿液檢驗 (Urinalysis):

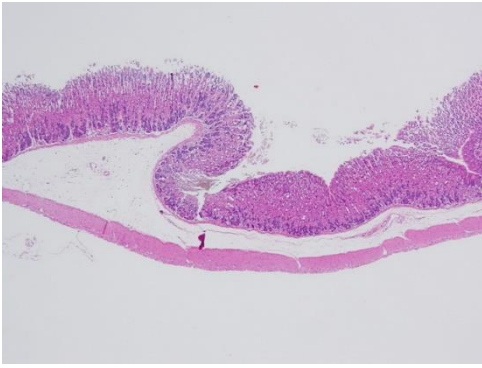
測量尿液之量、酸鹼值與比重, 並測量尿液中之 protein (蛋白質)、glucose (葡萄糖)、ketones (酮體) 與 occult blood (潛血反應) 等的含量。短期試驗各組皆無顯著差異 (data not shown)。

### (4)病理切片

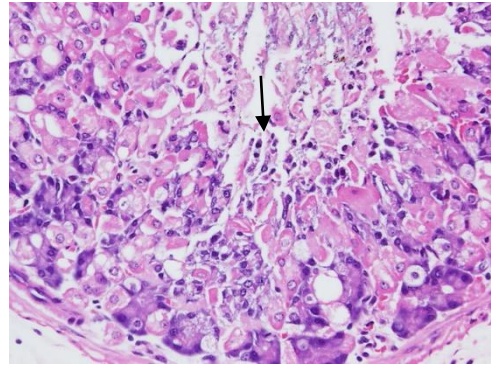
長達 360 天慢毒性的硝酸鹽/亞硝酸鹽餵食試驗, 觀察到胃部組織有產生病變, 包括 chief cell 增生與免疫細胞浸潤且和高劑量之硝酸鹽餵食較有關係, 低劑量亞硝酸鹽之給予, 則未見到病變產生, 此結果驗證胃是硝酸鹽重要標的器官。



101, stomach, 40x

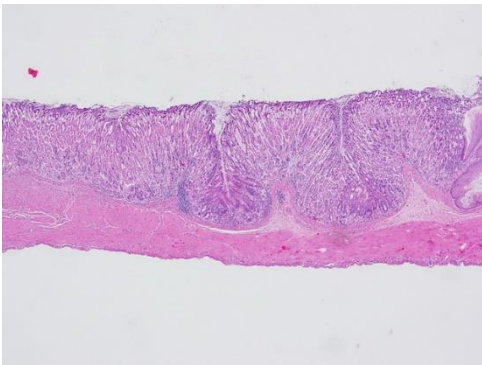


E

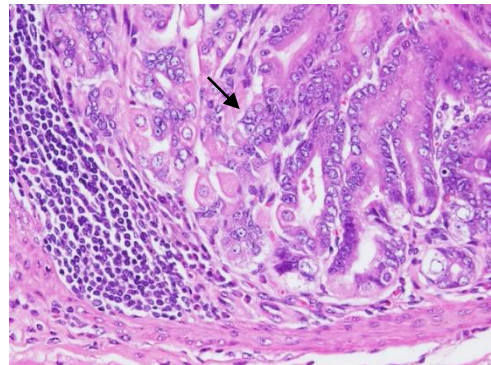


F

98, stomach, n2, 40x



G



H

51, stomach, h2, 40x

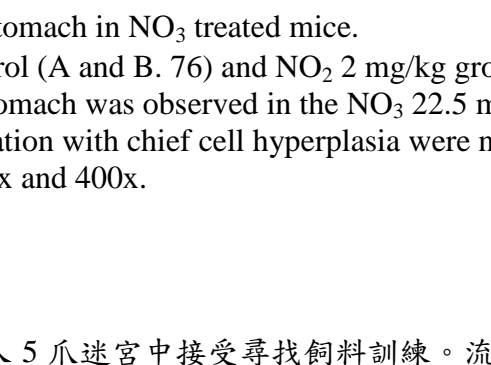
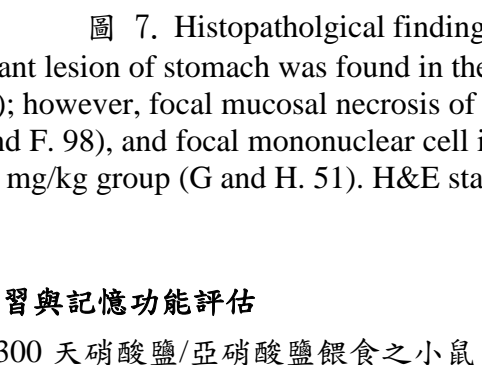


圖 7. Histopathological findings of stomach in  $\text{NO}_3$  treated mice.

No significant lesion of stomach was found in the control (A and B. 76) and  $\text{NO}_2$  2 mg/kg groups (C and D. 101); however, focal mucosal necrosis of the stomach was observed in the  $\text{NO}_3$  22.5 mg/kg group (E and F. 98), and focal mononuclear cell infiltration with chief cell hyperplasia were noted in the  $\text{NO}_3$  45 mg/kg group (G and H. 51). H&E stain. 40x and 400x.

#### (4) 動物學習與記憶功能評估

經 300 天硝酸鹽/亞硝酸鹽餵食之小鼠，置入 5 爪迷宮中接受尋找飼料訓練。流程為訓練前一天飼料減半供應，訓練當天將飼料置放在迷宮中特定位置，讓小鼠尋找，若經過 90 秒仍未找到，用人為引導方式讓小鼠接觸飼料，如此重複訓練 3 天後，即進行第一次正式測試之後每周維持訓練一次，並在第 330 及 360 天經過一次練習後，在隔天即進行正式測試。結果顯示，餵食一年硝酸鹽/亞硝酸鹽飲水之小鼠在學習與記憶表現比控制組差。

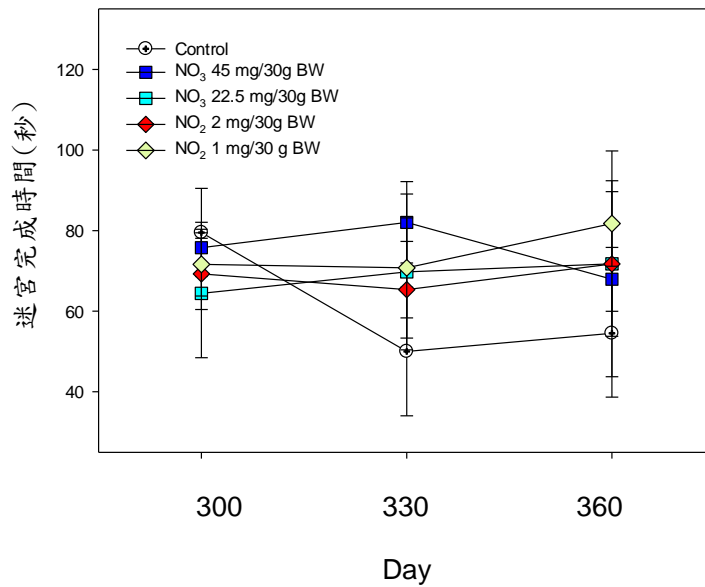
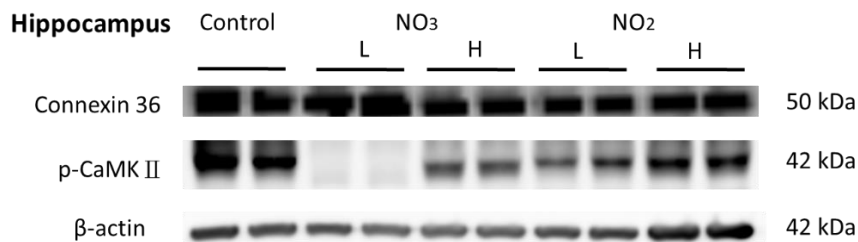


圖 8. 硝酸鹽/亞硝酸鹽飲水長期餵食之小鼠於迷宮中之表現

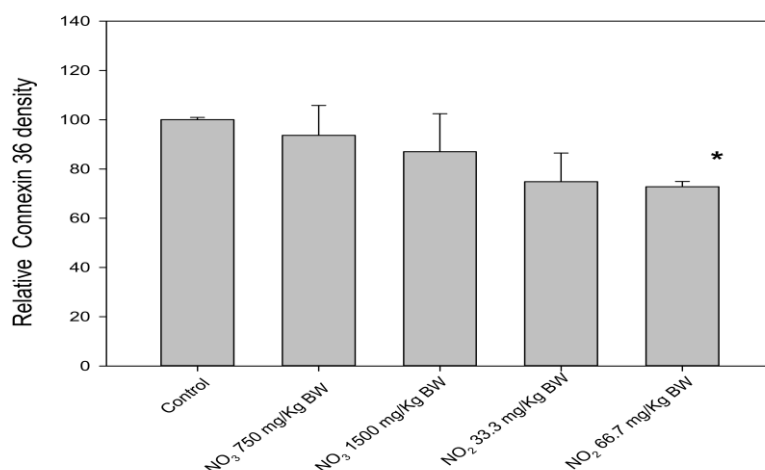
#### (5) 學習與記憶功能與腦組織中特定蛋白質表現之相關性

大腦皮質及海馬迴組織中之 pCaMK II 及 connexin36 蛋白質和學習與記憶功能有關。研究取餵食一年硝酸鹽/亞硝酸鹽飲水之小鼠的腦部大腦皮質及海馬迴組織測定其 p-CaMK II 及 connexin36 蛋白質。結果顯示，腦部大腦皮質之 p-CaMK II 及 connexin36 蛋白質表現較不具特异性，而海馬迴組織中之 p-CaMK II 及 connexin36 蛋白質表現則與餵食一年硝酸鹽/亞硝酸鹽飲水以及在學習與記憶表現具有一些相關性。硝酸鹽/亞硝酸鹽之給予會讓小鼠海馬迴有關學習與記憶之蛋白質表現受到抑制，但是在硝酸鹽低劑量顯著抑制 p-CaMK II 之原因除了試劑暴露外是否有其他因素影響還需進一步探討。

A.



B.



C.

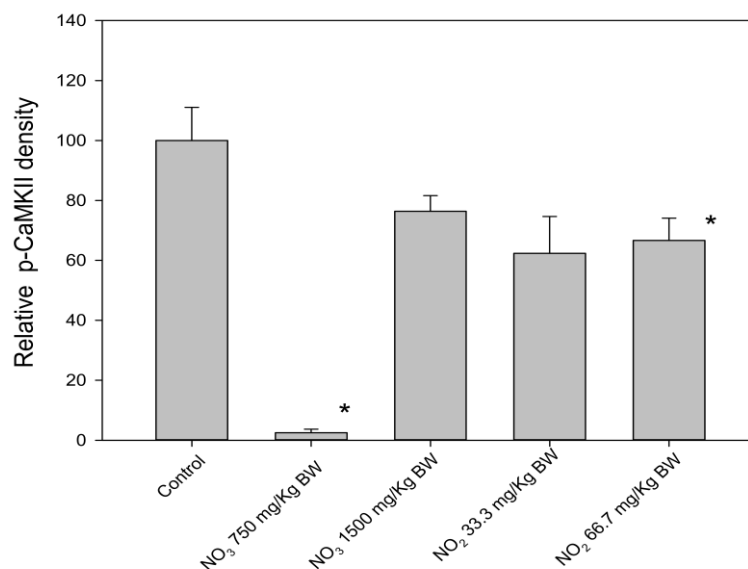


圖 9. 硝酸鹽/亞硝酸鹽飲水長期餵食之小鼠海馬迴組織中之 p-CaMK II 及 connexin36 蛋白質之表現

#### 亞硝胺體外合成試驗作為亞硝胺生成抑制劑篩選模式:

參考 Combet 等人(2007)所建立之 gastro-oesophageal-junction(GOJ)體外反應模式，模擬胃和食道的生理條件，觀察亞硝酸鹽和二級胺在此反應系統內生成亞硝胺之作用並藉由添加不同之抑制劑探討其保護效果。因之前研究指出包括 VitC 等抗氧化劑可能具有抑制亞硝胺生成之作用，研究選擇常見之抗氧化劑如 VitC, linoic acid, GSH, NAC 及 Reseveratrol 等，依照 GOJ 反應模式(亞硝酸鹽+二甲胺)測試這些抗氧化劑在水相中抑制亞硝胺 NOMA 的作用。由圖 10 結果顯示，Reseveratrol 具有較佳的抑制水相中 NDMA 之功用，而 GSH 及 NAC 反而有增加 NDMA 生成之趨勢，此實驗結果將值得做進一步的探討其作用機制以及應用價值。



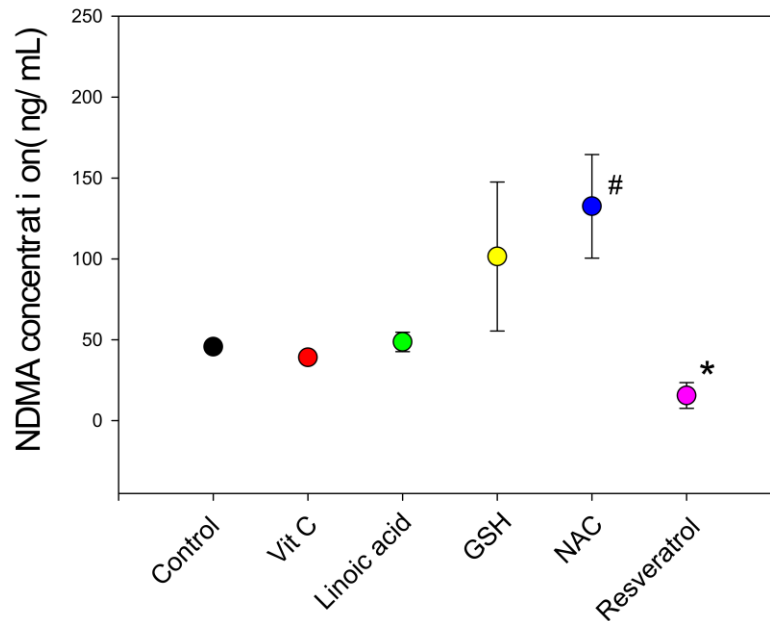


圖 10. 常見抗氧化劑在 GOJ 反應水相中抑制 NDMA 生成的作用評估

#### (五) 參考文獻

- Bos JL. 'ras 'on congenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 1989. 49:4682-4689.
- Chai SY, Chung MJ, Sung NJ. Volatile *N*-nitrosamine inhibition after intake Korean green tea and Maesil(*Prunus mune* SIEB. et Zau) extracts with an anime-rich diet in subjects ingesting nitre. *Food Chem Toxicol.* 2002. 40:949-957.
- Chen YF, Cui ZJ, Wang L, Liu HL, Fan WJ, Deng J. The impairment of learning and memory and synaptic loss in mouse after chronic nitrite exposure. *Environ Toxicol.* 2015.10.1002/tox.22174.
- Combet E, Paterson S, Iijima K, Winter J, Mullen W, Crozier A, Preston T, McColl KEL. Fat transforms ascorbic acid from inhibiting to promoting acid-catalysed *N*-nitrosation. *Gut* 2007;56:1678–1684.
- Hughes. R, Cross AJ, Pollock JRA. Bingham S. Dose-dependent effect of dietary meat on endogenous colonic *N*-nitrosation. *Carcinogenesis.* 2001.22(1):199-202.
- Holtrop G, Johnstone AM, Fyfe C, Gratz SW. Diet composition is associated with endogenous formation of *N*-nitroso compounds in obese men *J Nutr.* 2012. 142:1652-1658.
- Hassan HA, Yousef MI. Ameliorating effect of Chicory(*Cichorium intybus* L.)-supplemented diet against nitrosamine precursors-induced liver injury and oxidative stress in male rats. *Food Chem Toxicol.* 2010. 48:2163-2169.
- IARC. Ingested nitrates and nitrites. In: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks in humans. Vol 94: Ingested nitrates and nitrites, and cyanobacterial peptide toxins 2006. Available from: <http://monographs. Jarc. Fr/ENG/Monographs/PDF/Index.php>
- Mill GD, Marsh AP, Dove RW, Beavers D, Presly T, Helm C, Bechtold E, King SB, Kim-Shapiro D. Plasma nitrate and nitrite are increased by a high-nitrate supplement but not by high-nitrate foods in older adults, *Nutr. Res.* 2012. 32:160-168.
- Rifkind J. M., Nagababu E., Barbiro-Michaely E, Ramasamy S, Pluta RM, Mayevsky A. Nitrite infusion increases urebral blood flow and decrease mea arterial blood pressure in rat: A role for red cell No. *Nitric Oxide.* 2007. 16:448-456.

- Stanca, CM, Babar J, Singal V, Ozdenerol E, Odin JA. Pathogenic role of environmental toxins in immune-mediated liver diseases. *J Immunotoxicol*. 2008;5(1):59-68.
- Yang WJ, Yu J, Zhao L, Ma N, Fang Y, Pei F, Mariga AM, Hu Q. Polysaccharides from *Flammulina velutipes* improve scopolamine-induced impairment of learning and memory of rat. *J Fun Foods*. 2015;18:411-422.

## (六) 成果自評

計劃執行三年期間，由急性暴露到慢性暴露以及選擇體外測試 GOJ 反應模式，皆是依據之前觀察現象以及相關文獻搜尋對亞硝酸胺生成之前驅物硝酸鹽與亞硝酸鹽做更深入之探討以及毒性反應觀察與評估等，並據以為後續研究計畫執行之重要基礎。主要成果與收穫如下：

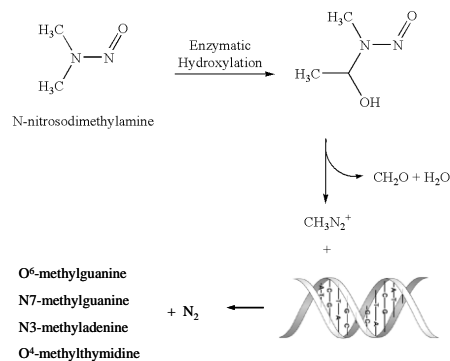
1. 依據文獻報告，人類暴露濃度與實驗測試取得硝酸鹽與亞硝酸鹽之動物慢毒性測試劑量，在暴露期間不造成動物外觀上之健康影響，並著手在微觀之生化與生理影響與變化包括自由基傷害之脂質過氧化與尿中亞硝酸胺分析等，目前正在經由飲水持續餵食中。
2. 藉由  $^{15}\text{N}$  標示之硝酸鹽與亞硝酸鹽餵食老鼠，觀察到在尿中出現之  $^{15}\text{N}$  標示之硝酸鹽或亞硝酸鹽比例接近參考文獻中人類補充硝酸鹽之血中濃度改變比例，目前已完成後續驗證與評估工作。研究團隊將嘗試追蹤硝酸鹽在體內產生不同變化或是與其他物質結合（包括亞硝酸胺型態及體內其他分子）而非以游離狀態排出且半衰期短，研究團隊將再根據這些現象持續追蹤  $^{15}\text{N}$  標示之硝酸鹽或亞硝酸鹽在體內之流佈。
3. 建立亞硝酸鹽或硝酸鹽對心跳速率、血壓改變之短期作用，以腹腔注射方式給予麻醉小鼠亞硝酸鹽/硝酸鹽溶液，並連接心電圖與血壓感測器，收集心電圖(ECG)、心跳速率(HR)、收縮壓(SBP)、平均血壓(MBP)及舒張壓(DBP)等，目前已完成儀器檢測技術與實地測試，未來將繼續應用在急性與慢性暴露評估以及後續實驗使用。
4. 長達 360 天慢毒性的硝酸鹽/亞硝酸鹽餵食試驗，觀察到胃部組織有產生病變，包括 chief cell 增生與免疫細胞浸潤且和高劑量之硝酸鹽餵食較有關係，低劑量亞硝酸鹽之給予，則未見到病變產生，此結果驗證胃是硝酸鹽的重要標的器官。
5. 經 300 天硝酸鹽/亞硝酸鹽餵食之小鼠，進行迷宮測試其學習與記憶功能，結果顯示餵食一年硝酸鹽/亞硝酸鹽飲水之小鼠在學習與記憶表現比控制組差，硝酸鹽/亞硝酸鹽飲水之長期給予會影響學習與記憶功能。
6. 大腦皮質及海馬迴組織中之 p-CaMK II 及 connexin36 蛋白質和學習與記憶功能有關。研究結果顯示，餵食一年硝酸鹽/亞硝酸鹽飲水之小鼠其海馬迴組織中之 p-CaMK II 及 connexin36 蛋白質表現受到抑制。
7. 研究選擇常見之抗氧化劑如 VitC, linoic acid, GSH, NAC 及 Reseveratrol 等，依照 GOJ 反應模式(亞硝酸鹽+二甲胺)測試這些抗氧化劑在水相中抑制亞硝酸胺 NOMA 的作用。結果顯示，Reseveratrol 具有較佳的抑制水相中 NDMA 之功用，而 GSH 及 NAC 反而有增加 NDMA 生成之趨勢，此實驗結果將值得做進一步的探討其作用機制以及應用價值。

子計畫四	計畫主持人：趙木榮 教授
運用新穎基因鍵結體學 (DNA Adductomics) 全面評估 亞硝胺所造成的 DNA 鹼基修飾	

## (一) 前言

### (1) DNA 鍵結物

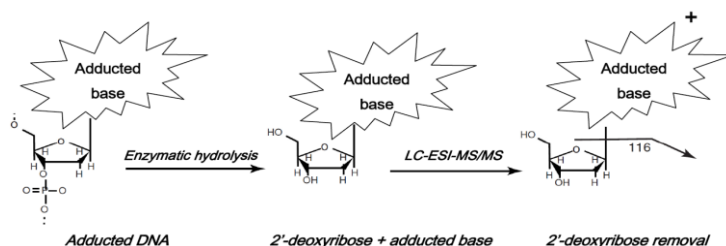
*N*-nitrosamines 須經代謝後，方具有反應鍵結 DNA 的能力。以二甲基亞硝胺 (*N*-nitrosodimethylamine, NDMA) 為例 (圖一)，其經體內代謝酵素活化水解後可生成甲基偶氮離子 ( $\text{CH}_3\text{N}_2^+$ , methanediazonium ion)，而使得 DNA 產生甲基化鍵結，如 N7-methylguanine (N7-MG)、N3-methyladenine (N3-MA)、 $\text{O}^6$ -methylguanine ( $\text{O}^6$ -MG) 及  $\text{O}^4$ -methylthymine ( $\text{O}^4$ -MT) 等，都是鹼基中的氧或氮這兩種具親電子性的原子上發生了甲基取代反應而生成的修飾鹼基，但在 DNA 上不同位置的氧或氮原子相對的親電子性有差別，並不是在每個氧氮原子上都會發生反應。*Guanine* 上的 N7、N3、 $\text{O}^6$  與 *adenine* 上的 N3 有較強的反應，其中 *guanine* 的 N7 位置 (N7-MG) 是最主要的烷基鍵結處，約佔 60~85%；*adenine* 的 N3 位置 (N3-MA)，約佔 2~18%。



圖一、NDMA 經代謝後造成 DNA 甲基化鍵結損傷 [modified from Jourdeuil et al. 1997]

### (2) 基因鍵結體學 (DNA adductomics)

下圖二為運用串聯質譜 (tandem mass spectrometry, tandem MS) 進行 DNA adductomics 分析之基礎構想。亦即，將母離子經碎裂後質荷比 ( $m/z$ ) 能減少 116 者 ( $[\text{M} + \text{H}]^+ \rightarrow [\text{M} + \text{H} - 116]^+$ ) 作為特徵，描繪出樣本中各種 DNA adducts 的修飾鍵結體地圖 (adductome map)，最近學者們開始將這樣的觀念統稱為基因鍵結體學 (DNA adductomics) [Balbo et al. 2014]。



圖二、運用質譜進行 DNA adductomics 分析之基礎構想

細胞內基因損傷可被適時修復，其中鹼基移除修復 (base excision repair, BER) 與核苷酸切除修復 (nucleotide excision repair, NER) 為主要修復路徑。BER 主要針對小修飾的鹼基進行切除修復，其修復產物為受鍵結的鹼基 (adducted base)。NER 可將受損的核苷酸 (大小修飾基皆可，但以大修飾基或區域性損傷為主) 進行區段切除後修復；受切除的核苷酸區段再經酵素分解成單一受鍵結的核苷 (adducted 2'-deoxynucleosides)，可進一步排至體液，例如血液及尿液 [Hakem 2008]。因此理論上 DNA adductomics 方法也應能運用於體液中來自 NER 修復路徑的 adducted 2'-deoxynucleosides 分析。但意義上不同的是，我們若藉由 DNA adductomics 量測生物細胞中 DNA adducts 的含量，其所代表的是細胞受到傷害與修復間達到平衡的穩定量 (steady-state level)。而若在尿液中量測 adducted 2'-deoxynucleosides 的濃度，所代表的是 DNA adducts 經 NER 修復路徑後的產物 [Hu et al. 2010]。尿液樣本分析具有便利、迅速、不具侵入性及樣本體積大等優點，若能運用 DNA adductomics 技術同時偵測尿液中所有 adducted 2'-deoxynucleosides，將可大幅提升 DNA adductomics 的應用廣度。

## (二) 研究目的

- (1) 經由體外酵素活化 *N*-nitrosamines 以鍵結 calf thymus DNA，運用 adductome map 比對找出 *N*-nitrosamines 的重要特徵 DNA adducts。
- (2) 以 *N*-nitrosamines 暴露人類肝細胞，運用 adductome map 比對找出 *N*-nitrosamines 的重要特徵 DNA adducts。
- (3) 將 DNA adductomics 技術運用於小鼠尿液樣本分析。
- (4) 以 *N*-nitrosamines 直接餵食小鼠，運用 adductome map 比對找出 *N*-nitrosamines 的重要特徵 DNA adducts。
- (5) 在 multiple reaction monitoring (MRM) 模式下定量分析暴露亞硝胺的小鼠肝臟與尿液中 DNA adducts。
- (6) 嘗試應用高解析質譜儀進行小鼠暴露 *N*-nitrosamines 後的 DNA adductomics 分析。

## (三) 研究方法

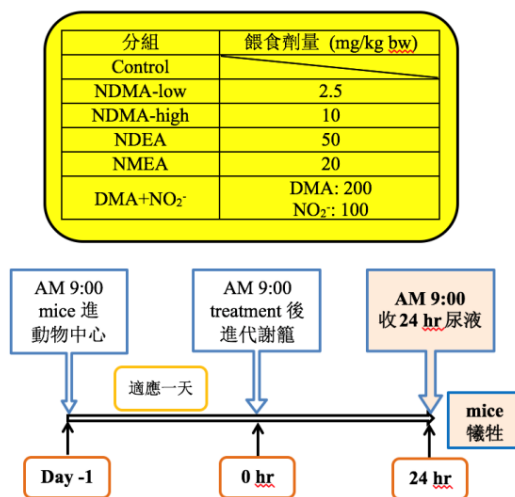
子四計畫所使用的藥品 S9 (from rat liver)、*N*-Nitroso-*N*-methylurea (NMU)、calf thymus DNA 與 nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) 與 *N*-Nitrosodiethylamine (NDEA) 購自 Sigma-Aldrich；*N*-Nitrosodimethylamine (NDMA) 購自 Tokyo Chemical Industry，dimethylamine (DMA) 購自 Alfa Aesar，*N*-Nitrosomethylethylamine (NMEA) 購自 Chem Service。

高效液相層析串聯質譜儀 (HPLC-QqQ MS) 採用 AB SCIEX 公司的 4000 QTRAP，搭配 Agilent HPLC 1100 系統 (包含自動除氣裝置、兩台高壓雙汞幫浦與一台自動進樣器)，與連線固相萃取 (on-line SPE) 使用之六向閥 (購自 Valco)。本實驗使用兩支層析管柱皆購自 GL Science，一支為 Inertsil ODS-3, 75 mm x 2.1 mm, 5 μm (用於 SPE)；另一支為 Inertsil ODS-3, 150 mm x 2.1 mm, 5 μm (用於分離)。超效液相層析高解析質譜儀 (UPLC-HRMS) 使用為 LTQ/orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific)，搭配 Waters Acquity UPLC 系統 (包含一台超高壓雙汞幫浦與一台自動進樣器)，使用管柱為 Waters Acquity UPLC HSS T3 管柱 (150 mm x 2.1 mm, 1.8 μm)

本研究體外試驗樣本來源有二：(1) 將 calf thymus DNA 分別與 NMU (不加 S9) 及 NDMA (加 S9) 混和反應 24 小時後，加入 NaI 及 2-propanol 將 DNA 析出，經離心沉澱後，

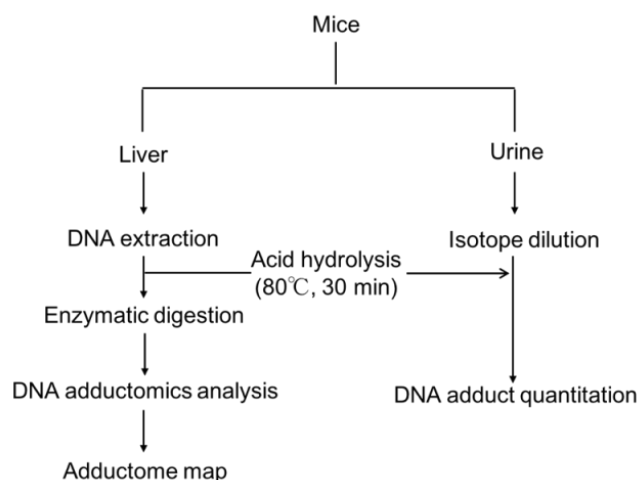
分別以 40% 2-propanol 及 70% ethanol 清洗回溶至 0.1 mM desferrioxamine。(2) 將 Human liver WRL68 cell 分成 3 組，每組細胞數目約  $4 \times 10^6$ ，於 0、0.1 及 20 mM NDMA 下暴露 24 小時，收集後經由抗氧化程序萃取出 DNA [Chao et al, 2008]。上述 DNA 經由酵素水解後，將 2'-deoxynucleosides 釋出分析。

動物實驗之小鼠分別管餵不同種類的 *N*-nitrosoamines：(1) 低劑量 NDMA (2.5 mg/kg bw)；(2) 高劑量 NDMA (10 mg/kg bw)；(3) NDEA (50 mg/kg bw)；(4) NMEA (20 mg/kg bw) 與 (5) 生成 NDMA 的前驅物：DMA (200 mg/kg bw) 與  $\text{NO}_2^-$  (100 mg/kg bw)。單一劑量餵食後收集 24 小時內尿液檢體，並將其犧牲取其肝臟檢體。詳細動物實驗設計如圖四。



圖四、小鼠實驗設計

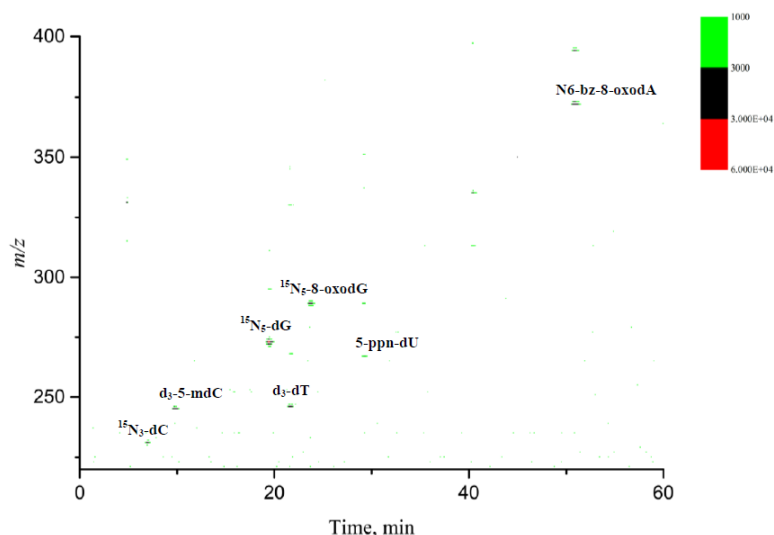
取得小鼠肝臟樣本後，運用抗氧化萃取流程萃取出 DNA，再經由酵素水解將核苷 (2'-deoxynucleosides) 釋出，以進行 DNA adductomics 分析。此外，萃取出肝臟 DNA，取一部分進行酸熱水解，利用 1 M HCl 水解 30 分鐘 (80°C)，以 on-line SPE LC-QqQ MS 在 MRM 模式下定量分析修飾鹼基。而小鼠尿液樣本則直接採用同位素稀釋法 (isotope dilution) 進行 MRM 定量分析 [Chao et al. 2007, Hu et al. 2012]，詳細樣本分析流程如下圖五。



圖五、小鼠肝臟與尿液樣本分析流程

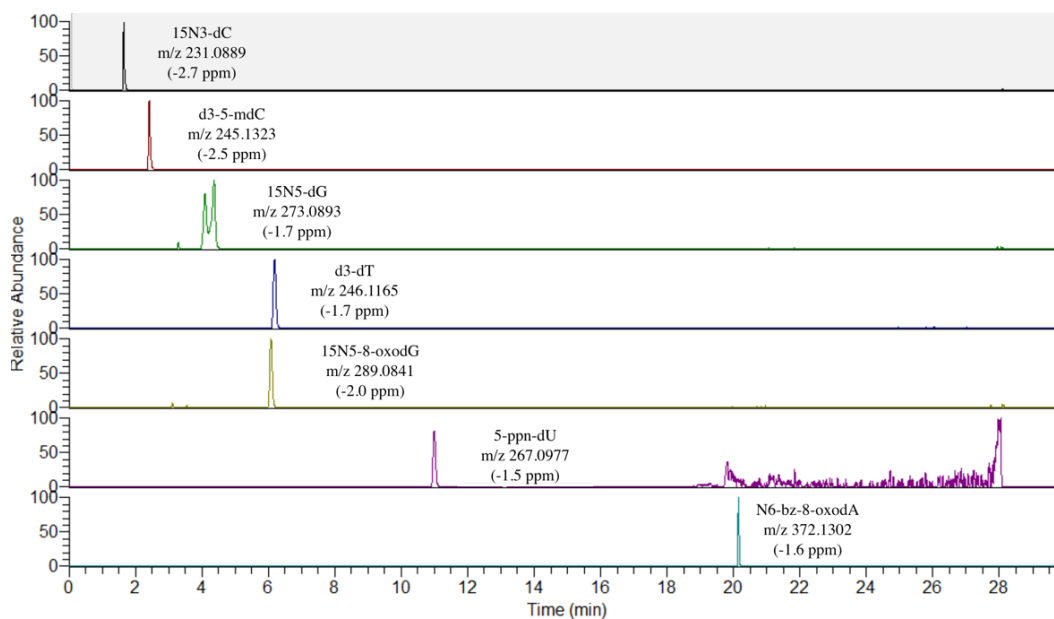
目前我們已成功運用 on-line SPE LC-QqQ MS 開發具高敏感度及高選擇性的 DNA

adductomics 分析方法，運用資訊輸出系統將層析質譜訊號轉換成 adductome map，範例如下：利用大範圍的質荷比掃描 ( $m/z$  220-600) 可得到每一層析時間所有可能的 2'-deoxynucleosides 訊號；隨著層析時間將中性丟失 (constant neutral loss, CNL) 質量 116 Da 掃描的結果轉換輸出，作成鍵結體地圖 (adductome map)。下圖六為輸出成 adductome map 的範例；X 軸為層析時間，Y 軸為母離子 (Q1)  $m/z$ ，顏色代表訊號強度。



圖六、將 LC-QqQ MS 分析所得層析質譜 CNL 訊號轉換成 adductome map 範例

此外我們也首次嘗試運用超效液相層析搭配高解析質譜 (UPLC-HRMS) 進行 DNA adductomics 的分析，全掃描質譜解析度設定為 60000，掃描範圍為  $m/z$  220-600。下圖七為 7 種 2'-deoxynucleosides 標準品之層析圖譜，量測之質量 (accurate mass) 與理論精確質量 (exact mass) 之質量誤差 (mass error) 皆小於 3 ppm。

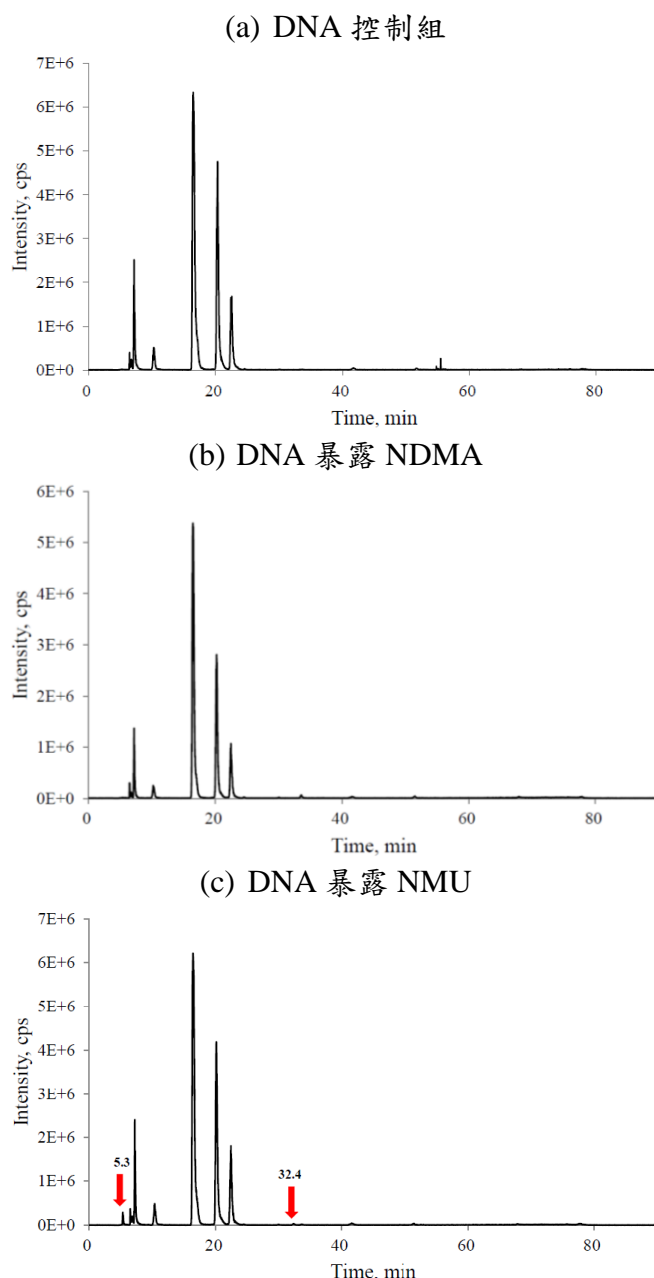


圖七、利用高解析質譜 (UPLC-HRMS) 分析 2'-deoxynucleosides 標準品 (200 pg on-column)

#### (四) 結果與討論

##### (1) LC-QqQ MS 找尋 calf thymus DNA 經 NDMA 及 NMU 鍵結的重要特徵

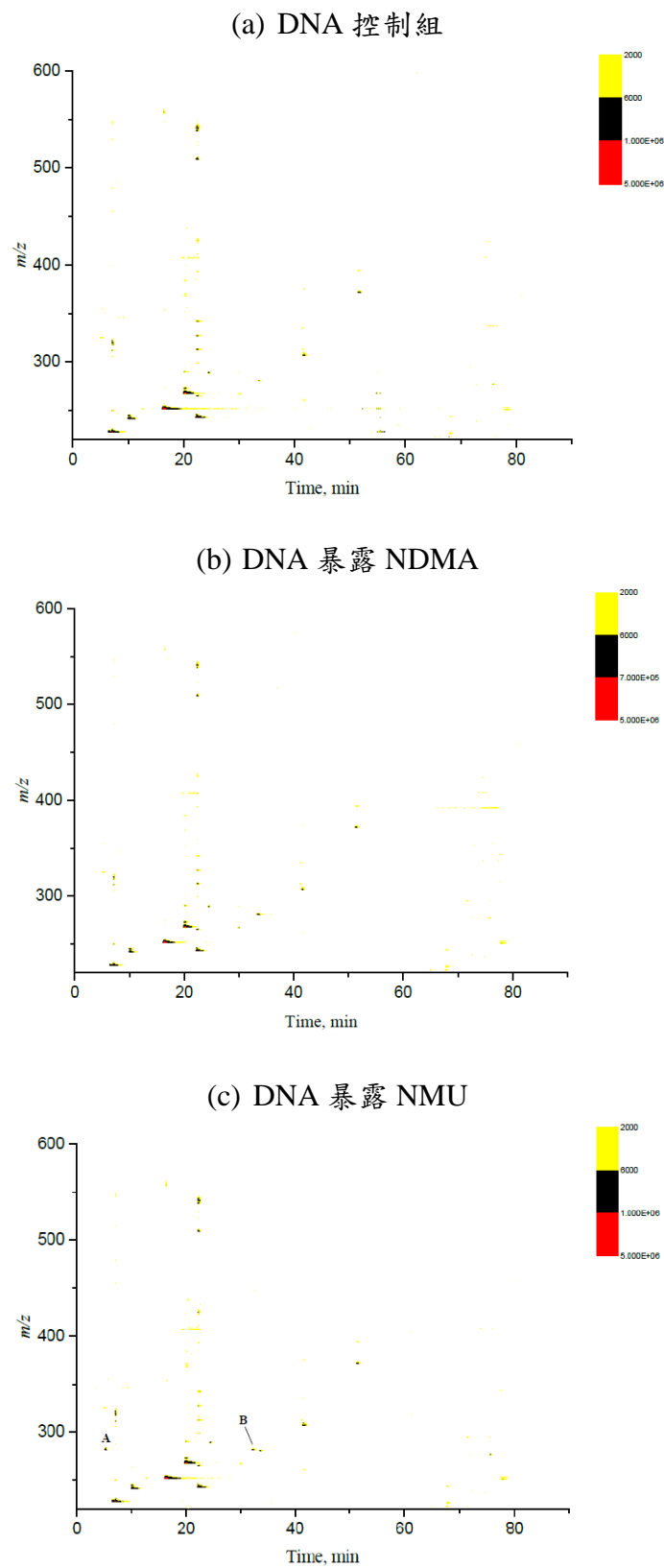
NDMA 須經動物酵素代謝才具反應性，而 NMU 屬於 *N*-nitrosamide 反應性強，可直接作用 DNA。下圖八為 calf thymus DNA 分別與 NDMA (加 S9) 及 NMU (不加 S9) 反應後的 total ion chromatography (TIC) 層析圖。(a) 為 DNA 控制組；(b) 為暴露 NDMA 並添加動物代謝酵素；(c) 為暴露 NMU 但不添加動物代謝酵素；由 TIC 可初步比對總訊號特徵，NDMA 與控制組相近，但 NMU 在層析時間 5.3 及 32.4 分鐘有新訊號產生。



圖八、DNA 經 LC-QqQ MS 以 CNL 模式掃描丟失質量 116 Da 的 TIC 圖譜

上述 TIC 圖譜資訊可進一步提取轉換為 adductome map (未扣除 normal nucleosides 及內標訊號)；X 軸為層析時間，Y 軸為母離子 (Q1)  $m/z$ ，顏色代表訊號強度，如圖五所示。NDMA

與控制組 adductome map 相近，NMU 在層析時間 5.3 及 32.4 分鐘所產生的新訊號 A 及 B 其  $m/z$  皆為 282，亦即分子量為 281。

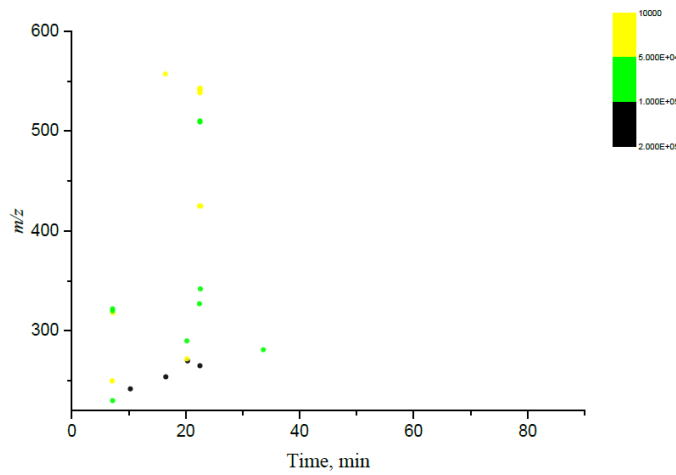


圖九、DNA adductome map (未扣除 normal nucleosides 及內標訊號)

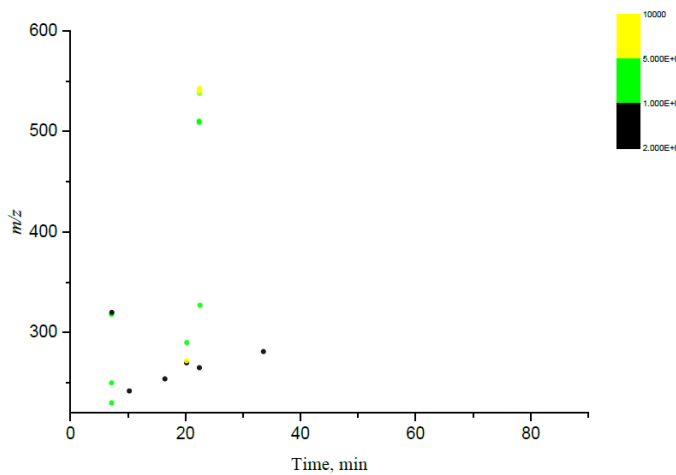


上述圖九 adductome map 可進一步運用 AB Sciex 所提供 MarkerView™ Software，以內標滯留時間為基準在不同層析時間區段中以進行滯留時間修正。接著將訊號積分並扣除 normal nucleosides 及內標訊號後輸出。下圖六為經處理干擾訊號 (normal nucleosides 及內標訊號) 並修正滯留時間及離子抑制後的 adductome map。可清楚看出 DNA 經 NDMA 暴露後與控制組 adductome map 相似，沒有發現特徵訊號。推測本研究所添加的 S9 無法有效地將 NDMA 代謝活化生成甲基偶氮離子使 DNA 產生甲基化鍵結。下一步將修正 S9 及 NDM A 的添加比例並分析 NDMA 在體外培養下經 S9 的代謝效率，以確立各種 *N*-nitrosamines 所形成的 adductome map 特徵研究模組。此外由圖十比較，NMU 能顯著造成 A、B 重要特徵 DNA adducts ( $m/z$  282)，推測應分別是 N7-methyl-2'-deoxyguanosine (N7-MdG) 及 O<sup>6</sup>-methyl-2'-deoxyguanosine (O<sup>6</sup>-MdG)。

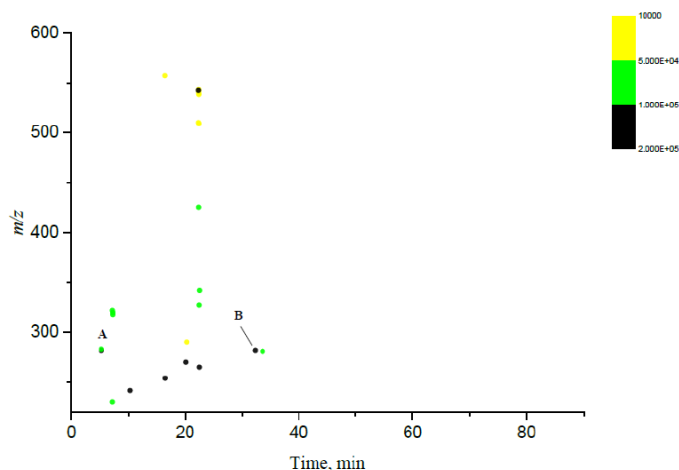
(a) DNA 控制組



(b) DNA 暴露 NDMA



(c) DNA 暴露 NMU

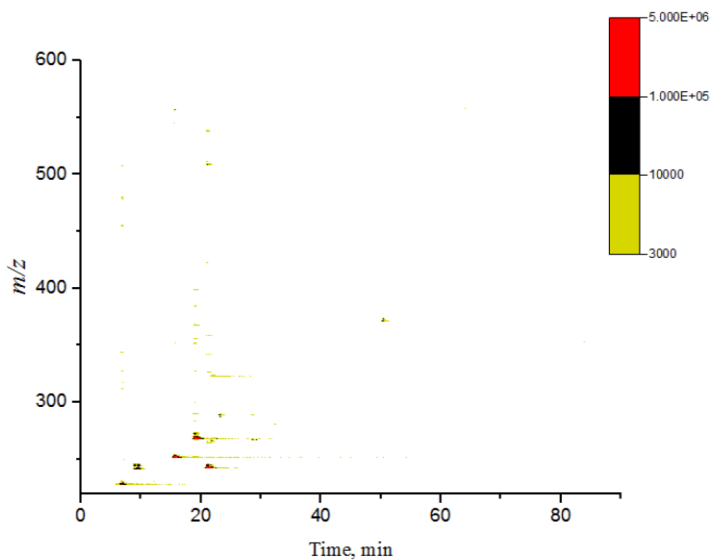


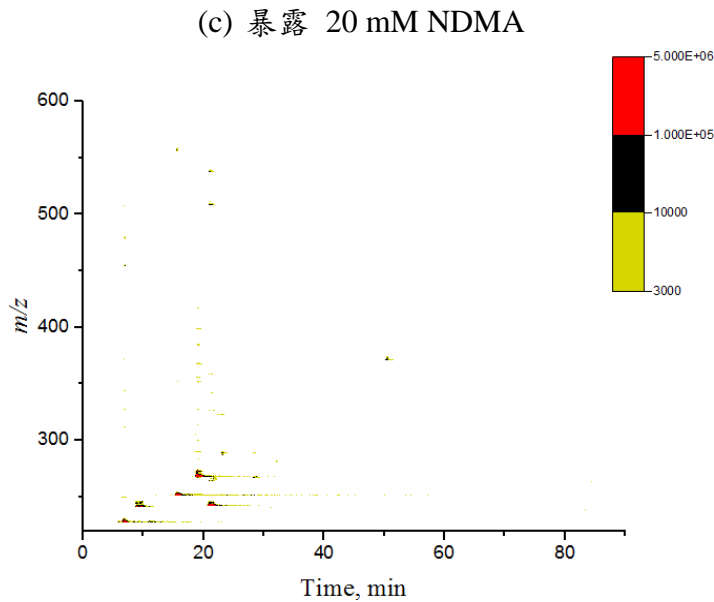
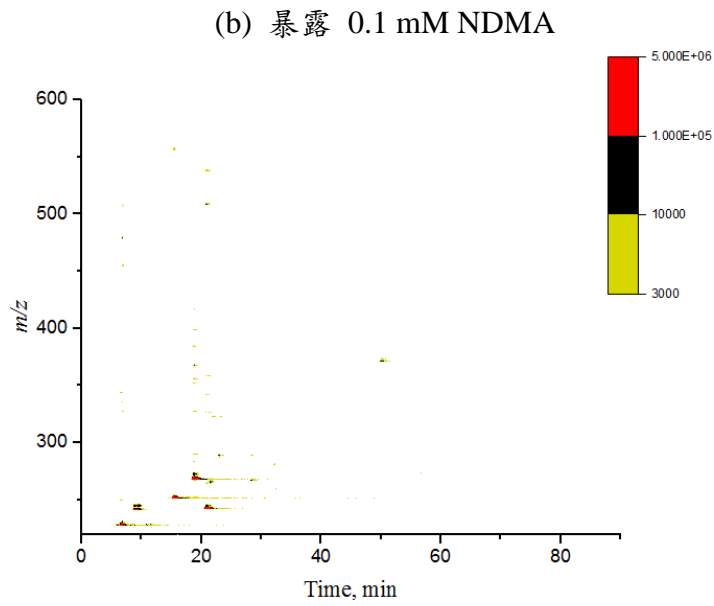
圖十、DNA adductome map 訊號積分圖

## (2) LC-QqQ MS 找尋 Human liver cell 受 NDMA 暴露後的重要鍵結特徵

Human liver cell 暴露 NDMA 後，經 DNA 萃取及運用 on-line SPE LC-QqQ MS 於 CNL 模式下分析可得 TIC 質譜圖。TIC 圖譜資訊可進一步提取轉換為 adductome map (未扣除 normal nucleosides 及內標訊號)；X 軸為層析時間，Y 軸為母離子 (Q1) 質荷比，顏色代表訊號強度，如圖十一所示。(a) 為 DNA 控制組；(b) 為暴露 0.1 mM NDMA；(c) 為暴露 20 mM NDMA；暴露 NDMA 在不同濃度下與控制組 adductome map 相近，無法看出特徵訊號。

(a) Human liver cell 控制組

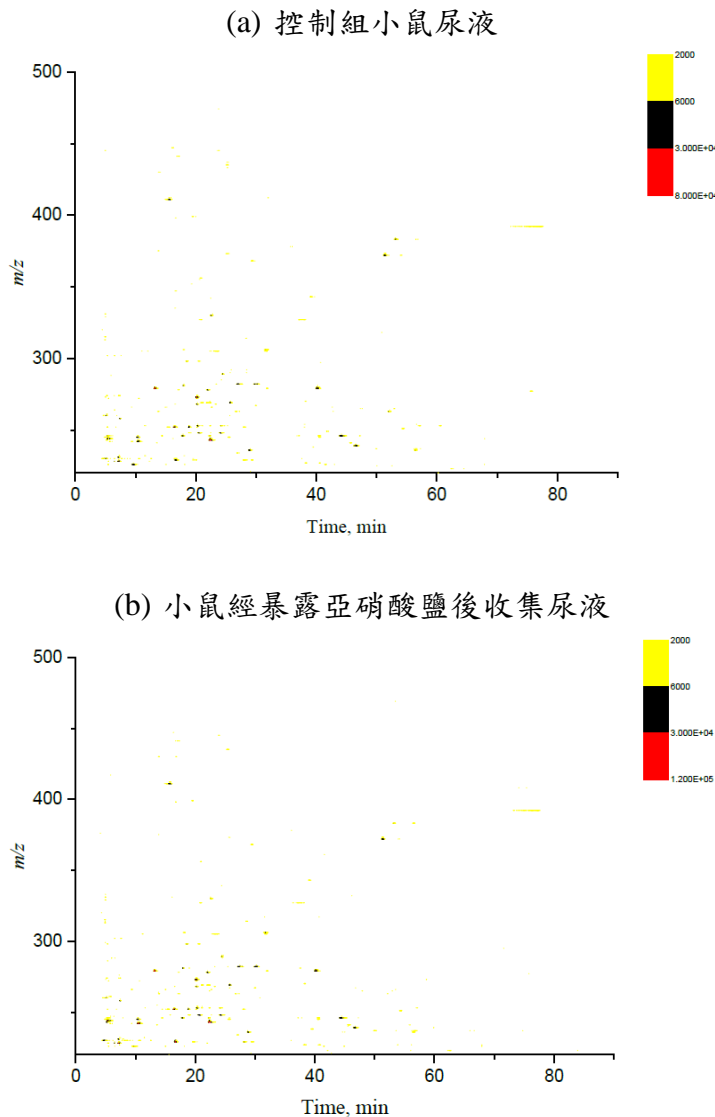




圖十一、Human liver cell DNA 暴露不同濃度 NDMA 的 adductome map

### (3) LC-QqQ MS 運用於暴露亞硝酸鹽之老鼠尿液樣本的 DNA adductomics 分析

下圖十二為本研究運用 DNA adductomics 技術於鼠尿分析 (由子計畫三提供)。小鼠尿液經 on-line SPE LC-QqQ MS 分析在 CNL 模式下成功產生 adductome map。結果比對發現，暴露亞硝酸鹽後並不會在尿液中形成顯著的特徵 DNA adducts，未來將持續改善分析敏感度，以試圖找出訊號較微弱的特徵 DNA adducts。

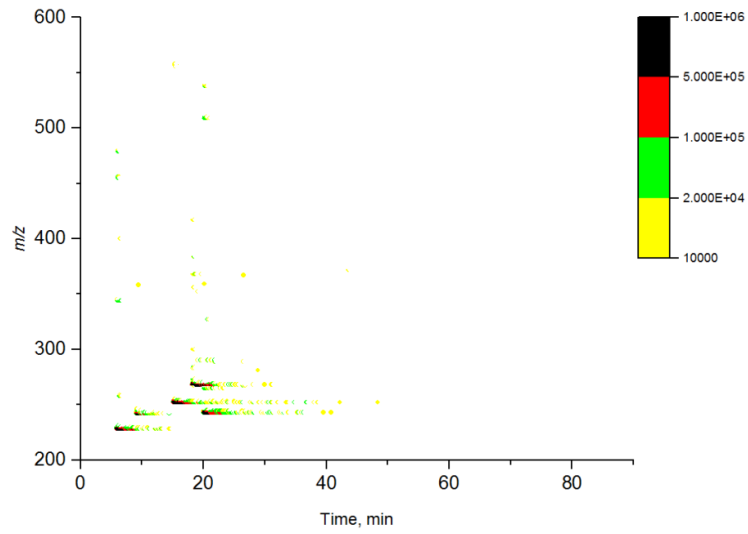


圖十二、小鼠尿液 adductome map 比較：(a) 控制組及 (b) 暴露亞硝酸鹽

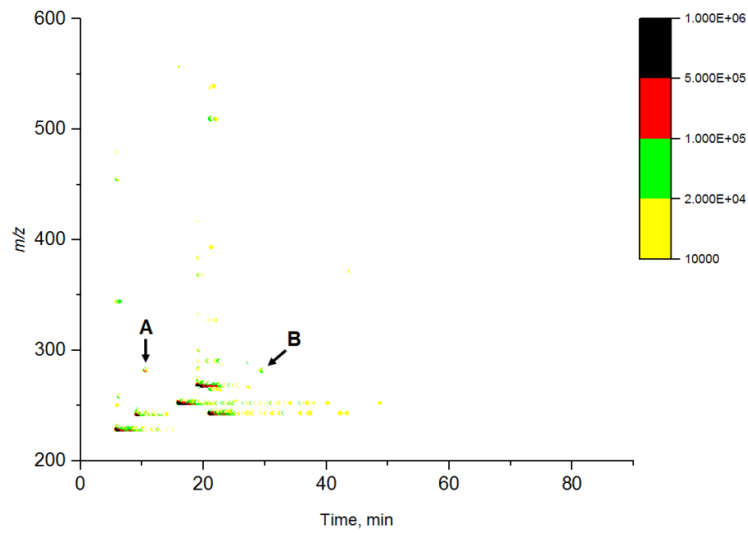
#### (4) LC-QqQ MS 運用於暴露亞硝胺之老鼠肝臟樣本的 DNA adductomics 分析

下圖十三為分別給予小鼠 NDMA 或生成 NDMA 的前驅物質 (DMA 與  $\text{NO}_2^-$  混和) 之 DNA adductome map。小鼠肝臟經研磨後進行 DNA 萃取與 on-line SPE LC-QqQ MS 分析，最後將 TIC 層析圖提取轉換為 adductome map (未扣除 normal nucleosides 及內標訊號)。相較於 (a) 控制組，(b) 暴露 NDMA (低劑量：2.5 mg/kg bw) 的 adductome map 上可發現分別於 10.7 分鐘 (訊號 A) 與 28.8 分鐘 (訊號 B) 有新的訊號出現，而此兩訊號相較於 (c) 給予較高劑量的 NDMA (高劑量：10 mg/kg bw) 時，發現強度更明顯增加，呈現有劑量反應關係。此外，(d) 直接給予小鼠 DMA 與  $\text{NO}_2^-$ ，使其於小鼠體內生成 NDMA 並代謝。相較於控制組的 adductome map，一樣於 10.7 分鐘 (訊號 A) 與 28.9 分鐘 (訊號 B) 出現新訊號，但強度明顯小於 NDMA 的高、低劑量組。推測可能原因是給予 DMA 與  $\text{NO}_2^-$  後於體內生成 NDMA 的量低，使得訊號強度相對較小。訊號 A 與 B 皆由相同的  $m/z$  282  $[\text{M} + \text{H}]^+$  所產生，其分子量應為 281。 $m/z$  282 訊號相同於前述實驗中 calf thymus DNA 直接與強致甲基化劑 MNU 的反應結果，因此推測訊號 A 為 N7-MdG 及訊號 B 為 O<sup>6</sup>-MdG。

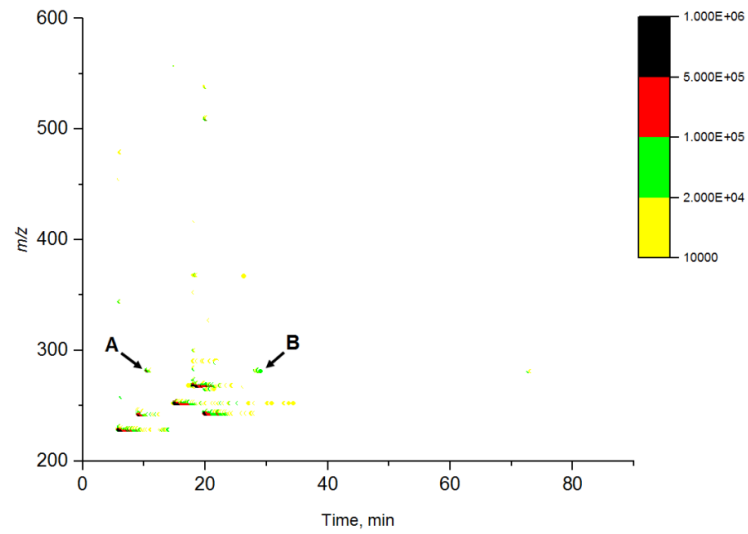
(a) 控制組

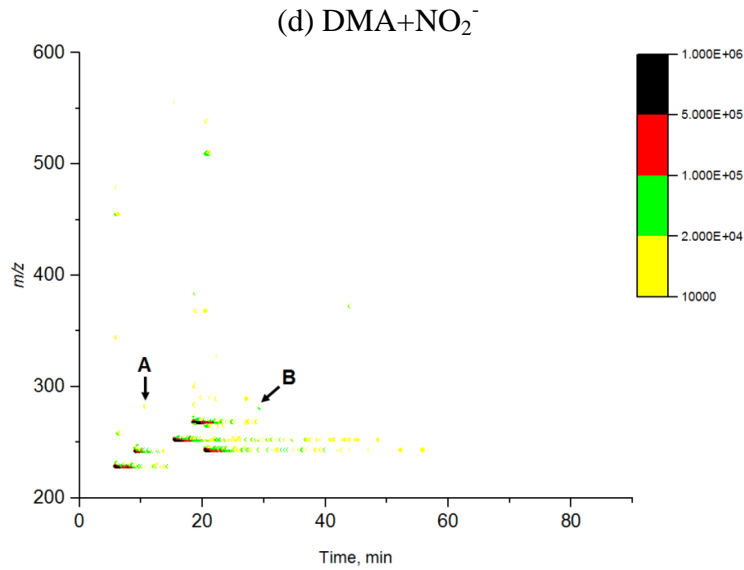


(b) NDMA (低劑量:2.5 mg/kg bw)



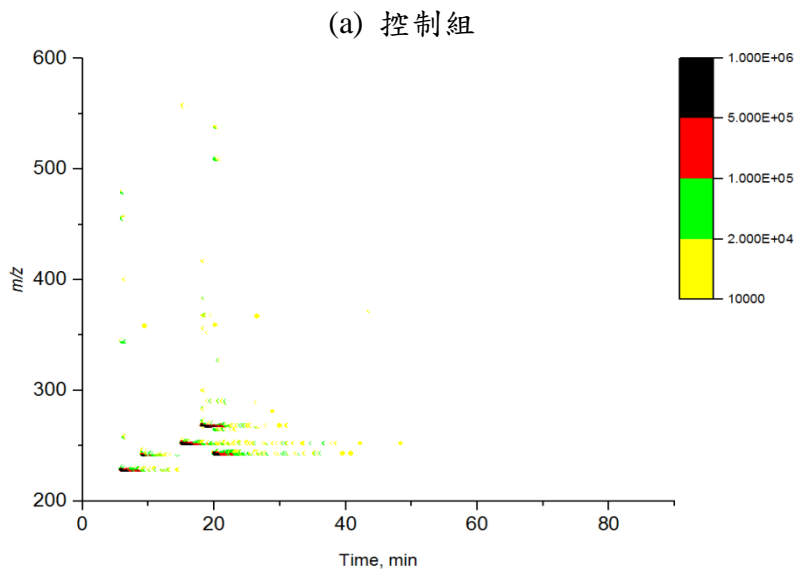
(c) NDMA (高劑量:10 mg/kg bw)



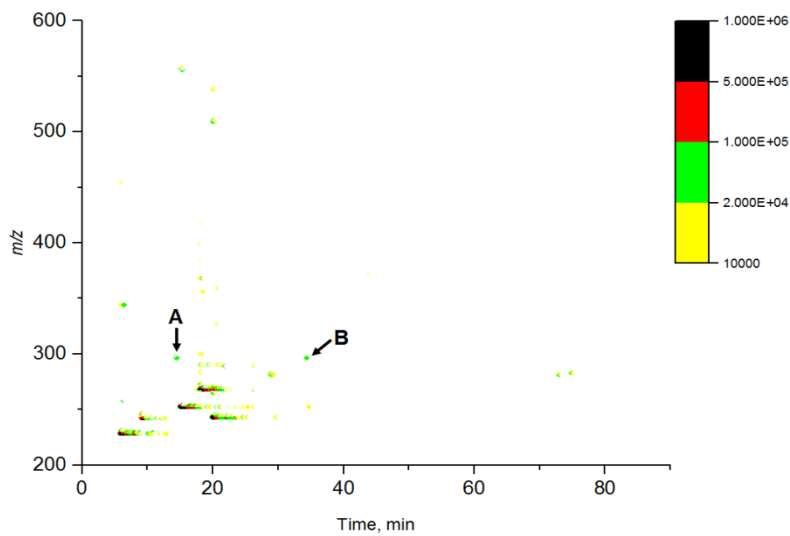


圖十三、小鼠暴露不同濃度 NDMA 與前驅物質 (DMA/NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) 的 adductome map

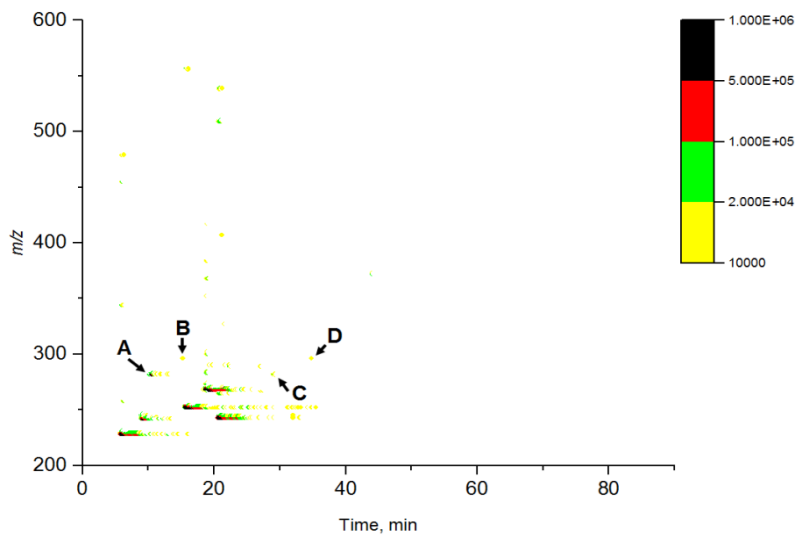
圖十四為給予小鼠 NDEA 與 NMEA 後的 adductome map。(a) 控制組與 (b) 暴露 NDEA 相比，可分別於層析時間 14.5 分鐘 (訊號 A) 與 34.3 分鐘 (訊號 B) 出現新訊號，產生訊號之  $m/z$  為 296 [M + H]<sup>+</sup>，其分子量應為 295。相似於 NDMA 的暴露，NDEA 於體內代謝後容易造成 guanine 鹼基上 N7 與 O<sup>6</sup> 位置被乙基修飾取代，因此推測所觀察的訊號 A 與 B 應是由 N7-ethyl-2'-deoxyguanosine (N7-EtdG) 及 O<sup>6</sup>-ethyl-2'-deoxyguanosine (O<sup>6</sup>-EtdG) 所產生。此外，當給予 (c) 會同時產生甲基與乙基鍵結的 NMEA 時，adductome map 上確實發現  $m/z$  282 於 10.7 (訊號 A) 與 28.8 分鐘 (訊號 C) 出現新訊號，且  $m/z$  296 於 14.5 (訊號 B) 與 34.3 分鐘 (訊號 D) 也有新訊號，因此推斷 NMEA 暴露後可產生 N7-MdG、O<sup>6</sup>-MdG、N7-EtdG 與 O<sup>6</sup>-EtdG 等鍵結修飾產物。經由動物實驗搭配 DNA adductomics 分析可全面性的找出具特徵 adducts，證實暴露 *N*-nitrosamines 經體內代謝後，能形成許多不同修飾鍵結的 DNA adducts。



(b) NDEA



(c) NMEA



圖十四、小鼠暴露 NDEA 與 NMEA 的 adductome map

#### (5) MRM 模式下定量分析暴露亞硝胺的小鼠肝臟與尿液中 DNA adducts

為驗證前述 DNA adductomics 分析所觀察到鹼基上的甲基化與乙基化修飾，本研究將小鼠肝臟萃取出 DNA 進行酸熱水解以釋放修飾鹼基，再利用 on-line SPE LC-QqQ MS 以高靈敏與特異性的多重反應監控掃描模式 (Multiple reaction monitoring, MRM) 進行 N7-MG、O<sup>6</sup>-MG、N3-MA 與 N7-EtG 的定量分析。

表一結果顯示，N7-MG 可在控制組的小鼠肝臟 DNA 中微量檢出，背景值約在 0.009 nmole/mg DNA 左右。當暴露 NDMA 的高、低劑量組時，N7-MG 顯著上升 (1.210 與 0.287 nmole/mg DNA)；給予前驅物質 DMA 與 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 時其 N7-MG 測出量較低 (0.062 nmole/mg DNA)，此現象也與前述的 adductome map 結果相同。O<sup>6</sup>-MG 也在小鼠暴露 NDMA、NMEA 與 DMA+NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 中量測到。NDMA 的高、低劑量組及 DMA+NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 中 O<sup>6</sup>-MG 與 N7-MG 的

莫耳比分別是 1:17.6, 1:7.3 及 1:6.9，其相對比例符合文獻的報導 [Beranek. 1990]。由於 N3-methyl-2'-deoxyadenosine (N3-MdA) 不穩定易自動去嘌呤，根據文獻報導 N3-MdA 於 DNA (pH = 7, 39°C) 的半衰期約為 30 個小時 [Osborne MR et al. 2000]，於體內進一步形成 N3-MA 再排出至尿液，因此組織中 N3-MA 皆低甚至無法測出。N7-EtG 可於會造成乙基化修飾鍵結的 NDEA 與 NMEA 暴露小鼠肝臟中量測到，其含量分別為 0.052 與 0.007 nmole/mg DNA。

表一、小鼠肝臟經酸熱水解後之鹼基全定量數據 (n = 3)

	N7-methylguanine (nmole/mg DNA)	O <sup>6</sup> -methylguanine (nmole/mg DNA)	N3-methyladenine (nmole/mg DNA)	N7-ethylguanine (nmole/mg DNA)
Control	0.009	ND	ND	ND
NDMA-low	0.287	0.016	0.003	ND
NDMA-high	1.210	0.166	0.010	ND
NDEA	0.007	ND	ND	0.052
NMEA	1.348	0.196	0.013	0.007
DMA+NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0.062	0.001	ND	ND

表二顯示小鼠尿液經 LC-QqQ MS MRM 分析結果，尿液中 DNA adducts 主要來自於體內的修復產物。N7-MG 可在控制組小鼠尿液中測出且隨著 NDMA 的暴露劑量而上升。而尿液中 O<sup>6</sup>-MG 皆無法量測到，因為體內 O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) 酵素，可直接將 O<sup>6</sup>-MG 甲基移除後修復回 guanine [Christmann et al. 2012]。由於 N3-MdA 於體內會快速轉變為 N3-MA 而排至尿液，因此小鼠尿液中的 N3-MA 與 N7-MG 有相似的趨勢。N7-EtG 可於暴露 NDEA 與 NMEA 的小鼠尿液中測得。

表二、小鼠尿液經酸熱水解後之鹼基全定量數據

	N7-methylguanine (µg/g bw)	O <sup>6</sup> -methylguanine (µg/g bw)	N3-methyladenine (µg/g bw)	N7-ethylguanine (µg/g bw)
Control	37.8	ND	0.8	ND
NDMA-low	50.3	ND	1.1	ND
NDMA-high	68.3	ND	1.5	ND
NDEA	-	ND	-	1.4
NMEA	62.8	ND	1.0	0.1
DMA+NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	49.7	ND	0.6	ND

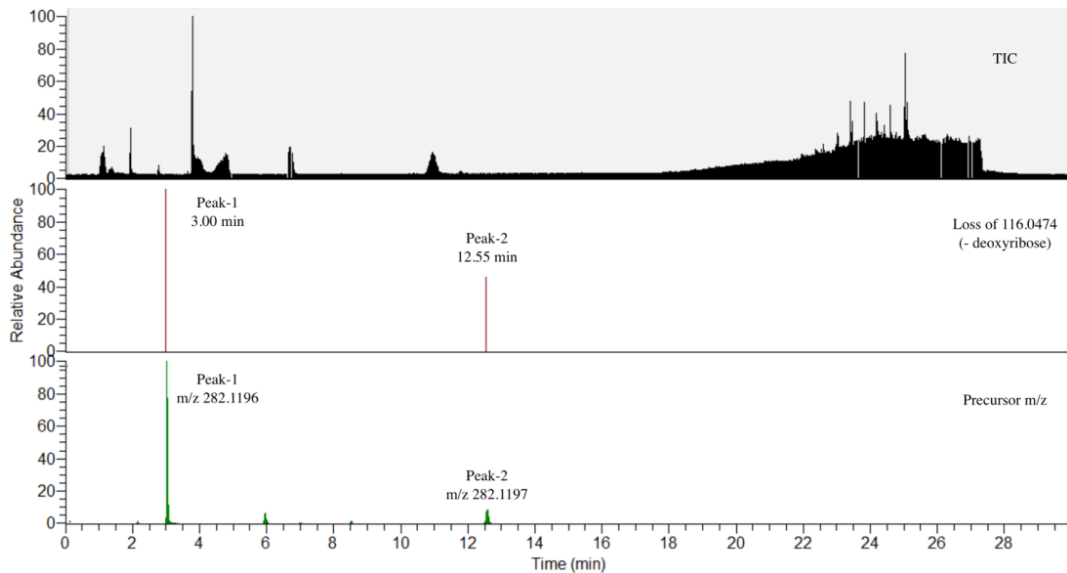
## (6) 運用高解析質譜 (UPLC-HRMS) 進行老鼠肝臟的 DNA adductomics 分析

本研究利用運用 UPLC-HRMS 嘗試分析暴露 NDMA 後的小鼠肝臟，觀察是否有甲基化鍵結修飾的特徵核苷出現。實驗採用 data dependent (DD)-CNL-MS<sup>3</sup> 掃瞄模式 (圖三)，當全掃瞄中的離子強度大於設定值 7500 時，系統自動將此母離子 *m/z* 提取出來進行第一次碰撞碎裂 (MS<sup>2</sup>)，利用碎裂後的子離子清單與母離子 *m/z* 進行比對，計算有無 116.0474 (去氧核糖) 的質量差。若該分子有 116.0474 (去氧核糖) 的質量差，系統將自動提取該子離子 *m/z* 進行第

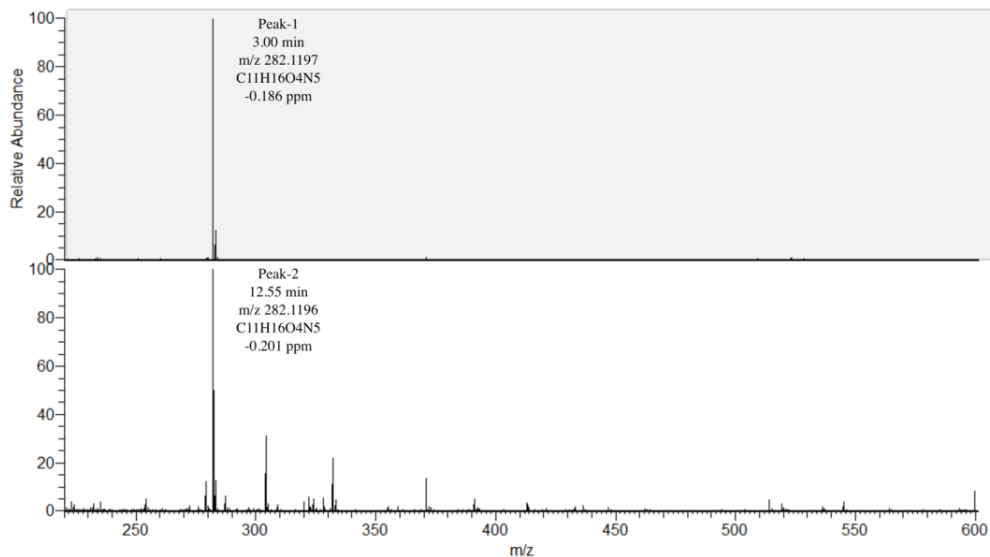


二次碰撞碎裂 (MS<sup>3</sup>)。

下圖十五為運用高解析質譜 DD-CNL-MS<sup>3</sup> 的分析結果，從圖譜中我們可以明顯發現有質量差 116.0474 的波峰 (失去去氧核糖)，分別為 3.00 (peak-1) 與 12.55 分鐘 (peak-2)。Peak-1 是由母離子  $m/z$  282.1196 所產生；Peak-2 則是由母離子  $m/z$  282.1197 所產生。利用軟體可將所量測之  $m/z$   $[M+H]^+$  計算出化學分子式為 C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>N<sub>5</sub> (peak-1 與 2)，如下圖十六。利用化學分子式便可利用搜尋引擎找出可能的化合物身份，從搜尋結果中篩選具核苷結構，便可推測 peak-1 可能為 N<sup>7</sup>-MdG；而 peak-2 可能為 O<sup>6</sup>-MdG。



圖十五、小鼠暴露 NDMA 的 DNA adductomics 高解析質譜分析結果



圖十六、藉由量測之準確質量  $m/z$  計算其化學分子式

##### (五) 參考文獻

Balbo S, Turesky R, Villalta P. DNA adductomics. *Chemical Research in Toxicology*. 2014. 27(3):356-366.

- Balbo S, Hecht SS, Upadhyaya P, Villalta PW. Application of a high-resolution mass-spectrometry-based DNA adductomics approach for identification of DNA adducts in complex mixtures. *Analytical Chemistry*. 2014. 86(3):1744-1752.
- Beranek DT. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutation Research*. 1990. 231(1):11-30.
- Chao MR, Wang CJ, Yen CC, Yang HH, Lu YC, Chang LW, Hu CW. Simultaneous determination of N7-alkylguanines in DNA by isotope-dilution LC-tandem MS coupled with automated solid-phase extraction and its application to a small fish model. *The Biochemical journal*. 2007. 402(3):483-90.
- Chao MR, Yen CC, Hu CW. Prevention of artifactual oxidation in determination of cellular 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine by isotope-dilution LC-MS/MS with automated solid-phase extraction. *Free Radical Biol Med*. 2008 44(3): 464-473.
- Christmann M, Kaina B. O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT): impact on cancer risk in response to tobacco smoke. *Mutation Research*. 2012. 736(1-2):64-74.
- Hu CW, Huang YJ, Li YJ, Chao MR. Correlation between concentrations of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in urine, plasma and saliva measured by on-line solid-phase extraction LC-MS/MS. *Clinica Chimica Acta*. 2010. 411(17-18):1218-1222.
- Hu CW, Chen CM, Ho HH, Chao MR. Simultaneous quantification of methylated purines in DNA by isotope dilution LC-MS/MS coupled with automated solid-phase extraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012. 402(3):1199-1208.
- Jourd'heuil D, Kang D, Grisham MB. Interactions between superoxide and nitric oxide: implications in DNA damage and mutagenesis. *Front Biosci*. 1997. 2:d189-196.
- Osborne MR, Phillips DH. Preparation of a methylated DNA standard, and its stability on storage. *Chemical research in toxicology*. 2000. 13(4):257-61.
- Singh R, Teichert F, Seidel A, Roach J, Cordell R, Cheng MK, Frank H, Steward WP, Manson MM, Farmer PB. Development of a targeted adductomic method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbon DNA adducts using online column-switching liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2010. 24(16):2329-2340.

## (六) 成果自評

*N*-nitrosamines 暴露對人體的健康危害，已經無庸置疑。它們在生物體內可形成的 DNA adducts 種類繁多，先前的研究皆由鎖定特定化合物來探討各別形成的 DNA adducts，但都無法完整且同一時間描述 *N*-nitrosamines 暴露所造成的 DNA 鹼基修飾全貌。本研究利用 LC-QqQ MS 進行 DNA adductomics 分析，能快速篩選出 *N*-nitrosamines 暴露所造成的關鍵 DNA adducts，如：N7-MdG 與 O<sup>6</sup>-MdG 來自於 NDMA 暴露；N7-EtdG 與 O<sup>6</sup>-EtdG 來自於 NDEA 的暴露。而我們嘗試運用 UPLC-HRMS 於 adductomics，更有利於核苷的精準篩選 (116.0474) 與未知鹼基修飾的定性。本研究的成果有助於 *N*-nitrosamines 致癌機制的深入探討，對於國民健康品質的保障，將有實質上的貢獻。同時，在本研究的支持下 2016 年發表 DNA 的硝化傷害產物質譜分析法” Comprehensive analysis of the formation and stability of peroxy nitrite derived 8-nitroguanine by LC-MS/MS: Strategy for the quantitative analysis of cellular 8-nitroguanine.” 於國際知名期刊 *Free Radical Biology and Medicine* (Impact factor = 5.784)；

2014 年發表香菸特有亞硝胺造成 DNA 甲基化損傷證據” 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. ” 於國際知名期刊 *Archives of Toxicology* (Impact factor = **6.637**).

子計畫五	計畫主持人：王祖興 教授
運用蛋白質體學評估亞硝胺所造成的蛋白質修飾	

### (一) 前言

多數亞硝胺具有強烈的致癌性質，廣泛的存在食物、香菸及檳榔中，以香煙中的濃度較高 [Hecht, 2014; Hoffmann et al., 1994]。食物中的亞硝胺來源主要有三大來源：(1) 含亞硝酸鹽食物與含胺類食物混合食用形成。(2) 直接食用或曝露含亞硝胺的食物。(3) 含硝酸鹽的蔬菜或食物，由腸胃道細菌代謝後，產生亞硝酸鹽；或蛋白質食物經腸胃細菌代謝成硝酸鹽，經由唾液分泌，由口腔細菌分解為亞硝酸鹽，可能會在腸胃道中合成亞硝胺。在飲食中出現的典型亞硝胺約有 8 種，包括 NDEA、NDMA、NDPA、NDBA、NMEA、NMor、NPip 及 NPyrr，其中最早被發現也是最常出現的為 *N*-亞硝基二甲胺 (NDMA)，因此 NDMA 也是研究亞硝胺毒性及致癌性的代表性化合物。在動物實驗中，亞硝胺有強烈肝毒性會引起肝炎、肝硬化，而且會引起口腔、食道、鼻、氣管、肺、肝及胰臟等癌症 [Jakszyn & Gonzalez, 2006]。亞硝胺對核酸及蛋白質具有強烈的修飾作用 (modification)，在 DNA、RNA 及蛋白質分子上形成烷基化內轉體 (alkylated adduct)，在 DNA 上所累積之烷基化內轉體未被清除修補，普遍被認為是亞硝胺造成多種癌症形成的重要機制 [Verna et al., 1996; Shuker & Bartsch, 1994]。

除 DNA 修飾作用之外，亞硝胺曝露在蛋白質上所引發的烷基化修飾作用及可能之生理影響，則較少被探討。近年來，蛋白質烷基(甲基化)在癌細胞生長、轉移及訊號傳遞途徑上均扮演重要角色。蛋白質發生甲基化的位置通常在精胺酸 (arginine) 及離胺酸 (lysine) 殘基上，蛋白質發生甲基化將直接影響其分子穩定性及酵素活性 [Egorova et al., 2010; Yang et al., 2009]，或間接影響與蛋白質或 DNA 之交互作用 (interaction)，也可能造成蛋白質在細胞內的分佈改變，進而調節細胞內訊息傳遞及基因之表現，例如甲基化組蛋白 (histone) 將造成與 DNA 鍵結能力之改變，進而抑制或增強特定基因之表現程度 [Liu et al., 2014]；修克蛋白 70 (HSP70) 甲基化後，將由細胞質為主分佈轉變為以細胞核分佈為主 [Cho et al., 2012]。另外，許多的研究報告也指出：多種腫瘤抑制蛋白也發生甲基化作用且改變其功能，它們包括 BRCA1 及 P53 蛋白質 [Guendel et al., 2010; Jansson et al., 2008]，這些數據指出：亞硝胺所導致的蛋白質烷(甲)基化，在其所誘發的癌症及病變上可能扮演重要的角色，相當值得研究加以探討了解。

### (二) 研究目的

本子計畫基本目的包括：(1) 解答 NDMA 是否在肝臟及血管內皮細胞造成特定蛋白質之烷(甲)基化作用？(2) 確認 NDMA 甲基化蛋白質對其功能之影響，(3) 建立解特定 NDMA 甲基化蛋白質 (生物標籤) 在人類族群中分佈與實際體內 NDMA 濃度間相關性等三大議題。

### (三) 研究方法

本研究計畫探討第二年，將以 NDMA 分別處理人類臍靜脈內皮 EA.hy926 細胞 (EA.hy926) 及人類正常肝臟細胞 (WRL-68)，比較 NDMA 在兩種不同細胞之細胞毒性及基因毒性，以及對細胞蛋白質甲基化圖譜 (profile) 之分析。細胞毒性及基因毒性分別以結晶紫染色法 (crystal violet

staining)及彗星分析法(comet assay)進行測量;蛋白甲基化則利用一維及二維免疫西方轉漬法結合對抗精胺酸 (arginine)或離胺酸(lysine)抗體進行測量,特定甲基化蛋白質之身份鑑定則委託中興大學生物科技發展中心蛋白質譜分析實驗室進行質譜定序分析確認身分。

### 3.1 人類臍靜脈內皮 EA.hy926 細胞 及人類正常肝細胞培養

人類臍靜脈內皮EA.hy926細胞 (EA.hy926)及人類正常肝細胞(WRL-68),分別以DMEM(內含有10% FBS、1% Penicillin-Streptomycin)培養液及DMEM(內含10% FBS、1% non-essential amino acids,1% Penicillin-Streptomycin)培養液進行培養,培養環境為內含5% CO<sub>2</sub>的恆濕37°C培養箱中。培養基每二日更換一次,細胞生長達八成滿時進行稀釋分盤,稀釋比為5:1。

### 3.2 細胞毒性分析

將細胞  $3 \times 10^4$  cells /well 種於 24 孔盤中,置於培養箱中培養,隔天加入不同濃度的 NDMA (0-1-5 mM)處理 24 小時。接著去除含藥之培養基,以 PBS 清洗兩次,以 300  $\mu$ L 70% ethanol 固定細胞 15 分鐘,去除 ethanol 後,以 300  $\mu$ L 0.1% crystal violet 染色細胞 30 分鐘,將 24 孔盤浸入流水中搖晃清洗多餘的染劑,並在室溫中將孔盤風乾。以 300  $\mu$ L 0.2% Triton X-100 處理 1 小時,將細胞穿孔並溶出染劑,最後取溶解液 100  $\mu$ L 到 96 孔盤,以五合一多功能光譜儀 (FlexStation® 3 Benchtop Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Devices, Germany)測量波長 590 nm 處的吸光值,作為細胞數目之判斷依據。

### 3.2 彗星分析法

彗星分析(Comet Assay)廣泛應用於單細胞 DNA 損傷的測量。細胞經 NDMA 處理後,以 trypsin 分解方式收集細胞,並且製成細胞凝膠玻片,每片細胞玻片含約  $1 \times 10^5$  個細胞。將細胞玻片的蓋玻片小心移除,浸入細胞溶解液(2.5 M NaCl、100 mM EDTA、10 mM Tris base、200 mM NaOH、34.1 mM *N*-Lauroylsarcosine sodium salt、1% Triton X-100、10% DMSO)中,進行細胞膜溶解 1 小時,將細胞玻片取出並以大量 RO 水清洗,排列於內含約 2 公升電泳液約(1 mM EDTA、300 mM NaOH, pH 13)的電泳槽中,浸泡 20 分鐘,進行 DNA 雙股解旋,然後以起始安培數為 300 mA、電壓為 25 伏特,進行電泳 20 分鐘,電泳結束後以中和液(400 mM Tris base, pH 7.4)沖洗膠片 3~5 次,使 DNA 雙股復原,最後以 75  $\mu$ L EtBr (2  $\mu$ g/mL)染色細胞 DNA,蓋上蓋玻片,置於暗盒中,隔日以螢光顯微鏡觀察,並利用 Comet assay III 軟體(Perceptive Instruments, UK)分析細胞 DNA 之拖曳長度百分比及亮度的積分為 Tail Moment (TM)值,作為 DNA 傷害程度的判斷。

### 3.3 蛋白質甲基化分析

細胞經處理後,以細胞溶解液瓦解細胞,收集總細胞溶解物(whole cell lysate)並以離心方式去除細胞殘渣,以BSA為標準定量總細胞溶解物之蛋白質濃度,小量分裝後冷凍等待分析。蛋白質甲基化利用抗賴氨酸(lysine)甲基化及抗精氨酸(arginine)抗體之西方轉漬方法進行測量。蛋白質甲基化之圖譜分析則利用抗賴氨酸甲基化及抗精氨酸抗體之二維西方轉漬方法進行測量。進一步確認特定蛋白質甲基化,將採用免疫沉澱方法,先把NDMA甲基化的蛋白質以抗賴氨酸抗體及蛋白質G凝膠球(protein A bead)沉澱分離,經二維電泳後,再以特定蛋白質之抗體(抗

GRP75及抗vimentin抗體)進行測量。

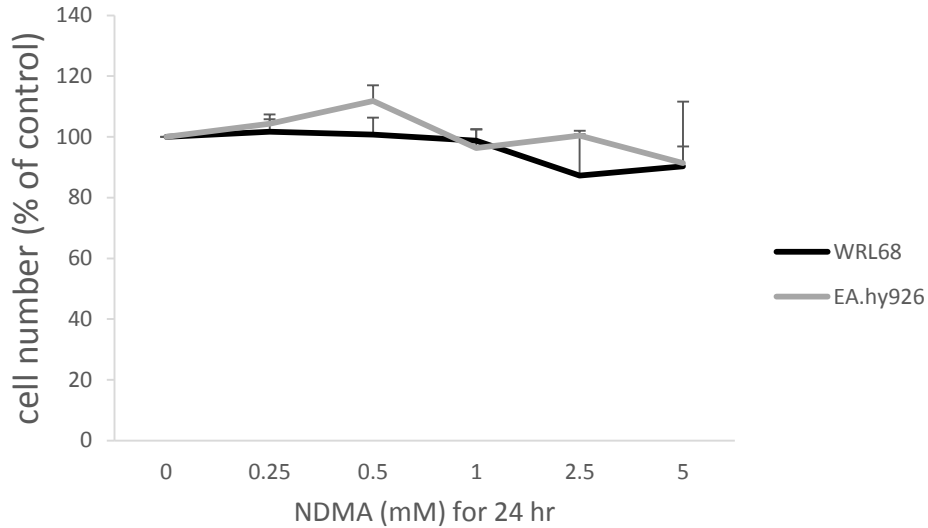
### 3.4統計分析

各組試驗所得數據以平均值加減標準偏差 (Mean  $\pm$  SD) 方式表示；試驗統計分析採用 Microsoft Office Excel 2010 電腦統計套裝軟體中的 Student's *t*-test 進行統計分析，並以  $P < 0.05$  作為試驗數據間是否達到顯著性差異之標準檢測。

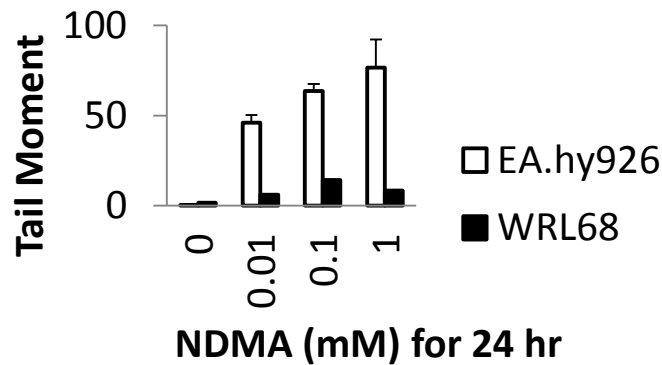
## (四) 結果

### 4.1 N-亞硝基二甲胺之細胞毒殺性及基因毒性

人類臍靜脈內皮 EA.hy926 細胞 EA.hy926 及人類正常肝細胞 WRL-68，分別處理 0、1、5 mM N-亞硝基二甲胺(NDMA)24 小時或 48 小時，都不會明顯造成細胞增生抑制，進而降低其細胞數目，其活細胞比例相對於未加藥對照組均在 90% 以上(圖一)。以慧星分析測量 NDMA 在 EA.hy926 及 WRL-68 細胞之基因毒性，結果卻發現 NDMA 處理造成極為明顯的 DNA 傷害，在低濃度( $< 0.01$  mM)即可造成強烈的細胞核 DNA 傷害數值(Tail Moment)(圖二)，其作用敏感性至少是細胞毒殺性的 500 倍以上，此種低細胞毒性-高遺傳毒性特色與 NDMA 已知的強烈致癌性是相互吻合的。另外，這種作用特色在人類臍靜脈內皮 EA.hy926 細胞 及人類肝細胞均極為相似，間接說明 NDMA 在細胞中的代謝活化機制，可能普遍性的存在不同型態細胞中，至少在血管內皮細胞及肝細胞都明顯存在此一活化系統。先前研究報告指出 NDMA 在人類細胞中主要是被細胞色素 P450 酵素(CYP2E1 及 CYP2A6)活化形成烷化物(Kusida et al., 2000)。在人類臍靜脈內皮 EA.hy926 細胞 (HUVEC)中也被偵測到有恆常性表達多種細胞色素 P450 酵素，包括 CYP1A1、CYP1A2、CYP2E1 及 CYP3A，這些酵素對循環性毒物前體的代謝命運的決定具有重要的角色(Farin et al., 1994)。綜合上述數據對 NDMA 在人體中之代謝及毒性的轉變過程，提供重要運作模型的解釋：NDMA 被吸收進入血流，在血管內皮細胞可進行明顯的代謝活化，造成血管內皮細胞的損傷，運行至肝臟將再次進行代謝活化，甚至累加性(additive)造成肝細胞損傷，最終造成肝癌的形成。肝細胞中 CYP450 酵素的表現，包括 CYP2E1 及 CYP2A6 都可能因特定毒物的曝露而增加其表現量，如乙醇及尼古丁(Rahnasto-Rilla, 2012; Yongvanit et al., 2012)，也支持我們上述所提出的解釋模型。進一步了解 CYP2E1 及 CYP2A6 在 NDMA 造成人類臍靜脈內皮 EA.hy926 細胞 及肝細胞遺傳毒性的角色，仍需進一步試驗來加以證明。



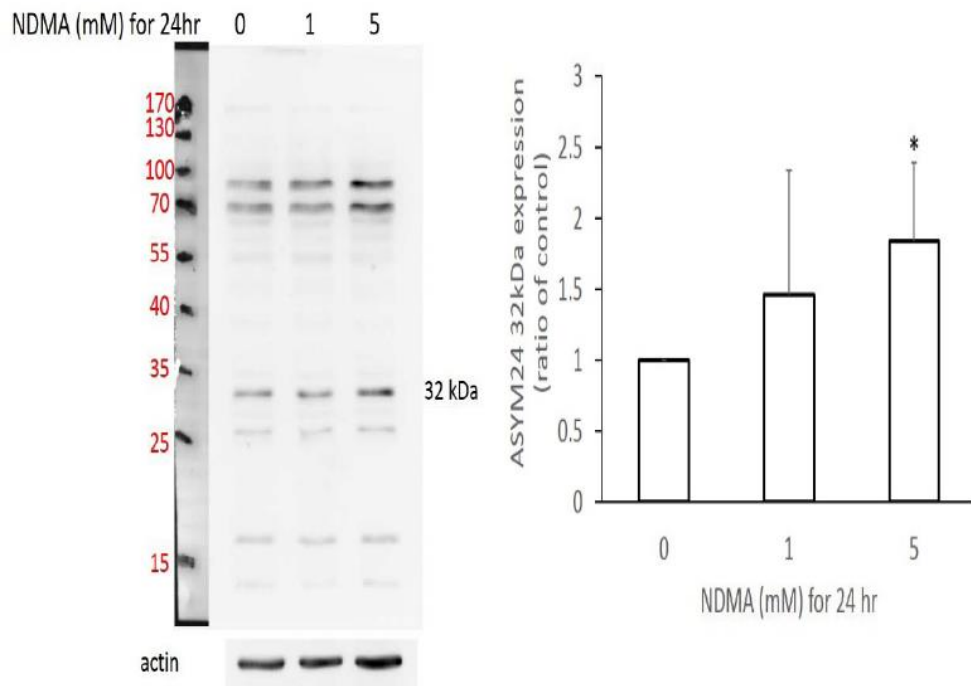
圖一、N-亞硝基二甲胺在人類血管內皮及人類正常肝細胞所造成的細胞毒殺性。人類臍靜脈內皮 EA.hy926 細胞 (EA.hy926)及人類正常肝細胞(WRL-68) 細胞，分別處理不同濃度 N-亞硝基二甲胺(N-Nitrosodimethylamine, NDMA) 24 小時，細胞毒殺性以結晶紫染色法進行測量。將對照組之數值設為 100%。數據為三次試驗平均值 ± 標準機差。



圖二、N-亞硝基二甲胺在人類血管內皮及人類正常肝細胞所造成的遺傳毒性。人類臍靜脈內皮 EA.hy926 細胞 (EA.hy926)及人類正常肝細胞(WRL-68)，分別處理不同濃度二甲基亞硝胺(N-Nitrosodimethylamine, NDMA)24 小時，細胞遺傳毒性以慧星分析方法進行測量。數據為三次試驗平均值 ± 標準機差。

#### 4.2 二甲基亞硝胺在人類內皮細胞造成之蛋白甲基化

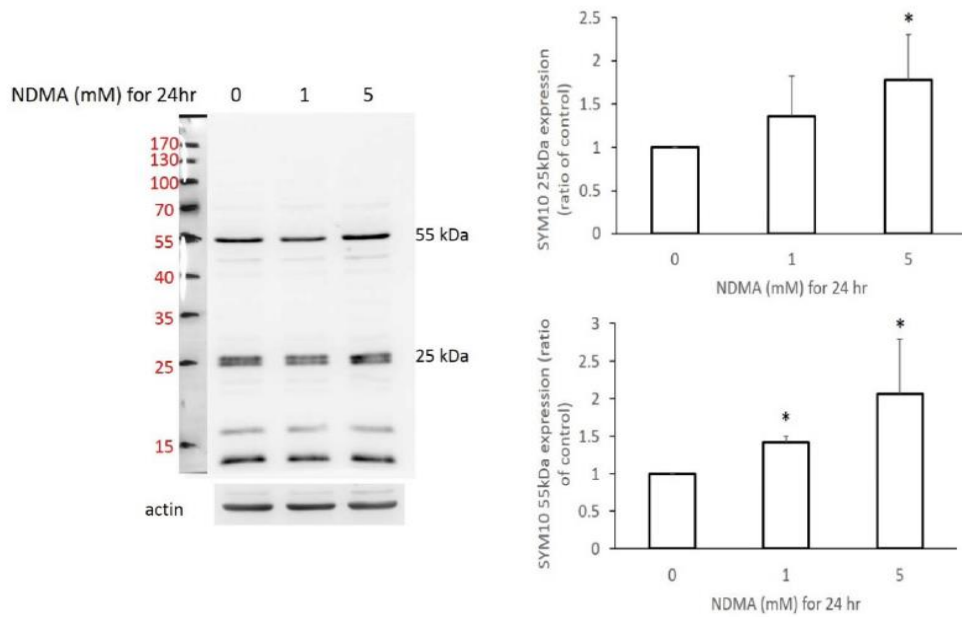
以不同濃度 NDMA (0、1 mM、5 mM)分別處理細胞 24 小時，以對抗非對稱型二甲基精胺(asymmetric arginine dimethylation)抗體，測量細胞內蛋白質甲基化在一維 SDS-PAGE 之圖譜，結果發現 NDMA 處理在分子量 32 kDa 蛋白質處有明顯的甲基化訊號，而且隨 NDMA 處理劑量升高，蛋白甲基化訊號也隨之明顯增加，NDMA 5 mM 處理組在 32 kDa 蛋白質基化訊號強度約為不處理組的 1.8 倍(圖三)。



圖三、NDMA 在 24 小時造成人類臍靜脈內皮細胞 (EA.hy926) 細胞內非對稱型二甲基精胺酸表現量之影響。將 EA.hy926 種於 6 cm 盤中，生長至八分滿時以 NDMA (1 mM 及 5 mM) 分別處理細胞 24 小時，收集細胞並製備總細胞溶解物，立用西方墨點法測量非對稱型二甲基精胺酸表現量。對照組數據設為 1，計算處理組相對於對照組比值。數據為 5-6 次試驗平均值  $\pm$  標準機差。

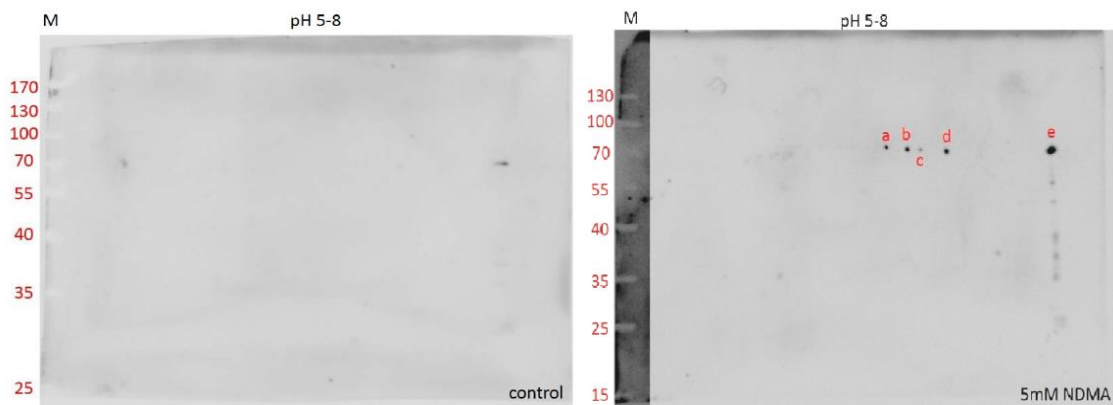
相同的 NDMA 處理條件，以對抗對稱型二甲基精胺酸 (symmetrica arginine dimethylation) 抗體測量細胞內蛋白質甲基化在一維 SDS-PAGE 之圖譜，結果發現 25 kDa 及 55 kDa 蛋白質之甲基化程度明顯因 NDMA 處理濃度增加而增加 (圖四)，相對於對照組其增加程度分別 1.8 倍及 2.1 倍。





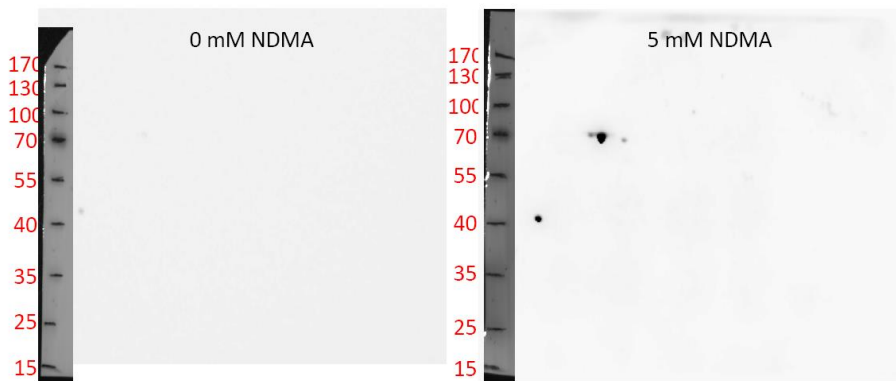
圖四、二甲基亞硝胺在人類臍靜脈內皮細胞對蛋白質甲基化之影響。精胺酸表現量之影響。(將 EA.hy926 種於 6 cm 盤中，八分滿時以 NDMA (0-5 mM) 處理細胞 24 小時。使用西方墨點法觀察非對稱型二甲基精胺酸表現量。對照組數據設為 1，計算處理組相對於對照組比值。數據為五到六次試驗平均值  $\pm$  SD。)

利用二維西方轉漬分析技術，進一步檢測 NDMA 處理所誘發蛋白質值甲基化作用，在未使用對抗甲基化胺基酸抗體時，比較 NDMA 24 小時處理下，基礎蛋白質點圖譜發現：NDMA 處理並未造成蛋白質點圖譜與未處理組間之明顯差異。此結果顯示 NDMA 處理，並不會明顯改變細胞基因表現，進而導致蛋白質表現量的改變。以抗非對稱型二甲基精胺酸抗體，測量二維蛋白質點甲基化之圖譜，卻發現 5 mM NDMA 24 小時處理，細胞蛋白質二維電泳圖譜，在 70 kDa 附近有數個蛋白質點呈現明顯的甲基化訊號，依 pH 不同有 a (77 kDa, pH6.6)、b (72 kDa, pH6.7)、c (72 kDa, pH6.75)、d (70 kDa, pH6.9)、e (70 kDa, pH7.6) 等五個蛋白質點(圖五)。



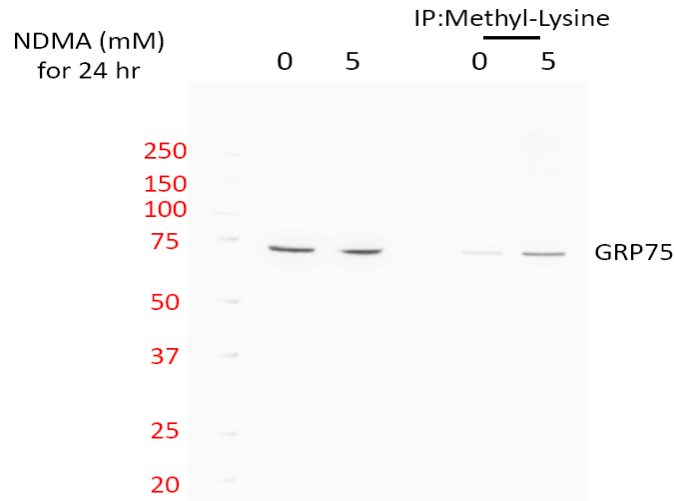
圖五、二甲基亞硝胺在人類臍靜脈內皮 EA.hy926 細胞 對蛋白質甲基化的影響。人類血管內皮 EA.hy926 細胞以 5 mM 二甲基亞硝胺(NDMA)處理 24 小時，蛋白質甲基化以非對稱型二甲基精胺酸抗體染色之二維西方轉漬法進行測量。

歸納多次二維西方轉漬法所到的甲基化蛋白質點圖譜的數據發現：NDMA 處理下，在人類血管內皮 EA.hy926 細胞主要發生甲基化的蛋白質點，分子量集中在 70 kDa，挖取蛋白質點進行身分鑑定，確認該蛋白質為 GRP75 (glucose-regulated protein 75)。由於蛋白質發生甲基化的氨基酸殘基，除精氨酸之外，賴氨酸也是常發生的殘基，因此，本計畫也利用抗賴氨酸甲基化抗體之二維西方轉漬方法，測量 NDMA 在人類臍靜脈內皮 EA.hy926 細胞 所導致的蛋白質甲基化。結果發現分子在約 70 kDa 及 42 kDa 處有明顯的甲基化訊號(圖六)，經挖點進行質譜分析確定身份，70 kDa 蛋白質點再次確認為 GRP75 蛋白質，42 kDa 蛋白質點為波形蛋白(vimentin)。



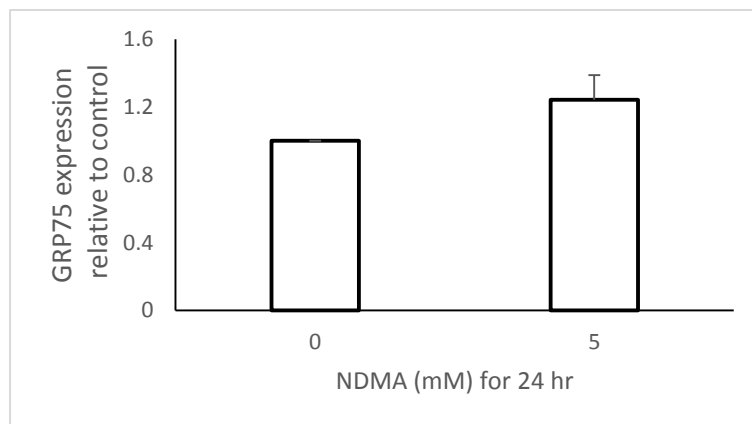
圖六、二甲基亞硝胺在人類臍靜脈內皮 EA.hy926 細胞 對蛋白質甲基化的影響。人類臍靜脈內皮 EA.hy926 細胞 以 5 mM 二甲基亞硝胺(NDMA)處理 24 小時，蛋白質甲基化以賴氨酸甲基化抗體之二維西方轉漬法進行測量。

為進一步證實 GRP75 及 vimentin 蛋白質確為 NDMA 的甲基化標的，利用賴氨酸甲基化抗體先行將甲基化蛋白質族群分離，然後再分別以 GRP75 或 vimentin 抗體之西方轉漬進行檢測。結果發現 5 mM NDMA 處理下，在甲基化蛋白族群中的甲基化 GRP75 蛋白質確實比無 DNMA 處理的對照組高(圖七)，此結果再次證實人類臍靜脈內皮 EA.hy926 細胞 中 GRP75 蛋白質，確實為 NDMA 導致甲基化的主要標的。GRP75 及 vimentin 甲基化後對其功能有何影響，目前的了解仍非常少，先前的研究報導基本上認為 GRP75 是一細胞凋亡的抑制者，超量表現可以保護細胞抵抗氧化傷害(Xu et al., 2009; Yang et al., 2008)；最近的研究更指出 ROS 可以造成 GRP75 蛋白的磷酸化作用，而且磷酸化態 GRP75 只分佈在細胞質，不會出現在粒線體及細胞核中(Krishna et al., 2007)，據此猜測 GRP75 磷酸化將改變它與其他蛋白質彼此間的交互作用，減少氧化壓力所造成的蛋白質降解代謝，增加細胞的存活。然而，GRP75 抑制細胞凋亡的功能對癌細胞的存活及轉移也將造成潛在危機(Lee et al., 2014; Wadhwa et al., 2006)。Vimentin 在先前的研究報導曾指出可被多種蛋白激酶作用發生磷酸化作用，這些蛋白激酶包括 Cdk1、Rho kinase、PAK1 及 Aurora-B kinase，Vimentin 的磷酸化作用在細胞質分裂的過程扮演重要角色(Sihag et al., 2007)，但至今仍無報導指出 vimentin 會發生甲基化的情形。本計畫所發現的 GRP75 及 vimentin 甲基化是否會造成與磷酸化作用間之競爭，或影響該蛋白之細胞分佈及其他功能仍須進一步了解。

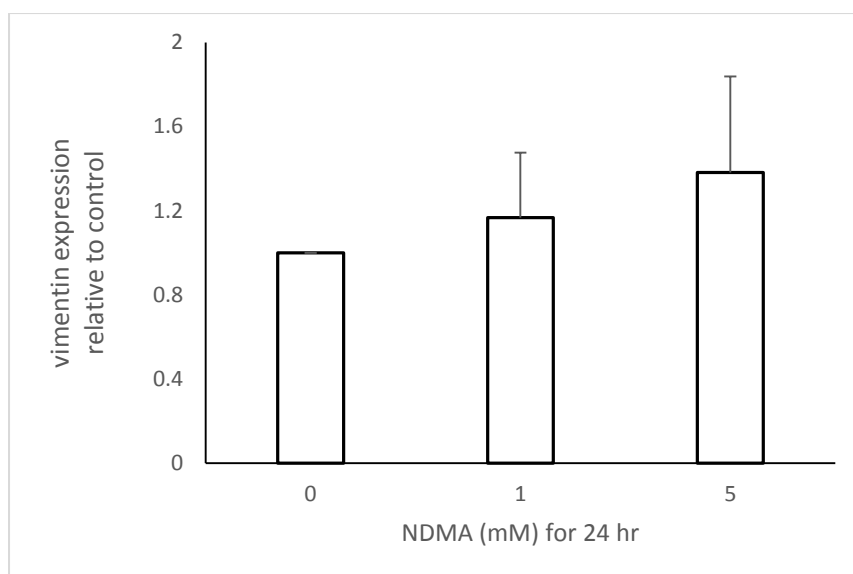


圖七、二甲基亞硝胺在人類臍靜脈內皮 EA.hy926 細胞 對 GRP75 蛋白質的甲基化作用。人類臍靜脈內皮 EA.hy926 細胞 以 5 mM 二甲基亞硝胺(NDMA)處理 24 小時，甲基化蛋白質以賴氨酸甲基化抗體進行免疫沉澱收集，之後再以 GRP75 抗體進行西方轉漬法測量。

綜合上述結果提出 NDMA 曝露，在人類臍靜脈內皮 EA.hy926 細胞 主要發生蛋白質甲基化的蛋白質標的為 GRP75 及 vimentin 蛋白質，而且這兩種蛋白質發生甲基化的氨基酸殘基情形有所不同，GRP75 蛋白質甲基化同時出現在精氨酸及賴氨酸殘基，但 vimentin 的甲基化卻只出現在賴氨酸殘基上，這個現象也間接指出 NDMA 所導致的蛋白質甲基化，可能有兩個不同的方式，一個進行精氨酸甲基化，另一個進行賴氨酸甲基化。另一種可能是 NDMA 所導致的蛋白質甲基化作用只有一種方式，至於甲基化要發生在精氨酸殘基還是賴氨酸殘基是由蛋白質結構來決定，NDMA 如何造成 GRP75 及 vimentin 甲基化的作用細節仍須進一步試驗了解。除發生蛋白質甲基化之外，5 mM NDMA 處理同時也造成 GRP75 及 vimentin 蛋白質表現量的增加(圖八、圖九)，增加的程度相較於無 DNMA 處理的對照組，GRP75 表現增加 24%、vimentin 表現增加 38%。



圖八、二甲基亞硝胺對人類臍靜脈內皮 EA.hy926 細胞 葡萄糖調節蛋白 75 表現之影響。細胞處理不同濃度二甲基亞硝胺(NDMA) 24 小時，之後收集細胞並製備總細胞溶解液，並且以免疫西方轉漬法分析其中 GRP75 的表現量。



圖九、二甲基亞硝胺對人類臍靜脈內皮 EA.hy926 細胞 波形蛋白表現之影響。細胞處理不同濃度二甲基亞硝胺(NDMA) 24 小時，5 之後收集細胞並製備總細胞溶解液，並且以免疫西方轉漬法分析其中 vimentin 的表現量。

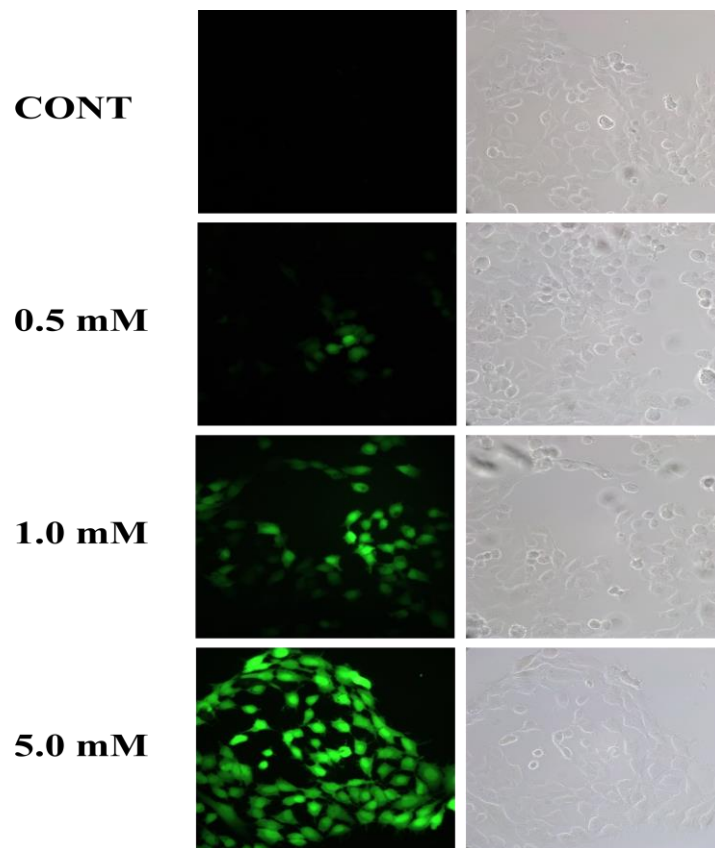
根據本子計畫第二年所有發現，提出下列幾點重要結論：1.NDMA 在人類臍靜脈內皮 EA.hy926 細胞 及人類正常肝細胞均造成明顯的核 DNA 傷害，但均未造成明顯的細胞毒殺性，此特性可解釋 NDMA 的高致癌性。2.NDMA 在人類臍靜脈內皮 EA.hy926 細胞 及人類正常肝細胞均可造成明顯遺傳毒性，而且在人類臍靜脈內皮 EA.hy926 細胞 所產生的遺傳毒性似乎比解毒代謝活性高的肝細胞來得強烈，此現象說明 NDMA 在血管運行時，可能因代謝活化而升高之毒性值得重視。3.NDMA 在人類臍靜脈內皮 EA.hy926 細胞 明顯造成 GRP75 及 vimentin 蛋白的甲基化，因 GRP75 及 vimentin 在之前研究都被證實在癌症形成過程扮演重要角色，因此了解 GRP75 及 vimentin 發生甲基化的機制，以及甲基化後對這兩個蛋白質的功能影響，將對 NDMA 所造成的相關癌症形成提供極為重要的參考。4.除蛋白甲基化之外，NDMA 也造成 GRP75 及 vimentin 蛋白質的表現量增加，而 GRP75 及 vimentin 的表現量增加，將可能增加 DNA 已明顯受傷細胞的存活，進而發啟癌症形成的風險，這個假說值得留意並證實。

#### 4.3 人類肝細胞代謝酵素對二質甲基亞硝胺造成 ROS 產量增加的角色

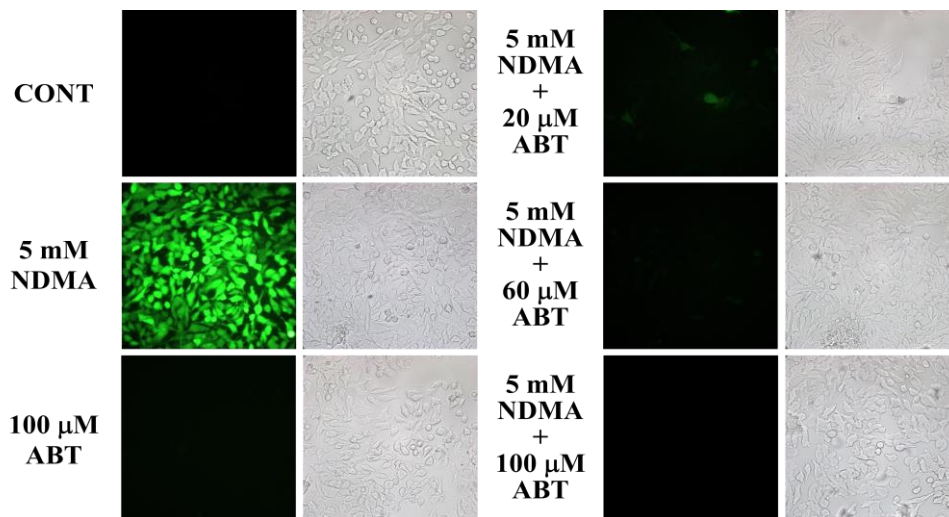
二甲基亞硝胺(*N*-nitrosodimethylamine, NDMA)具有強烈肝臟毒性，屬 IARC 第 2A 類致癌物質。在老鼠模式 NDMA 造成肝纖維化，低劑量長期暴露引發肝臟腫瘤都是證據充分的，然而 NDMA 在人類的毒性效果仍未經試驗確定。本計畫發現 NDMA 在人類正常 WRL-68 肝細胞，造成明顯的 ROS 產量增加現象，而且劑量依賴特性(dose-dependent manner)明顯，ROS 增加倍數依處理濃度 0.5 mM、1 mM 及 5 mM 分別為對照組的 7.8 倍、13.3 倍及 21.2 倍(圖 10)。之後試驗均以 5 mM-24 小時為標準處理條件。

為進一步了解細胞內重要藥物代謝酵素在 NDMA 造成 ROS 產量增加是否扮演角色，本研究採用多種酵素抑制劑進行測試，包括細胞色素 P450 酵素(CYP450)、單胺氧化酶(monoamine oxidase, MAO-A/MAO-B)、黃素單氧化酶(flavin-containing monooxygenase, FMO)及單胺回收(monoamine reuptake)等抑制劑。在 NDMA 處理前 30 分鐘加入 CYP450 廣效型抑制劑

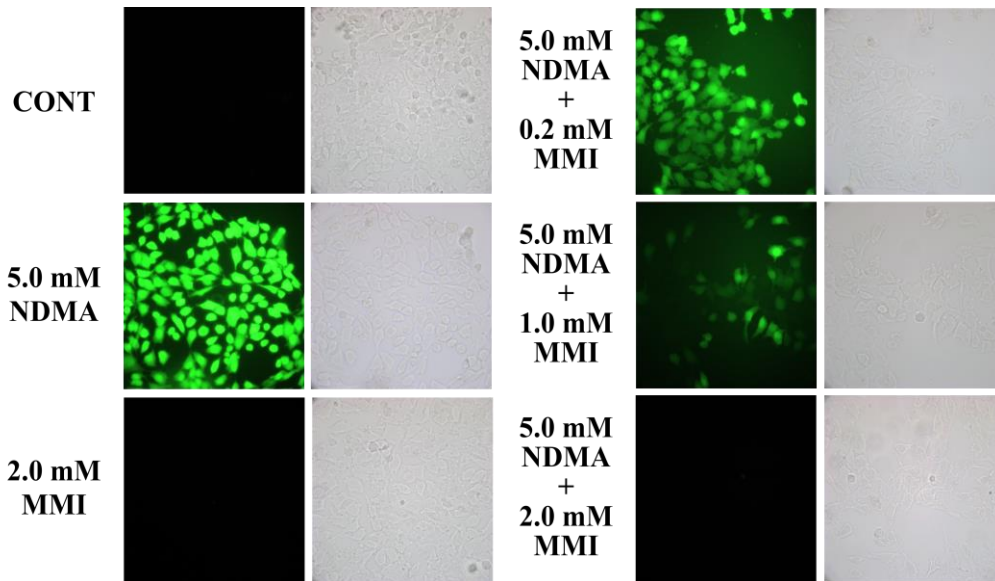
aminobenzotriazole (ABT)，結果發現 ABT 強烈降低 NDMA 在 WRL-68 肝細胞造成的 ROS 產量增加，在濃度 60  $\mu$ M 時，出現最大抑制效果達 95%(圖十一)。處理 FMO (flavin-containing monooxygenase)競爭型抑制劑 methimazole (MMI)，結果也發現 MMI 具有強烈抑制 NDMA 在 WRL-68 肝細胞造成的 ROS 產量增加，在濃度 2 mM 時，出現最大抑制效果達 80%(圖十二)。處理 MAO-A(Monoamine oxidase A) 及 MAO-B(Monoamine oxidase B) 抑制劑 clorgyline(CLORG)、pargyline(PARG)及 selegiline(SELEG)，結果發現 MAO-A 及 MAO-B 抑制劑都能明顯降低 NDMA 在 WRL-68 細胞造成的 ROS 產量增加，但在抑制程度上 MAO-B 抑制劑的比 MAO-A 抑制劑高(圖十三~十五)；另外，單獨處理 MAO-A 抑制劑 CLORG 時，也會造成 WRL-68 細胞 ROS 的產量增加(圖十三)。處理單胺回收抑制劑 imipramine(IMI)，結果發現 IMI 也有抑制 NDMA 在 WRL-68 肝細胞造成的 ROS 產量增加，在濃度 5  $\mu$ M 時，出現最大抑制效果達 82%，但因試驗次數較少尚未達到統計顯著水準(圖十六)。由於 NDMA 在 WRL-68 肝細胞造成明顯 ROS 增加，為進一步了解此 ROS 產生與粒線體間相關性，以粒線體靶向抗氧化劑(Mito-tempo)合併二甲基亞硝酸胺處理，結果發現二甲基亞硝酸胺在 WRL-68 肝細胞造成的 ROS 產量增加，幾乎完全被 Mito-tempo 抑制，處理濃度 100  $\mu$ M 時，抑制效果達 92%(圖十七)。



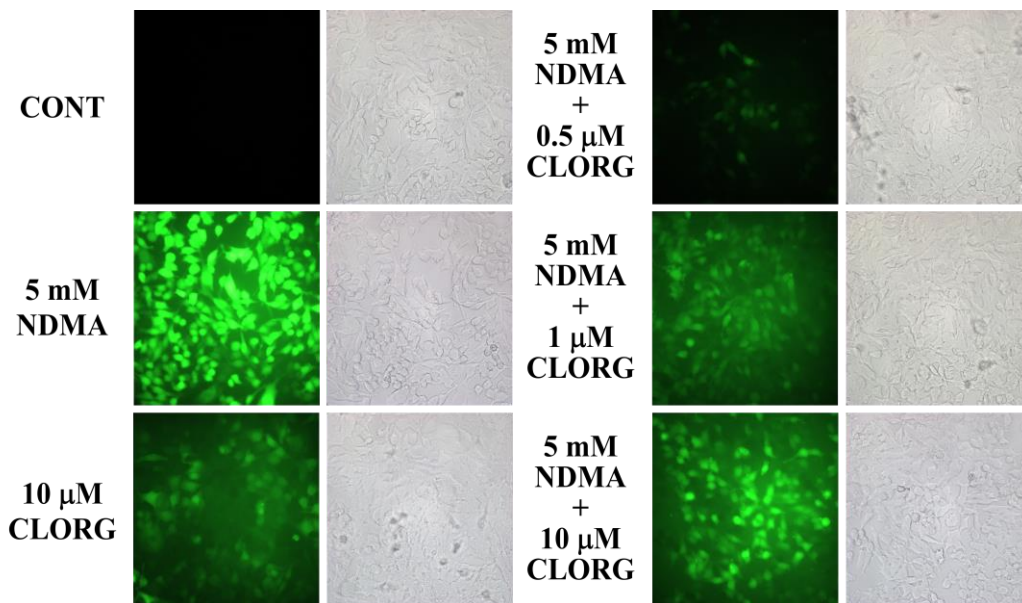
圖十、二甲基亞硝胺在人類正常肝細胞所造成的細胞內 ROS 增加。人類正常肝細胞(WRL-68)，分別處理不同濃度二甲基亞硝胺(NDMA) 24 小時，以 DGHF-DA 染色法測量 ROS 產生量，利用正立螢光顯微鏡觀察照相，再以 Image J 定量。數據為四次試驗平均值 ± 標準機差。



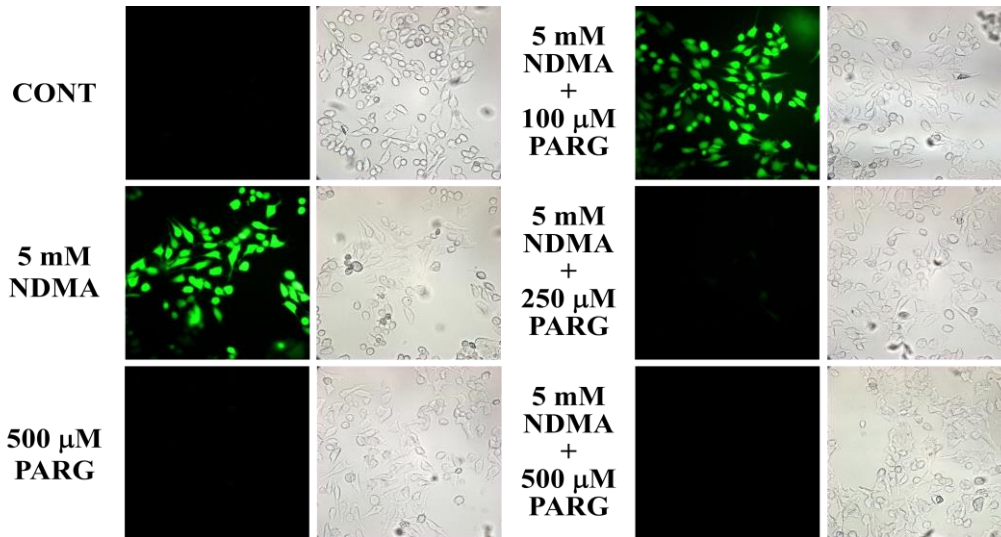
圖十一、細胞色素 P450 酵素抑制劑對二甲基亞硝胺造成人類正常肝細胞 ROS 增加的影響。人類正常肝細胞(WRL-68)細胞，分別預處理不同濃度細胞色素 P450 酵素抑制劑(1-aminobenzotriazole, ABT) 30 分鐘後，再處理 5mM 二甲基亞硝胺(NDMA) 24 小時，以 DGHF-DA 染色測量 ROS 產生量，利用正立螢光顯微鏡觀察照相，再以 Image J 定量。數據為三次試驗平均值 ± 標準機差。



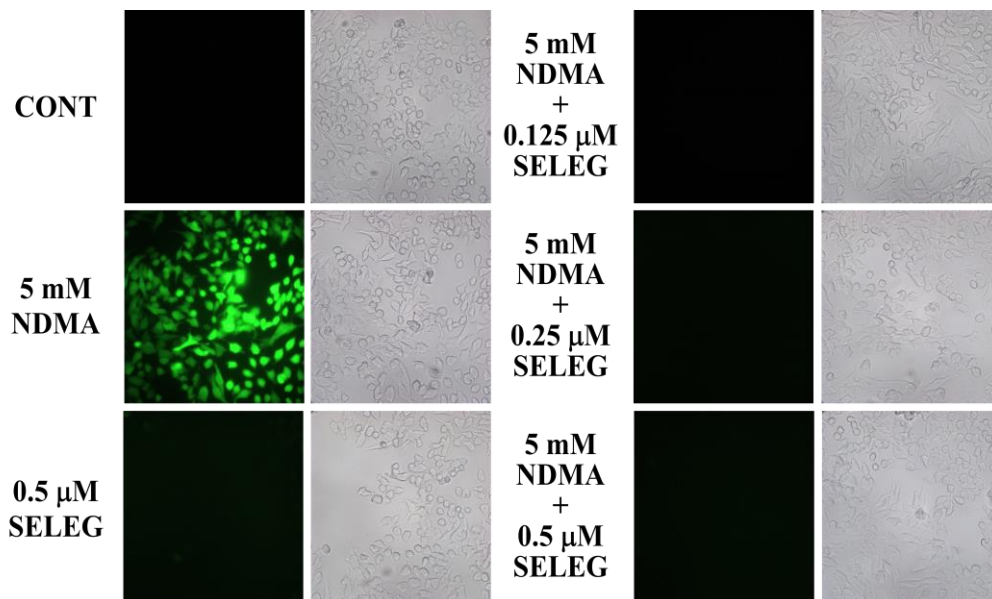
圖十二、黃素單加氧酶抑制劑對二甲基亞硝胺造成人類正常肝細胞 ROS 增加的影響。人類正常肝細胞(WRL-68)細胞，分別預處理不同濃度黃素單加氧酶抑制劑(methimazole, MMI) 30 分鐘後，再處理 5mM 二甲基亞硝胺(NDMA) 24 小時，以 DGHF-DA 染色法測量 ROS 產生量，利用正立螢光顯微鏡觀察照相，再以 Image J 定量。數據為二次試驗平均值。



圖十三、單胺氧化酶-A 抑制劑對二甲基亞硝胺造成人類正常肝細胞 ROS 增加的影響。人類正常肝細胞(WRL-68)細胞，分別預處理不同濃度單胺氧化酶抑制劑(clorgyline, CLOGR) 30 分鐘後，再處理 5mM 二甲基亞硝胺(NDMA) 24 小時，以 DGHF-DA 染色法測量 ROS 產生量，利用正立螢光顯微鏡觀察照相，再以 Image J 定量。數據為三次試驗平均值 ± 標準機差。

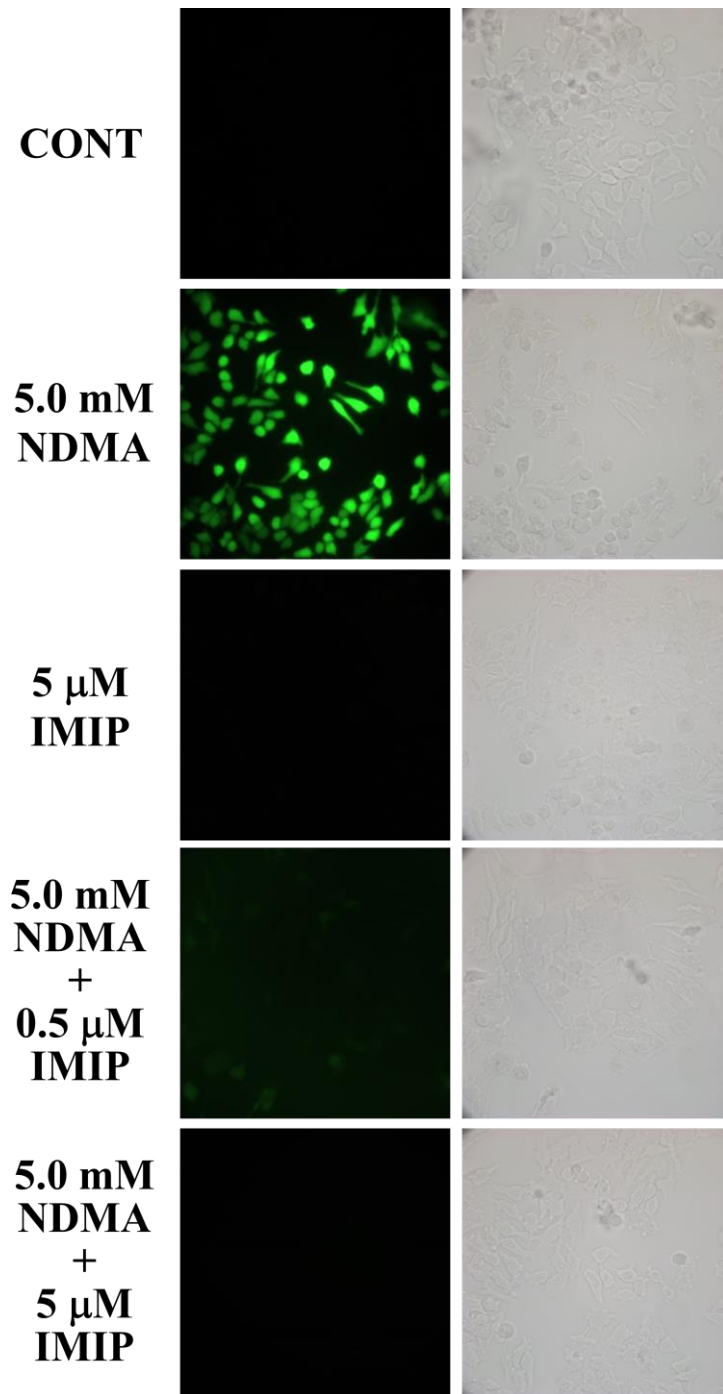


圖十四、單胺氧化酶-B 抑制劑對二甲基亞硝胺造成人類正常肝細胞 ROS 增加的影響。人類正常肝細胞(WRL-68)細胞，分別預處理不同濃度單胺氧化酶-B 抑制劑(pargyline, PARG) 30 分鐘後，再處理 5mM 二甲基亞硝胺(NDMA) 24 小時，以 DGHF-DA 染色法測量 ROS 產生量，利用正立螢光顯微鏡觀察照相，再以 Image J 定量。數據為二次試驗平均值。

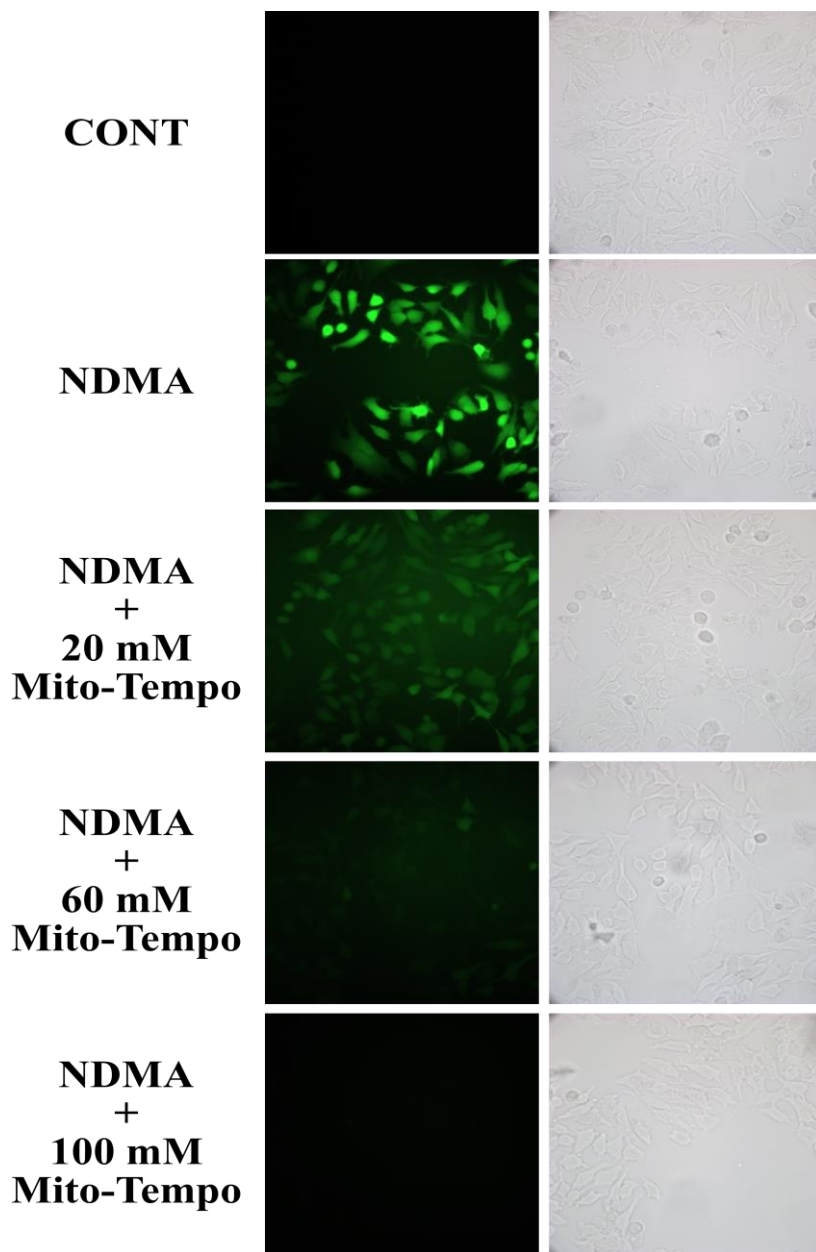


圖十五、單胺氧化酶-B 抑制劑對二甲基亞硝胺造成人類正常肝細胞 ROS 增加的影響。人類正常肝細胞(WRL-68)細胞，分別預處理不同濃度單胺氧化酶-B 抑制劑(selegiline, SELEG) 30 分鐘後，再處理 5mM 二甲基亞硝胺(NDMA) 24 小時，以 DGHF-DA 染色法測量 ROS 產生量，利用正立螢光顯微鏡觀察照相，再以 Image J 定量。數據為二次試驗平均值。





圖十六、單胺回收抑制劑對二甲基亞硝胺造成人類正常肝細胞 ROS 增加的影響。人類正常肝細胞(WRL-68)細胞，分別預處理不同濃度單胺抑制劑(imipramine, IMI) 30 分鐘後，再處理 5mM 二甲基亞硝胺(NDMA) 24 小時，以 DGHF-DA 染色法測量 ROS 產生量，利用正立螢光顯微鏡觀察照相，再以 Image J 定量。數據為二次試驗平均值。

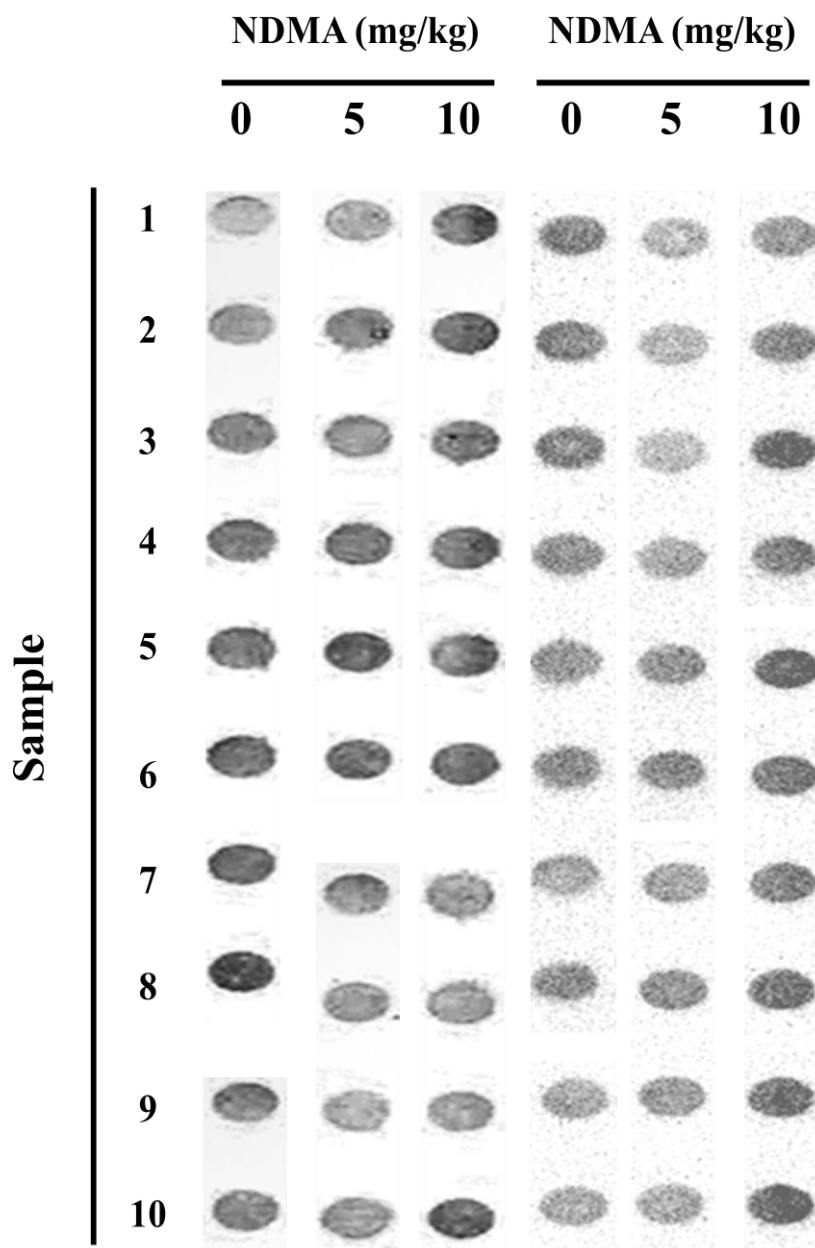


圖十七、粒線體靶向抗氧化劑對二甲基亞硝胺造成人類正常肝細胞 ROS 增加的影響。人類正常肝細胞(WRL-68)細胞，分別預處理不同濃度粒線體靶向抗氧化劑(Mito-tempo) 30 分鐘後，再處理 5mM 二甲基亞硝胺(NDMA) 24 小時，以 DGHF-DA 染色法測量 ROS 產生量，利用正立螢光顯微鏡觀察照相，再以 Image J 定量。數據為二次試驗平均值。

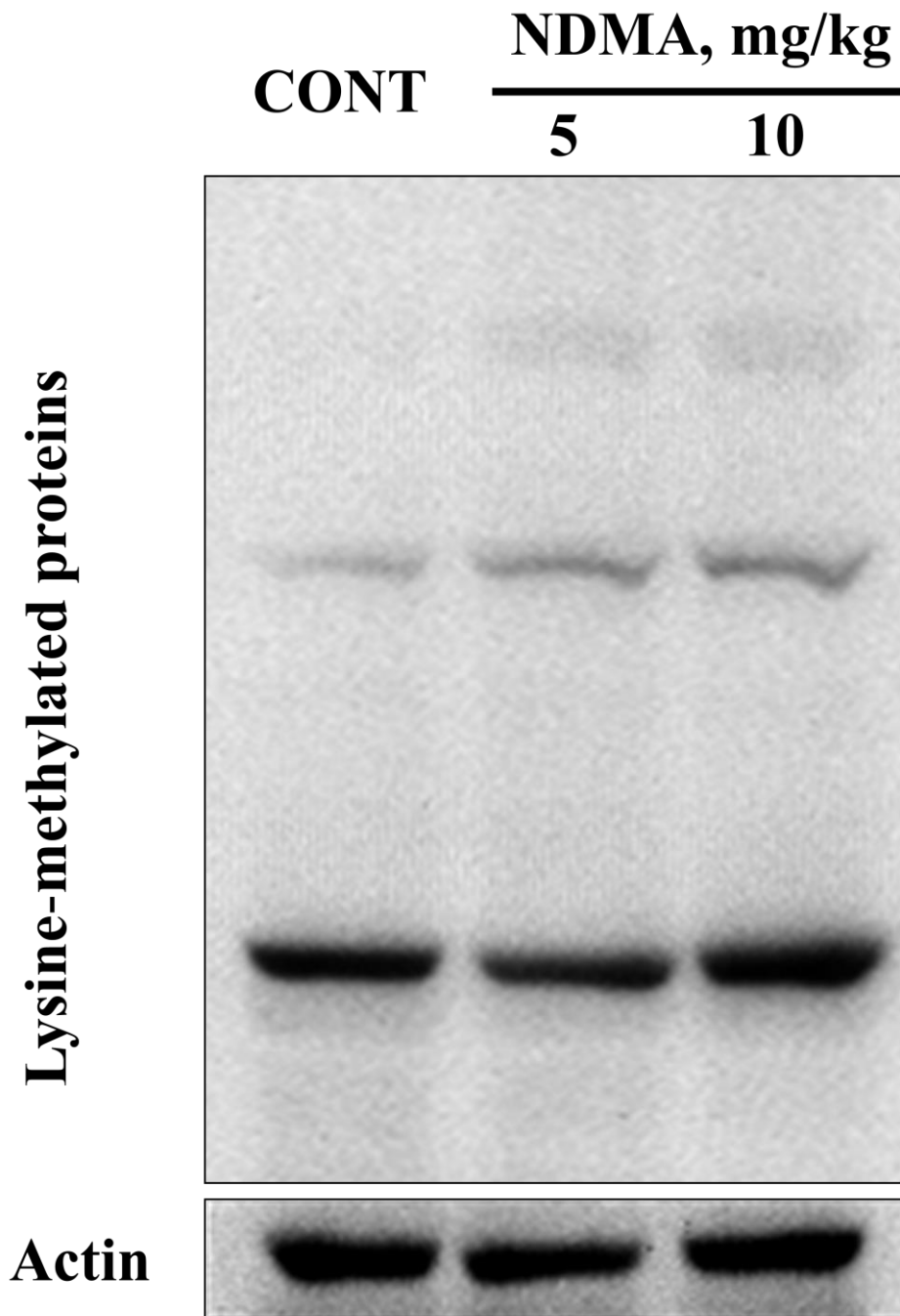
#### 4.4 小鼠模式下 NDMA 對蛋白質甲基化及解毒酵素蛋白表現之影響

NDMA 處理人類細胞血管內皮 EA.hy926 細胞及 WRL-68 肝細胞，均可造成細胞內明顯 ROS 產生量大幅增加的氧化壓力，並且造成細胞死亡，為進一步了解 NDMA 處理對動物體內解毒代謝及抗氧化酵素系統可能造成之改變，本計畫利用 BALB/c 小鼠進行探討。以四週齡 BALB/c 小鼠腹腔注射 NDMA，每週 3 次連續 5 週，結果發現肝臟組織蛋白總甲基化程度，在注射濃度 10 mg/kg 組蛋白質甲基化程度相較於對照組顯著增加約 28% (圖十八)，NDMA 處理在小鼠肝臟造成三個甲基化標的蛋白質 (圖十九)。

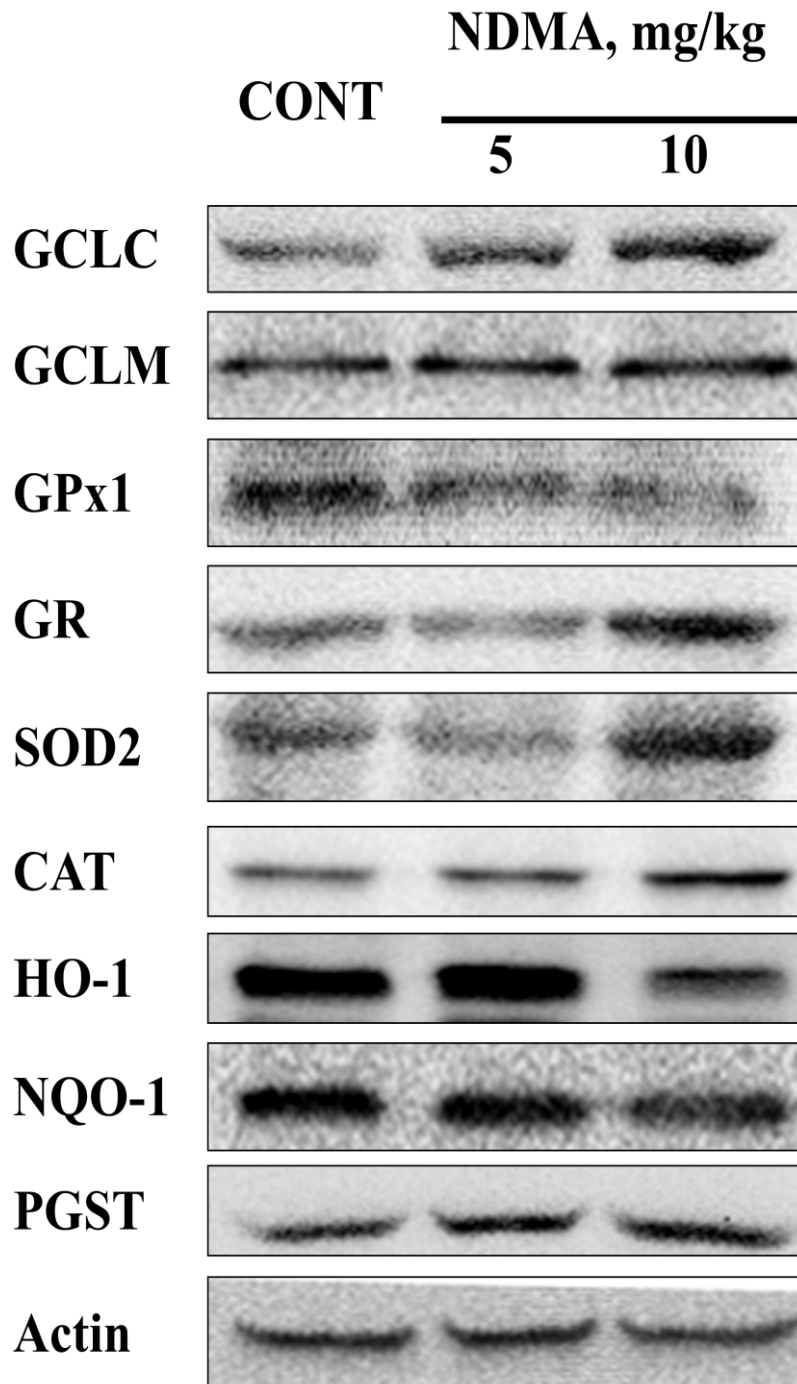
除蛋白甲基化的改變之外，NDMA 處理也對小鼠肝臟中多種蛋白質表現造成明顯的影響，表現增加的蛋白質包括：(1)伴護蛋白 GRP75 (75 kDa Glucose regulated protein)、(2)MnSOD (Manganese-dependent superoxide dismutase)、(3)CAT (Catalase)、(4)GCLC (Glutamate–cysteine ligase catalytic subunit)、(5) GCLM (Glutamate–cysteine ligase modifier subunit)、(6)GSTp (Glutathione S-transferase pi)，表現下降的蛋白質包括(7)GPX1 (Glutathione peroxidase 1)、(8)HO-1 (Heme oxygenase 1)，(9)GR (Glutathione reductase)的表現程度則不受影響(圖二十)



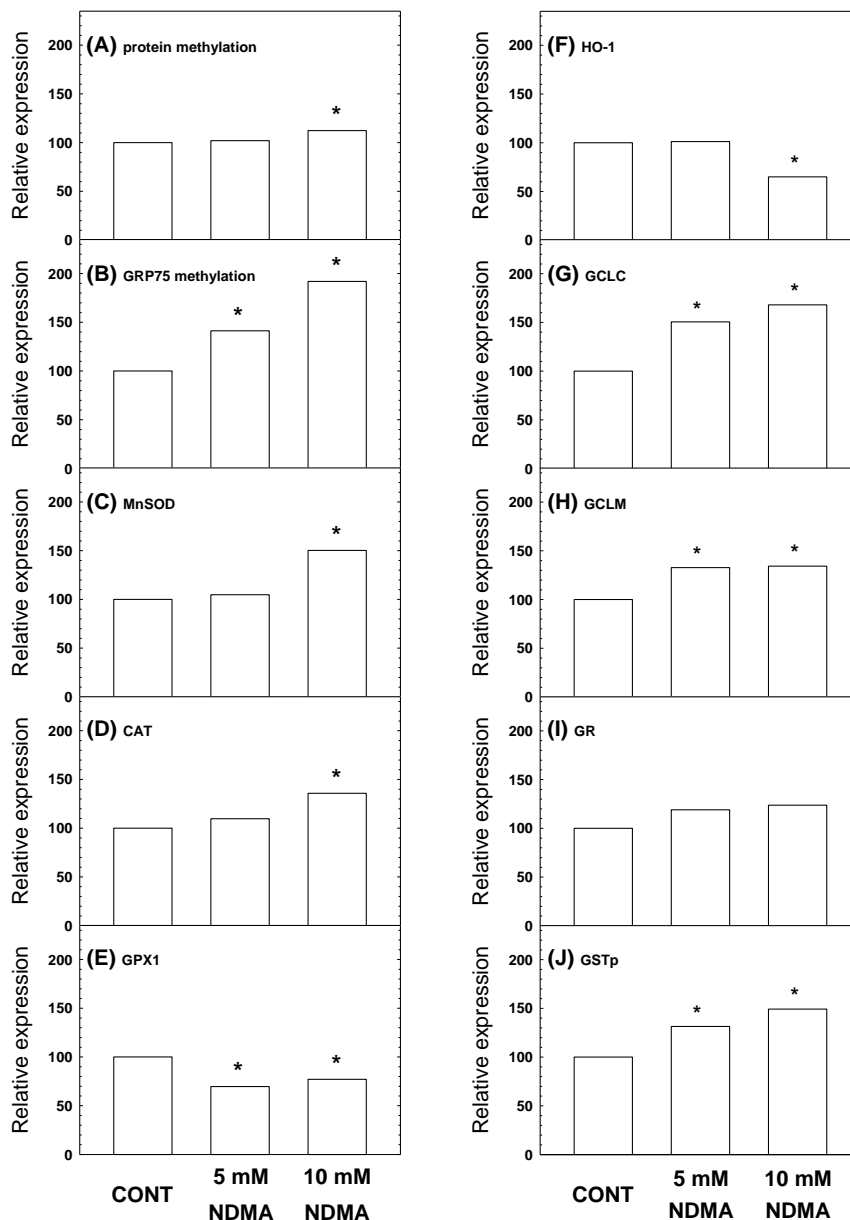
圖十八、二甲基亞硝胺造成小鼠肝臟蛋白質甲基化之免疫圓點轉漬分析。四週齡小鼠經 5 mg/kg 或 10 mg/kg NDMA 注射，每週 3 次連續 5 週，於第 6 週結束試驗，犧牲小鼠摘取肝臟製備蛋白質溶解液，進行免疫西方轉漬分析，測量蛋白質的甲基化之程度。



圖十九、二甲基亞硝胺對小鼠肝臟蛋白質甲基化之影響。四週齡小鼠經 5 mg/kg 或 10 mg/kg NDMA 注射，每週 3 次連續 5 週，於第 6 週結束試驗，犧牲小鼠摘取肝臟製備蛋白質溶解液，進行免疫西方轉漬分析，測量蛋白質的甲基化圖譜。



圖二十、二甲基亞硝胺對小鼠肝臟伴護蛋白解毒酵素及抗氧化酵素表現的影響。四週齡小鼠經 5 mg/kg 或 10 mg/kg NDMA 注射，每週 3 次連續 5 週，於第 6 週結束試驗，犧牲小鼠摘取肝臟製備蛋白質溶解液，進行免疫西方轉漬分析，測量個別蛋白質的表現程度。



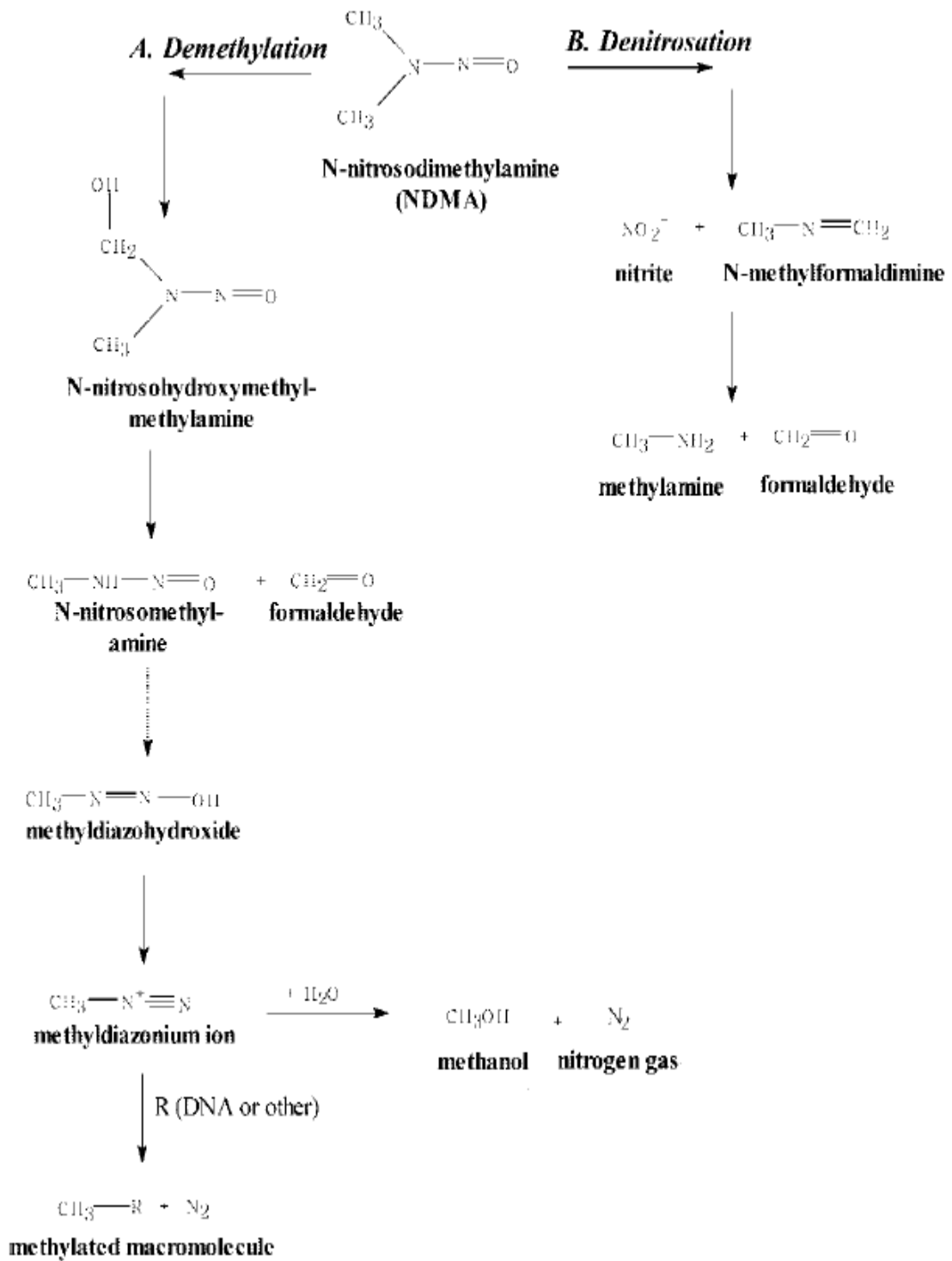
圖二十一、二甲基亞硝胺對小鼠肝臟蛋白質甲基化；伴護蛋白解毒酵素及抗氧化酵素表現的定量分析。利用免疫西方轉漬法測量各個蛋白質的表現程度，蛋白質免疫螢光訊號以 Image J 定量。數據為三次試驗平均值。(A)protein methylation, (B)GRP75/75 kDa glucose regulated protein, (C)MnSOD/Mn-dependent superoxide dismutase, (D)CAT/Catalase, (E)GPX1/Glutathionn peroxidase 1, (F)HO-1/Heme oxygenase 1, (G)GCLC/Glutamate–cysteine ligase catalytic subunit、(H) GCLM/Glutamate–cysteine ligase modifier subunit、(I)GR/Glutathion reductase, (J) GSTp/Glutathione S-transferase pi。

## (五)討論

二甲基亞硝胺(NDMA)可能因食物保存醃製添加而攝入，另外飲食中胺類和亞硝酸鹽物質，經由胃部消化液或唾液催化而自然形成，是日常生活中極易暴露的物質。亞硝胺因具有強烈的肝臟毒性及致癌性，對健康危害的風險相當高，極需探討並研擬相關的防治之道，過往的研究指出二甲基亞硝胺在生物體內代謝產生甲醛及過氧化氫相關之活潑分子，進而造成細胞重要分子之氧化傷害及羰基化作用(carbonylation)，另外，某些代謝產物則具有強烈的烷基化劑活性，例如甲基重氮陽離子(methyldiazonium ion)，可進一步造成DNA及蛋白質的烷基化作用(methylation)(圖二十二)，這些改變將嚴重影響細胞的訊息傳遞，並且改變基因表現的圖譜，久之將造成肝臟纖維化及相關癌症的形成。

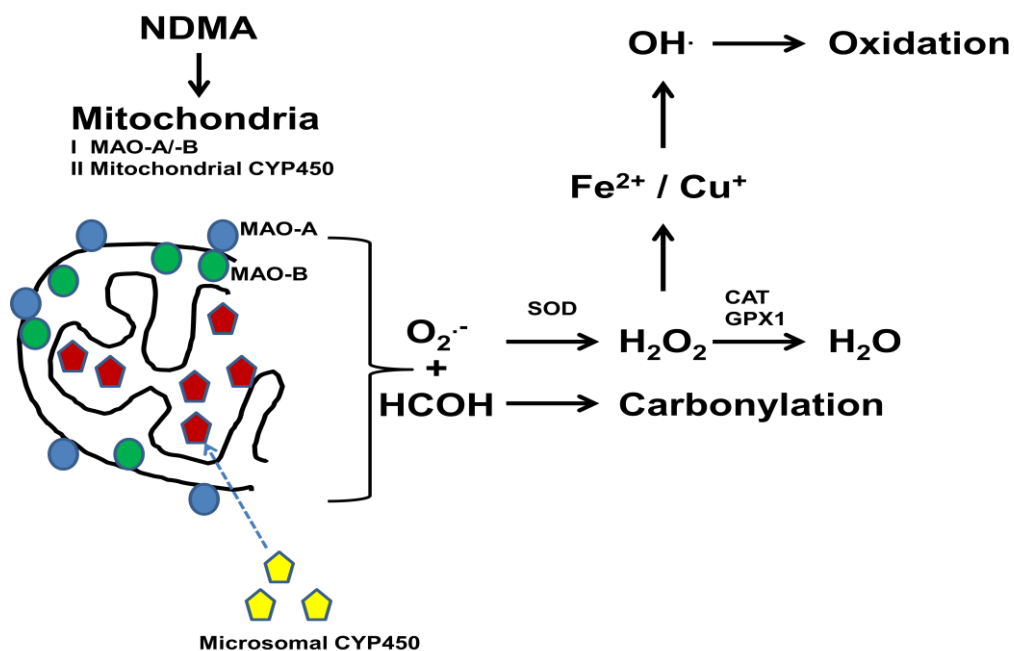
雖然 NDMA 在哺乳動物中的代謝途徑及主要產物了解的相當完整，但那些代謝酵素參與其代謝過程至今仍無定論，過去的文獻認為細胞色素 P450 酵素 2E1 扮演重要角色(Chowdhury et al., 2012; Kang et al., 2007; Yamazaki et al., 1992)，某些文獻則又指出單胺氧化酶(monoamine oxidase/MAO)及黃素單胺氧化酶(flavin monooxygenase/FMO)也都扮演重要角色(Lake et al., 1982; Phillips et al., 1982)。本計畫結果發現 CYP450、FMO 及 MAO 的選擇性抑制劑，都能有效地抑制 NDMA 在 WRL-68 肝細胞造成 ROS 產生量增加，然而，根據抑制劑可能作用的重疊性判斷，CYP450 酵素及單胺氧化酶(MAO)對 NDMA 代謝產生 ROS 的角色是同等重要的，FMO 抑制劑因同時具有強烈抑制 CYP450 的活性，角色重疊重要性較低。更有趣且重要的發現是 NDMA 誘發的 ROS 可被粒線體專一性抗氧化劑(Mito-tempo)完全抑制，這顯示 NDMA 誘發的 ROS 產量增加與粒線體的關係密切，綜合這些發現，我們提出一個新且重要可能分子機制，解釋 NDMA 如何在肝細胞代謝活化產生 ROS(圖二十三)。NDMA 進入細胞後，可能被粒線體外膜上之 MAO 酵素作用，或由轉移至粒線體基質內之 CYP450 2E1 酵素代謝，進而讓粒線體內部或附近的 ROS 的產量增加，最近的研究報導指出 CYP450 2E1 在 STZ 誘發糖尿病鼠粒線體中的表現明顯提高(Raza et al., 2004)，以及粒線體中 CYP450 2E1 產生之 ROS 在漢防己鹼造成之粒線體功能失常扮演主要角色，都支持我們所提出的工作假說，粒線體中的 CYP450 2E1 及 MAO-A/B 在 NDMA 誘發肝細胞 ROS 產量增加仍需進一步研究確認。

二甲基亞硝胺除造成肝細胞 ROS 產量增加，以及解毒及抗氧化系統酵素的表現改變之外，也明顯造成蛋白甲基化的增加，利用蛋白質體學分析技術，進一步發現 GRP75 是 NDMA 處理重要的蛋白甲基化標誌，該蛋白的甲基化現象是首次被發現，該蛋白被甲基化後對其功能之影響目前仍不清楚，GRP75 是一主要分布於粒線體基質的蛋白質，最近的文獻指出 GRP75 在蛋白質進出粒線體扮演重要的伴護(chaperon)功能(Liu et al., 2015; Horst et al., 1997)，該蛋白質也是串聯內質網與粒線體並控制鈣離子恆定的主角(Szabadkai et al., 2006)。據此我們認為 GRP75 可能與 CYP450 2E1 的粒線體轉運有關，NDMA 處理透過 GRP75 協助 CYP450 2E1 進入粒線體並代謝 NDMA，造成 ROS 產量增加，同時其代謝產物(如甲基重氮陽離子/methyldiazonium ion)也讓 GRP75 蛋白發生甲基化並降低其原有蛋白伴護的能力，進而誘發該蛋白質的表現程度(圖二十一 A & B)，這項發現也再一次說明粒線體極可能是 NDMA 在哺乳動物細胞作用的標的。



圖二十二、二甲基亞硝安在哺乳動物細胞可能之代謝途徑 (Fournier et al., 2006)。





圖二十三、二甲基亞硝胺透過粒線體中代謝酵素產生 ROS 造成細胞氧化傷害可能之作用機制。

#### (六)參考文獻

- Cho HS, Shimazu T, Toyokawa G, Daigo Y, Maehara Y, Hayami S, Ito A, Masuda K, Ikawa N, Field HI, Tsuchiya E, Ohnuma S, Ponder BA, Yoshida M, Nakamura Y, Hamamoto R. Enhanced HSP70 lysine methylation promotes proliferation of cancer cells through activation of Aurora kinase B. *Nat Commun.* 2012;3:1072.
- Cho HS, Shimazu T, Toyokawa G, Daigo Y, Maehara Y, Hayami S, Ito A, Masuda K, Ikawa N, Field HI, Tsuchiya E, Ohnuma S, Ponder BA, Yoshida M, Nakamura Y, Hamamoto R. Enhanced HSP70 lysine methylation promotes proliferation of cancer cells through activation of Aurora kinase B. *Nat Commun.* 2012;3:1072.
- Chowdhury G, Calcutt MW, Nagy LD, Guengerich FP. Oxidation of methyl and ethyl nitrosamines by cytochrome P450 2E1 and 2B1. *Biochemistry.* 2012 Dec 18;51(50):9995-10007.
- Egorova KS, Olenkina OM, Olenina LV. Lysine methylation of nonhistone proteins is a way to regulate their stability and function. *Biochemistry (Mosc).* 2010 May;75(5):535-48.
- Farin FM, Pohlman TH, Omiecinski CJ. Expression of cytochrome P450s and microsomal epoxide hydrolase in primary cultures of human umbilical vein endothelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1994 Jan;124(1):1-9.
- Fournier D, Hawari J, Streger SH, McClay K, Hatzinger PB. Biotransformation of N-nitrosodimethylamine by *Pseudomonas mendocina* KR1. *Appl Environ Microbiol.* 2006 Oct;72(10):6693-8.
- Guendel I, Carpio L, Pedati C, Schwartz A, Teal C, Kashanchi F, KehN-Hall K. Methylation of the tumor suppressor protein, BRCA1, influences its transcriptional cofactor function. *PLoS One.* 2010 Jun 29;5(6):e11379.
- Hecht SS. It is time to regulate carcinogenic tobacco-specific nitrosamines in cigarette tobacco. *Cancer Prev Res (Phila).* 2014 May 7. [Epub ahead of print]

- Hoffmann D, Brunnemann KD, Prokopczyk B, Djordjevic MV. Tobacco-specific *N*-nitrosamines and Areca-derived *N*-nitrosamines: chemistry, biochemistry, carcinogenicity, and relevance to humans. *J Toxicol Environ Health*. 1994 Jan;41(1):1-52.
- Horst M, Oppliger W, Rospert S, Schönfeld HJ, Schatz G, Azem A. Sequential action of two hsp70 complexes during protein import into mitochondria. *EMBO J*. 1997 Apr 15;16(8):1842-9.
- Jakszyn P, Gonzalez CA. Nitrosamine and related food intake and gastric and oesophageal cancer risk: a systematic review of the epidemiological evidence. *World J Gastroenterol*. 2006 Jul 21;12(27):4296-303.
- Jansson M, Durant ST, Cho EC, Sheahan S, Edelmann M, Kessler B, La Thangue NB. Arginine methylation regulates the p53 response. *Nat Cell Biol*. 2008 Dec;10(12):1431-9.
- Kang JS, Wanibuchi H, Morimura K, Gonzalez FJ, Fukushima S. Role of CYP2E1 in diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in vivo. *Cancer Res*. 2007 Dec 1;67(23):11141-6.
- Kushida H, Fujita K, Suzuki A, Yamada M, Endo T, Nohmi T, Kamataki T. Metabolic activation of *N*-alkylnitrosamines in genetically engineered *Salmonella typhimurium* expressing CYP2E1 or CYP2A6 together with human NADPH-cytochrome P450 reductase. *Carcinogenesis*. 2000;21(6):1227-1232.
- Lake BG, Harris RA, Collins MA, Cottrell RC, Phillips JC, Gangolli SD. Studies on the metabolism of dimethylnitrosamine in vitro by rat-liver preparations. II. Inhibition by substrates and inhibitors of monoamine oxidase. *Xenobiotica*. 1982 Sep;12(9):567-79. PubMed PMID: 6818776.
- Lee AS. Glucose-regulated proteins in cancer: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(4):263-76.
- Liu FT, Chen Y, Yang YJ, Yang L, Yu M, Zhao J, Wu JJ, Huang F, Liu W, Ding ZT, Wang J. Involvement of mortalin/GRP75/mthsp70 in the mitochondrial impairments induced by A53T mutant  $\alpha$ -synuclein. *Brain Res*. 2015 Apr 16;1604:52-61.
- Liu Y, Liu K, Qin S, Xu C, Min J. Epigenetic targets and drug discovery: Part 1: Histone methylation. *Pharmacol Ther*. 2014 Apr 2. pii: S0163-7258(14)00068-0.
- Phillips JC, Bex C, Lake BG, Cottrell RC, Gangolli SD. Inhibition of dimethylnitrosamine metabolism by some heterocyclic compounds and by substrates and inhibitors of monoamine oxidase in the rat. *Cancer Res*. 1982 Sep;42(9):3761-5.
- Raunio H, Rahnasto-Rilla M. CYP2A6: genetics, structure, regulation, and function. *Drug Metabol Drug Interact*. 2012 May 5;27(2):73-88.
- Raza H, Prabu SK, Robin MA, Avadhani NG. Elevated mitochondrial cytochrome P450 2E1 and glutathione S-transferase A4-4 in streptozotocin-induced diabetic rats: tissue-specific variations and roles in oxidative stress. *Diabetes*. 2004 Jan;53(1):185-94.
- Shuker DE, Bartsch H. DNA adducts of nitrosamines. *IARC Sci Publ*. 1994;(125):73-89.
- Sihag RK, Inagaki M, Yamaguchi T, Shea TB, Pant HC. Role of phosphorylation on the structural dynamics and function of types III and IV intermediate filaments. *Exp Cell Res*. 2007;313(10):2098-109.

- Szabadkai G, Bianchi K, Várnai P, De Stefani D, Wieckowski MR, Cavagna D, Nagy AI, Balla T, Rizzuto R. Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca<sup>2+</sup> channels. *J Cell Biol.* 2006 Dec 18;175(6):901-11.
- Verna L, Whysner J, Williams GM. *N*-nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation. *Pharmacol Ther.* 1996;71(1-2):57-81.
- Wadhwa R, Takano S, Kaur K, Deocaris CC, Pereira-Smith OM, Reddel RR, Kaul SC. Upregulation of mortalin/mthsp70/Grp75 contributes to human carcinogenesis. *Int J Cancer.* 2006;118(12):2973-80.
- Xu L, Voloboueva LA, Ouyang Y, Emery JF, Giffard RG. Overexpression of mitochondrial Hsp70/Hsp75 in rat brain protects mitochondria, reduces oxidative stress, and protects from focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009;29(2):365-74.
- Yamazaki H, Inui Y, Yun CH, Guengerich FP, Shimada T. Cytochrome P450 2E1 and 2A6 enzymes as major catalysts for metabolic activation of *N*-nitrosodialkylamines and tobacco-related nitrosamines in human liver microsomes. *Carcinogenesis.* 1992 Oct;13(10):1789-94.
- Yang L, Liu X, Hao J, Yang Y, Zhao M, Zuo J, Liu W. Glucose-regulated protein 75 suppresses apoptosis induced by glucose deprivation in PC12 cells through inhibition of Bax conformational change. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2008;40(4):339-48.
- Yang XD, Lamb A, Chen LF. Methylation, a new epigenetic mark for protein stability. *Epigenetics.* 2009;4(7):429-33.
- Yongvanit P, Phanomsri E, Namwat N, Kampan J, Tassaneeyakul W, Loilome W, Puapairoj A, Khuntikeo N. Hepatic cytochrome P450 2A6 and 2E1 status in peri-tumor tissues of patients with *Opisthorchis viverrini*-associated cholangiocarcinoma. *Parasitol Int.* 2012 Mar;61(1):162-6.

##### (五) 成果自評

1. 利用二維西方轉漬及質譜分析技術，以及免疫沉澱技術成功定義二甲基亞硝胺 NDMA 在人類臍靜脈內皮 EA.hy926 細胞主要的甲基化蛋白標的：GRP75 蛋白，這是首次且重要的發現，進一步研究發現 GRP75 蛋白的甲基化現象，也同樣出現在人類 WRL-68 肝細胞，除此之外，NDMA 在人類臍靜脈內皮 EA.hy926 細胞及 WRL-68 肝細胞，也都造成 GRP75 蛋白質的表現量增加，這可能是因應 GRP7 甲基化後功能阻礙的補償(compensation)作用。雖然 GRP75 甲基化後的功能影響現階段仍不清楚，但對 NDMA 所造成之肝纖維化及相關癌症可能扮演重要角色，未來對發展 NDMA 曝露之生物標籤及相關疾病之防治提供良好的研究指引。
2. 利用有害異物(xenobiotic)之多元代謝酵素抑制劑，包括 cytochrome P450/CYP450、monoamine oxidase/MAO、flavin-containing monooxidase/FMO 以及粒線體選擇性抗氧化劑，成功建立粒線體可能是 NDMA 主要的作用胞器，粒線体外膜 MAO 及基質內 CYP450(因逆境壓力誘導轉入粒線體基質)聯合代謝 NDMA 造成細胞 ROS 產量增加，這項發現首次提出粒線體氧化傷害在 NDMA 致病機制上的角色，也提出因逆境壓力誘導轉入粒線體基質的 CYP450，尤其是 2E1 型可能在 NDMA 的代謝致病機制上扮演重要角色，這些發現對發展 NDMA 的致病危害防治將提供新的思考方向。

# 科技部補助專題研究計畫出席國際學術會議心得報告

日期：105 年 04 月 13 日

計畫編號	NSC 102-2632-B-040-001-MY3		
計畫名稱	食品中致癌性亞硝胺之快速篩檢與暴露危害評估		
出國人員姓名	趙木榮	服務機構及職稱	中山醫學大學職業安全衛生系 /教授
會議時間	105 年 4 月 8 日至 105 年 4 月 10 日	會議地點	日本京都國際會館
會議名稱	The 56th Annual Meeting of The Japanese Respiratory Society		
發表題目	1. Tobacco-specific nitrosamine NNK and its metabolite NNAL in patients with chronic obstructive pulmonary disease 2. Urinary levels of oxidative stress biomarkers in patients with mechanical ventilation		

## 一、參加會議經過

The 56th Annual Meeting of The Japanese Respiratory Society 由日本呼吸器学会舉辦，此次參與發表的論文有 2 篇，分別為 Tobacco-specific nitrosamine NNK and its metabolite NNAL in patients with chronic obstructive pulmonary disease 及 Urinary levels of oxidative stress biomarkers in patients with mechanical ventilation。我們除了張貼壁報論文外，公衛系專題生廖啟軒同學及蔡依虹專任助理也在 English Poster Discussion 各自進行 5 分鐘的專題報告並回答現場學者提問。

## 二、與會心得

肺部疾病發炎可造成呼吸器官硝化壓力(nitrosative stress)升高。此次會議有不少學者討論呼吸器官中產生 Reactive nitrogen species (RNS)造成肺部分子損傷，並且開發出各式生物偵測指標(如 3-nitrotyrosine)來監測 nitrosative stress。RNS 與體內胺類反應也可生成亞硝胺，但目前仍未有質譜分析技術。在我們的「食品中致癌性亞硝胺之快速篩檢與暴露危害評估」研究計畫中，我們已能成功分析尿液中的各式亞硝胺，該技術未來將嘗試朝向運用於肺積水分析，以協助探討肺部發炎所產生致癌物。

**EPD3-2 Tobacco-specific nitrosamine NNK and its metabolite NNAL in patients with chronic obstructive pulmonary disease**

Division of Chest Medicine, Department of Internal Medicine, Changhua Christian Hospital, Taiwan<sup>1</sup>, Department of Occupational Safety and Health, Chung Shan Medical University, Taiwan<sup>2</sup>, Department of Public Health, Chung Shan Medical University, Taiwan<sup>3</sup>, Department of Occupational Medicine, Chung Shan Medical University Hospital, Taiwan<sup>4</sup> : ○Ying-Ming Shih<sup>1</sup>, Ciao-Han Sie<sup>2</sup>, Chi-Syuan Liao<sup>3</sup>, Chiung-Wen Hu<sup>3</sup>, Mu-Rong Chao<sup>2,4</sup>

Most of the patients diagnosed of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) are often associated with cigarette smoking. Smokers with COPD are at an increased risk of developing lung cancer. Tobacco-specific nitrosamines (TSNAs) are a group of carcinogens present in tobacco. In this study, we measured the 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) and its urinary metabolite, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) in the urines of healthy smokers (n = 15) and current-smoker COPD patients (n = 34), by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. The preliminary results showed that under a similar exposure condition, current-smoker COPD patients had significantly higher urinary levels of free NNAL than healthy smokers (0.12 ng/mg creatinine vs. 0.08 ng/mg creatinine; P = 0.018). The current-smoker COPD patients had significantly lower detoxification index (glucuronidated NNAL levels divided by the free NNAL levels) than healthy smokers (1.79 vs. 2.83; P = 0.0106). These findings implied that the current-smoker COPD patients may have impaired metabolism or decreased ability to detoxify TSNAs.

**EPD8-3 Urinary levels of oxidative stress biomarkers in patients with mechanical ventilation**

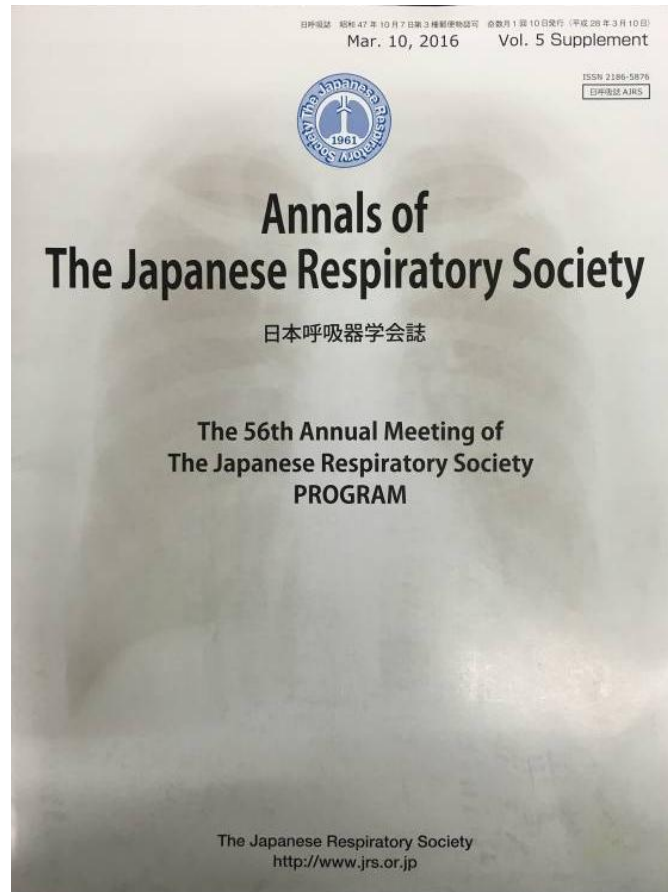
Department of Public Health, Chung Shan Medical University, Taiwan<sup>1</sup>, Division of Chest Medicine, Department of Internal Medicine, Changhua Christian Hospital, Taiwan<sup>2</sup>, Department of Occupational Safety and Health, Chung Shan Medical University, Taiwan<sup>3</sup>, Department of Family and Community Medicine, Chung Shan Medical University Hospital, Taiwan<sup>4</sup> : ○Chi-Syuan Liao<sup>1</sup>, Yi Hung Tsai<sup>1</sup>, Ying-Ming Shih<sup>2</sup>, Mu-Rong Chao<sup>3</sup>, Chiung-Wen Hu<sup>1,4</sup>

Mechanical ventilation (MV) is a lifesaving intervention for patients with respiratory failure. However, ventilator-induced lung injury (VILI) is a serious concern and oxidative stress hypothesis is one of the popular explanations. In this study, we collected two urine samples from each patient while the patient requiring MV and weaning from MV. The urines were analyzed for two representative oxidatively damaged DNA and RNA, namely 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) and 8-oxo-7,8-dihydroguanosine (8-oxoGuo) by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Our preliminary results showed that patients requiring MV had significantly higher urinary levels of 8-oxodG and 8-oxoGuo than healthy subjects (8-oxodG: 20.8 vs. 3.55 ng/mg creatinine; 8-oxoGuo: 37.3 vs. 6.38 ng/mg creatinine). The results also showed that 65% of patients weaning from MV had apparently increased levels of 8-oxodG and 8-oxoGuo while 35% of those had decreased urinary levels, compared to their individual-levels while requiring MV. Further investigation is needed to estimate whether the variations of urinary levels of oxidative stress biomarkers are associated with VILI.

#### 四、建議

日本呼吸器学会所舉辦的研討會不只是臨床的醫護人員會參加，基礎研究學者如分析化學、生化及流行病學等也都能參與互動。廣納各方面的學術人才進入醫學研討會將更有利於回答各式疾病的基礎機轉問題，值得國內舉辦醫學研討會借鏡。

#### 五、攜回資料名稱及內容



#### 六、其他



計畫編號	NSC 102-2632-B-040-001-MY3		
計畫名稱	食品中致癌性亞硝胺之快速篩檢與暴露危害評估		
出國人員姓名	謝樵漢	服務機構及職稱	中山醫學大學/ 專任研究助理
會議時間	105年4月8日至 105年4月10日	會議地點	日本京都
會議名稱	(中文) 第56回日本呼吸器學會學術講演會 (英文) The 56th Annual Meeting of The Japanese Respiratory Society		
發表題目	(中文) 慢性阻塞性肺病病患體內的香菸特有亞硝胺 NNK 及其代謝物 NNAL (英文) Tobacco-specific nitrosamine NNK and its metabolite NNAL in patients with chronic obstructive pulmonary disease		

## 一、參加會議經過

此次參加的是在日本京都國際會館舉行的第 56 回日本呼吸器學會學術講演會 (The 56th Annual Meeting of The Japanese Respiratory Society)，我於 4 月 6 日抵達日本京都，並於 4 月 8 日前往會場註冊後，於當天下午參與壁報論文展示，論文題目為 Tobacco-specific nitrosamine NNK and its metabolite NNAL in patients with chronic obstructive pulmonary disease，透過論文的發表與與會學者互動。之後藉由參加會議聆聽學術演講和壁報論文的瀏覽與討論以了解相關學術研究發展的動態。

## 二、與會心得

日本呼吸器學會為日本呼吸器領域最大的學術團體，其會員包含醫生、醫學中心或大學實驗室研究員。在進行壁報論文的介紹與討論時，與會學者從不同領域對本研究提出許多寶貴的意見，例如研究對象挑選及病患罹病程度不同對研究結果可能造成的影響。同時也對於本研究所使用之分析方法對於臨床醫學研究之應用有相當大的興趣。

### 三、發表論文全文或摘要

#### **Tobacco-specific nitrosamine NNK and its metabolite NNAL in patients with chronic obstructive pulmonary disease**

Ying-Ming Shih<sup>1</sup>, Ciao-Han Sie<sup>2</sup>, Chi-Syuan Liao<sup>3</sup>, Chiung-Wen Hu<sup>3</sup>, Mu-Rong Chao<sup>2,4\*</sup>

<sup>1</sup>Division of Chest Medicine, Department of Internal Medicine, Changhua Christian Hospital, Changhua 500, Taiwan

<sup>2</sup>Department of Occupational Safety and Health, Chung Shan Medical University, Taichung 402, Taiwan

<sup>3</sup>Department of Public Health, Chung Shan Medical University, Taichung 402, Taiwan

<sup>4</sup>Department of Occupational Medicine, Chung Shan Medical University Hospital, Taichung 402, Taiwan

Most of the patients diagnosed of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) are often associated with cigarette smoking. Smokers with COPD are at an increased risk of developing lung cancer. Tobacco-specific nitrosamines (TSNAs) are a group of carcinogens present in tobacco. In this study, we measured the 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) and its urinary metabolite, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) in the urines of healthy smokers (n = 15) and current-smoker COPD patients (n = 34), by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. The preliminary results showed that under a similar exposure condition, current-smoker COPD patients had significantly higher urinary levels of free NNAL than healthy smokers (0.12 ng/mg creatinine vs. 0.08 ng/mg creatinine; P = 0.018). The current-smoker COPD patients had significantly lower detoxification index (glucuronidated NNAL levels divided by the free NNAL levels) than healthy smokers (1.79 vs. 2.83; P = 0.0106). These findings implied that the current-smoker COPD patients may have impaired metabolism or decreased ability to detoxify TSNAs.

### 四、建議

藉由參加此次會議了解到其他國家學者在不同領域的研究，對於自己的研究思路有很大的拓展，希望未來仍有機會參加，以增進自己研究的內容。建議無論是科技部或是學校對補助老師或學生出席國際會議的推廣可以更積極。同時感謝科技部的經費補助得以參與此次會議。



## 五、攜回資料名稱及內容

### COPD 1

#### EPD3-1 Epithelial-mesenchymal transition (EMT) as a fundamental underlying pathogenic process in COPD airways: fibrosis and cancer

School of Health Sciences, University of Tasmania, Australia : ○ Sukhwinder S. Sohal

COPD is physiologically complex though, the earliest changes are in the small airways, where most of the airflow limitation occurs. The pathology of small airway damage seems to be wall fibrosis and obliteration, but the whole airway is involved in a field effect. Our novel observations on active epithelial-mesenchymal transition (EMT) in the airways of smokers, particularly in those with COPD, are changing the understanding of this airway pathology and the aetiology of COPD. EMT could be the potential mechanism contributing to small airway fibrosis and obliteration. When associated with angiogenesis (so called EMT-Type-3), which we have observed in larger airways, it may well also be the link with the development of cancer, which is closely associated with COPD. EMT is probably one manifestation of airway basal cell reprogramming, and such concepts are changing the very way we think about this disease and have profound therapeutic implications.

#### EPD3-2 Tobacco-specific nitrosamine NNK and its metabolite NNAL in patients with chronic obstructive pulmonary disease

Division of Chest Medicine, Department of Internal Medicine, Changhua Christian Hospital, Taiwan<sup>1</sup>, Department of Occupational Safety and Health, Chung Shan Medical University, Taiwan<sup>2</sup>, Department of Public Health, Chung Shan Medical University, Taiwan<sup>3</sup>, Department of Occupational Medicine, Chung Shan Medical University Hospital, Taiwan<sup>4</sup> : ○Ying-Ming Shih<sup>1</sup>, Ciao-Han Sie<sup>2</sup>, Chi-Syuan Liao<sup>3</sup>, Chiung-Wen Hu<sup>4</sup>, Mu-Rong Chao<sup>2,4</sup>

Most of the patients diagnosed of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) are often associated with cigarette smoking. Smokers with COPD are at an increased risk of developing lung cancer. Tobacco-specific nitrosamines (TSNAs) are a group of carcinogens present in tobacco. In this study, we measured the 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) and its urinary metabolite, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) in the urines of healthy smokers (n = 15) and current-smoker COPD patients (n = 34), by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. The preliminary results showed that under a similar exposure condition, current-smoker COPD patients had significantly higher urinary levels of free NNAL than healthy smokers (0.12 ng/mg creatinine vs. 0.08 ng/mg creatinine; P = 0.018). The current-smoker COPD patients had significantly lower detoxification index (glucuronidated NNAL levels divided by the free NNAL levels) than healthy smokers (1.79 vs. 2.83; P = 0.0106). These findings implied that the current-smoker COPD patients may have impaired metabolism or decreased ability to detoxify TSNAs.

#### EPD3-3 Involvement of Sphingolipids in Cigarette Smoke- Induced Lung Epithelial Cell Mitophagy and Necroptosis

Division of Respiratory Medicine, Nihon University School of Medicine, Japan<sup>1</sup>, Joan and Sanford I. Weill Department of Medicine, Weill Cornell Medical College, USA<sup>2</sup>, Department of Medicine, Indiana University School of Medicine, USA<sup>3</sup>, Department of Medicine, University of Illinois at Chicago, USA<sup>4</sup> : ○Kenji Mizumura<sup>2</sup>, Matthew J. Justice<sup>3</sup>, Evgeny V. Berdyshev<sup>4</sup>, Shu Hashimoto<sup>1</sup>, Augustine M. K. Choi<sup>1</sup>, Irina Petracek<sup>1</sup>

Background: Ceramide is a proapoptotic sphingolipid that recently implicated in lethal mitophagy. We have previously demonstrated that cigarette smoke (CS) induce lung epithelial mitophagy and necroptosis. In this study, we examined the potential role of sphingolipids in this pathway.

Results: Lung epithelial cells and mice exposed to CS exhibited upregulated levels of C16-ceramide and C16-DHC. Inhibition of the acid sphingomyelinase pathway attenuated CS-induced stabilization of PTEN-induced kinase 1 (PINK1), a key mitophagy regulator, and the phosphorylation of the mixed lineage kinase domain like protein (MLKL), which is a critical step in necroptosis. Treatment with C16-ceramide increased MLKL phosphorylation and cell death, which was reduced by necroptosis inhibitors. Ceramides/SIP ratios and C16-DHC levels were reduced in CS-exposed PINK1 KO mice, which occurred in parallel with the reduction of necroptosis markers. Conclusions: Our results indicate that C16-ceramide is an upstream modulator of mitophagy and necroptosis, and that PINK1 has a feedback regulatory effect on ceramide synthesis.

#### EPD3-4 A Multicenter Retrospective Study on Clinical Characteristics in COPD among OSA

Department of Respiratory Medicine, Juntendo University School of Medicine, Japan<sup>1</sup>, Department of Geriatric Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Japan<sup>2</sup>, Department of Pulmonary Medicine, Respiratory Care clinic, Nippon Medical School, Japan<sup>3</sup> : ○Satomi Shiota<sup>1</sup>, Yasuhiro Yamaguchi<sup>2</sup>, Takeo Ishii<sup>3</sup>, Ai Sugiyama<sup>1</sup>, Kazuhisa Talahashi<sup>1</sup>, Kouzui Kida<sup>1</sup>, Yoshinosuke Fukuchi<sup>1</sup>

The term *overlap syndrome* is commonly used to describe the coexisting chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and obstructive sleep apnea (OSA). A synergetic relationship between them has been described, but there are few studies which investigated the prevalence and characteristics of COPD among OSA. In this multicenter retrospective study supported by GOLD Japan Committee, we aimed to describe how the COPD is evaluated among OSA and to investigate the characteristics of PSG findings in overlap syndrome compared with those among a lone OSA cases. We reviewed 616 patients who underwent PSG and enrolled 273 subjects who underwent both PSG and spirometry. Finally, 27 cases were classified with overlap syndrome. Regarding the PSG findings, we paid special interest for their physiological PSG parameters based on the pathophysiological changes observed in their sleep such as increased upper airway resistance, more profound reduction of FRC in REM sleep and more profound oxygen desaturation.

#### EPD3-5 Association of Nutritional Status using Mini Nutritional Assessment Short Form (MNA-SF) with Risk of Exacerbation Among Elderly COPD Patients

Division of Pulmonology and Critical Care Medicine, Philippine Heart Center, Philippines : ○Peter Ian B. Tabar, Aileen V. Guzman-Banzon, Ma. Encarnita B Limpin

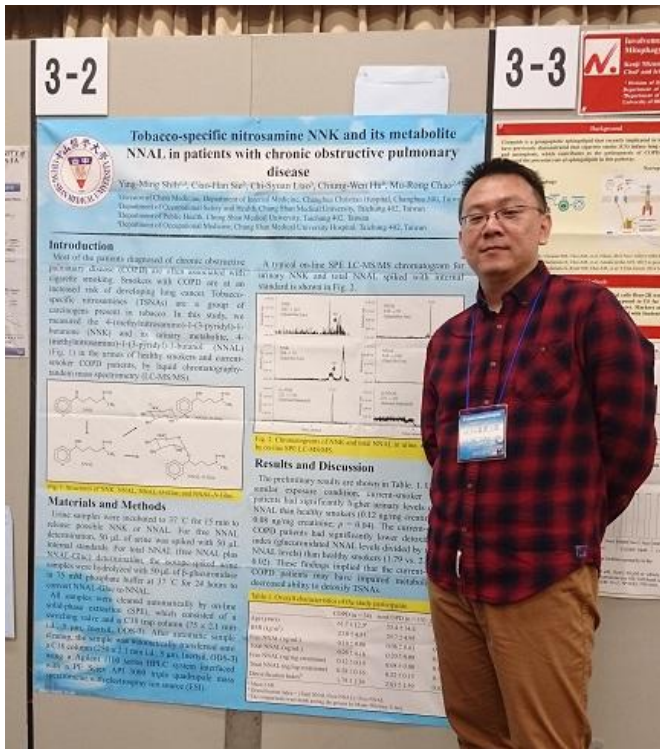
BACKGROUND: Malnutrition is a common extrapulmonary systemic effect of COPD that is correlated with frequent hospital visits. This study aims to correlate COPD exacerbation with nutritional status using the MNA-SF.

METHODS: A cross sectional study involving 131 elderly COPD patients were studied. Anthropometric measurements (BMI, MAC, and CC) were measured. The GOLD COPD Combine Assessment Tool was used to evaluate rate of exacerbation. Pearsons product moment correlation was used for correlation. A p-value of < 0.050 was considered significant.

RESULTS: Using the MNA-SF, subjects with normal nutritional status have no episodes of exacerbation per year. Those who were at risk of malnutrition and malnourished was observed to have more than 1 exacerbations per year. Scatterplot significantly presented a positive correlation between malnutrition and risk of exacerbation. Those with lower BMI and MAC values showed a significant negative correlation with risk of exacerbation.

CONCLUSION: There is a strong correlation between malnutrition and risk of COPD exacerbation using the MNA-SF as a nutritional assessment tool.

## 六、其他



# 科技部補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2016/08/18

科技部補助計畫	計畫名稱: 食品中致癌性亞硝胺之快速篩檢與暴露危害評估
	計畫主持人: 趙木榮
	計畫編號: 102-2632-B-040-001-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：趙木榮			計畫編號：102-2632-B-040-001-MY3				
計畫名稱：食品中致癌性亞硝胺之快速篩檢與暴露危害評估							
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		5	篇	<p>1. Comprehensive analysis of the formation and stability of peroxy nitrite derived 8-nitroguanine by LC-MS/MS: Strategy for the quantitative analysis of cellular 8-nitroguanine. Free Radical Biology &amp; Medicine, 2016 (IF=5.784)</p> <p>2. Elevated urinary levels of carcinogenic N-nitrosamines in patients with urinary tract infections measured by isotope dilution online SPE LC-MS/MS. Journal of Hazardous Materials, 2016 (IF=4.836).</p> <p>3. Urinary nitrite/nitrate ratio measured by isotope-dilution LC-MS/MS as a tool to screen for urinary tract infections. Free Radical Biology &amp; Medicine,</p>

					2016 (IF=5.784) 4. 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 (IF= 3.025) 5. 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 (IF=6.637)
	研討會論文		4		1. Tobacco-specific nitrosamine NNK and its metabolite NNAL in patients with chronic obstructive pulmonary disease. the 56th Annual Meeting of The Japanese Respiratory Society, EPD3-2, April 8-10, 2016, Kyoto, Japan. 2. 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. 3. 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. 4. 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.
	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	18	人次		
		碩士生	8			
		博士生	0			
		博士後研究員	1			
		專任助理	7			
	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。)			本研究領先提供國內食品中亞硝胺的參考數據及國人尿液中亞硝胺的背景值。			

## 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）

本計畫支持發表5篇相關期刊論文於國際著名期刊Journal of Hazardous Materials (2016)、

Free Radical Biology and Medicine (2016 兩篇)、Chemical Research in Toxicology (2015)、Archives of Toxicology (2014)

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）

建立on-line SPE LC-MS/MS方法搭配同位素稀釋法及手動固相萃取分析各類食品中亞硝胺，為國內第一個食品中亞硝胺參考數據。以非侵入性的方法（尿液）評估N-nitrosamines及其前驅物(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)在體內的劑量，有助於N-nitrosamines的暴露及健康風險評估。藉由此生物偵測工具可逐年觀察國人體內N-nitrosamines濃度的改變，作為政府單位在管制食品N-nitrosamines或其前驅物(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)成效的直接證據。

4. 主要發現

本研究具有政策應用參考價值： 否  是，建議提供機關衛福部食品藥物管理署

（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）

提供國內食品及國人體內(尿液)中亞硝胺含量的參考數據。