

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

基因氧化傷害之全面臨床分析檢驗方法開發及國際合作 (二)(第2年) 研究成果報告(完整版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 97-2314-B-040-017-MY2
執行期間：98年08月01日至99年07月31日
執行單位：中山醫學大學公共衛生學系(所)

計畫主持人：胡瓊文
共同主持人：翁瑞宏、張耀仁
計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：黃好婕
大專生-兼任助理人員：蘇聖雯

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 99年09月21日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

基因氧化傷害之全面臨床分析檢驗方法開發及國際合作(2)

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 97-2314-B-040 -017 -MY2

執行期間：97 年 08 月 01 日至 99 年 07 月 31 日

執行機構及系所：中山醫學大學

計畫主持人：胡瓊文

共同主持人：翁瑞宏、張耀仁

計畫參與人員：

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本計畫除繳交成果報告外，另須繳交以下出國心得報告：

赴國外出差或研習心得報告

赴大陸地區出差或研習心得報告

出席國際學術會議心得報告

國際合作研究計畫國外研究報告

處理方式：除列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

中 華 民 國 99 年 9 月 20 日

基因氧化傷害之全面臨床分析檢驗方法開發及國際合作(2)

胡瓊文、翁瑞宏、張耀仁

中文摘要

許多研究已證實生物體內反應性含氧物質(reactive oxygen species, ROS)可能是造成老化、慢性疾病、癌症的原因之一。當生物體內無法適當移除 ROS 則會造成氧化壓力進而攻擊生物體內的重要分子如核酸、蛋白質、脂肪，最後導致細胞或組織在結構及功能上產生改變。8-羥基去氧鳥糞嘌呤核 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG, so called 8-oxodGuo)，為主要的基因氧化性傷害產物。它是遭受最具反應性之氫氧自由基(OH·)攻擊 guanine C-8 位置時的產物。在基因複製時，此種基因氧化傷害會導致 G → T 之反轉突變。體內基因氧化傷害可被適時修復。其主要的修復路徑，包括鹼基移除修復(base excision repair, BER):其修復產物為 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoGua)及核酸切除修復(nucleotide excision repair, NER):其修復產物為 8-oxodGuo。過去十年，臨床研究已廣泛使用體液 8-oxodGuo 的含量作為體內氧化壓力的生物指標。相反的對於另一主要的修復產物 8-oxoGua 研究卻很少。主要的原因是，體液中 8-oxoGua 可能有其他的貢獻來源。然而在最近的研究，證實體液中不論是 8-oxoGua 或 8-oxodGuo 皆主要是來自體內 DNA 修復結果。此外，許多學者更進一步建議基因氧化傷害的量測(i.e. 8-oxodGuo & 8-oxoGua)未來可當做疾病發展的風險指標及評估治療的效標。然而在基因氧化傷害量測可完全作為臨床的指標之前，有些問題仍待釐清其中包括標準分析方法的建立及一般健康人的背景值範圍(reference range)確立。

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

目前計畫主持人所執行中的國科會計畫「基因氧化傷害之全面臨床分析檢驗方法開發及國際合作(1)」，已初步開發「on-line SPE LC-MS/MS」分析方法於尿液檢體(8-oxodGuo & 8-oxoGua)及細胞 DNA 中 8-oxodGuo 測定。本計畫「基因氧化傷害之全面臨床分析檢驗方法開發及國際合作(2)」為期兩年，第一年將另外持續開發「on-line SPE LC-MS/MS」分析方法於血清及唾液中 8-oxodGuo/8-oxoGua 測定。由於受到歐盟組織「European Standards Committee for the Analysis of Urinary (DNA) Lesions (ESCUA)」的邀請，共同參與基因氧化傷害的相關研究。第二年，我們將所建立的 on-line SPE LC-MS/MS 分析方法進行國際間不同分析方法的比對以確立基因氧化傷害之標準分析方法。同時將展開人體樣本的收集以幫助確立一般人體內 8-oxodGuo 及 8-oxoGua 之基礎背景值範圍。

關鍵字:基因氧化傷害、液相層析串聯質譜儀、連線固相萃取、臨床級

Clinical-scale high-throughput analysis of oxidative DNA lesions in various biological samples by isotope-dilution LC-MS/MS with on-line solid-phase extraction & international cooperation (2)

Chiung-Wen Hu, Ruey-Hong Wong and Yan-Zin Chang

Abstract

Reactive oxygen species (ROS) in living cells have been suggested to be associated with the development of aging, cancer and some degenerative diseases since they cause oxidative damage to nucleic acids, proteins, and lipids. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG or so called 8-oxodGuo) is one of the most abundant DNA lesion formed by the addition of the hydroxyl radical to the C8 position of guanine in DNA. The presence of 8-oxodGuo residues in DNA can lead to GC to TA transversion unless repaired before DNA replication. This lesion could be repaired either by base excision repair (BER) pathway and nucleotide excision repair (NER) pathway, and the resulting repair products were 8-oxoGua and 8-oxodGuo, respectively. In the past decade, the 8-oxodGuo level in body fluids has been widely used as a biomarker of oxidative stress. Conversely, little information was available on the BER repair product 8-oxoGua in body fluids that represented the major repair product of oxidative DNA lesion due to there were pathways other than repair process could contribute to 8-oxoGua levels in body fluids. However, it was recently demonstrated that urinary 8-oxoGua and 8-oxodGuo measurements may be attributed entirely to DNA repair. Meanwhile, it has been suggested that the measurement of oxidatively damaged DNA (i.e. 8-oxodGuo/8-oxoGua) has a great potential in clinical use to serve as a biomarker of disease development risk and efficacy of therapy. There is however some problems that need to be solved before markers could be used clinically. For example, what is the standard analytical methodology and reference ranges for 8-oxodGuo and 8-oxoGua?

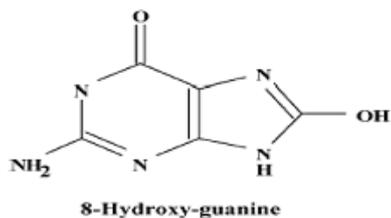
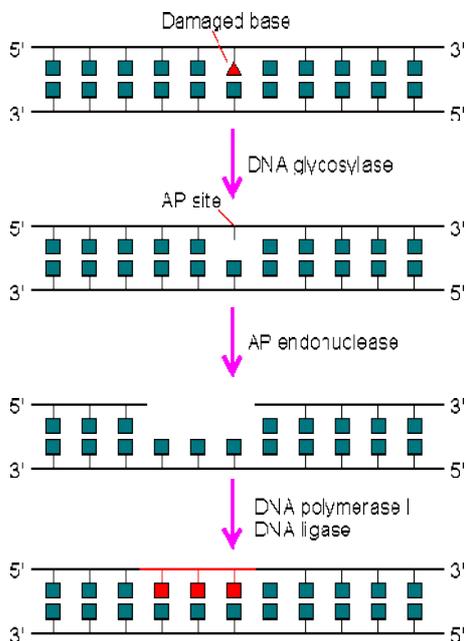
In the past 20 years, many methods have been successfully applied for analyzing mostly 8-oxodGuo, such as high performance liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ECD), gas chromatography with mass spectrometry (GC-MS) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). However, they have drawbacks and could be difficult to perform in the clinical laboratory for routine measurements, such as labor intensiveness, necessity for chemical derivatization, low sensitivity or a limited specificity due to possible interferences arising from the complex biological matrix (i.e. crude urine). Recently, liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) has become a powerful technology to overcome the sensitivity and specificity issues in analysis of DNA lesions. With the use of isotope-dilution and on-line sample extraction (on-line SPE), LC-MS/MS has been proved to be the most accurate methodology and would allow for high-throughput analysis in clinical trials.

Therefore, the aims of this work are to develop a serial "on-line SPE LC-MS/MS" method for clinical scale high-throughput 8-oxodGuo/8-oxoGua analysis in various biological samples. In the meantime, we have been invited to participate 「European Standards Committee for the Analysis of Urinary (DNA) Lesions (ESCUA)」. With our newly developed methods, we are going to compare a multiple methods for analysis urinary 8-oxodGuo and 8-oxoGua, and further establish reference ranges of 8-oxodGuo/8-oxoGua in body fluids.

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

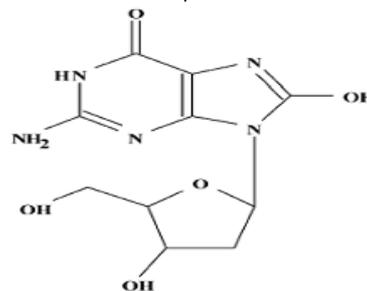
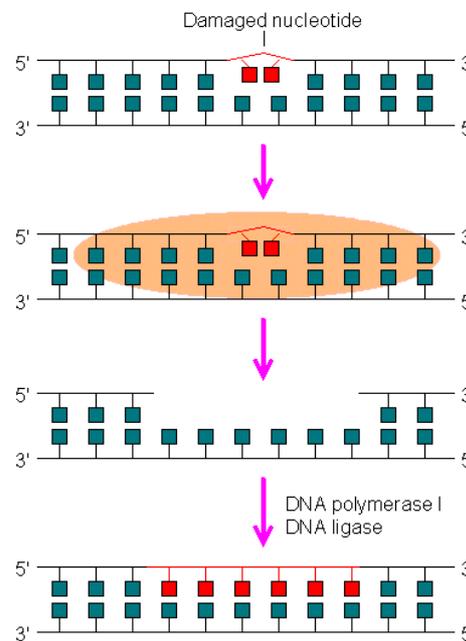
織/細胞 DNA 中 8-oxodGuo 的含量，所代表的是細胞受到破壞經修復後達到平衡的穩定量 (steady-state level)。或由體液中量測 8-oxodGuo 與 8-oxoGua 的濃度，代表的是基因修復結果[Cooke et al., 2005]。

(1) BER pathway



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

(2) NER pathway



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

圖二、體液中 8-oxoGua 與 8-oxodGuo 之來源路徑

體外實驗發現到對於 8-oxodGuo 小型態的鹼基損傷修復主要是以 BER 路徑為主，負責 75% 的修復。而 NER 路徑則是負責修復剩下的 25% 鹼基損傷[Dianov et al., 1998]。這樣的修復機制最近也在人體實驗中證實，Gackowski et al. (2003)同時分析尿液中 8-oxodGuo 及 8-oxoGua 發現到尿液中 8-oxoGua 的含量幾乎是 8-oxodGuo 的三倍。然而有趣的是，過去大部份研究仍以分析體液中 8-oxodGuo 濃度為基因氧化傷害的主要指標而不是分析 8-oxoGua。其主要的原因是早期動物實驗發現到尿液中 8-oxoGua 含量會嚴重受到(含有核酸的)飲食影響[Fraga et al., 1990; Park et al., 1992]。另外尿液中含有其他可能的 8-oxoGua 供獻源包括來自 RNA(相同的鹼基)及細胞死亡等[Cooke et al., 2002]。然而 Cooke et al. (2005)最新的研究已去除這些疑慮，在人體實驗發現若人直接服用以 $^{15}\text{N}_5$ 標示的高度氧化 DNA，在服用後連續 14 天的尿液樣本皆無法測量到 $^{15}\text{N}_5$ 標示 8-oxoGua 及 8-oxodGuo。而來自 RNA 的供獻也被認定其可能性很小，由於至今尚未找出任何酵素可辨識及釋出 RNA 上的 8-oxoGua。另外因 N-glycosylic bond 鍵結穩定所以 RNA 要自發性的釋

出 (depurination) 8-oxoGua 亦不太容易[Rozalski et al., 2005]。至於另一可能供獻源 ”細胞死亡”，許多研究認為若尿液中的 8-oxoGua 及 8-oxodGua 是來自細胞死亡的話，則尿液中正常的及損壞(被氧化的)去氧核昔或鹼基的比例 (8-oxodGua/dG 或 8-oxoGua/G) 應與細胞中的比例相同。然而尿液分析發現不論是 8-oxodGua/dG 或 8-oxoGua/G 的比值與細胞中的比值相差甚遠，故推測尿液中的 8-oxodGua 及 8-oxoGua 並非來自細胞凋亡[Cooke et al., 2005]。

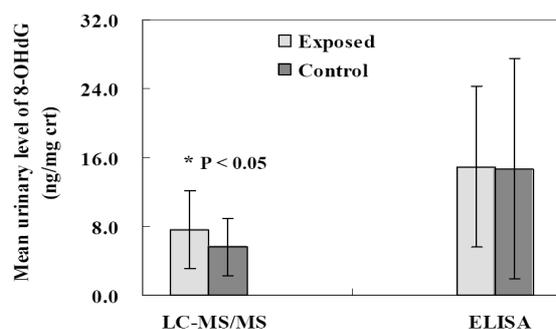
總合上述，尿液中不論 8-oxodGua 或 8-oxoGua 皆是來自體內修復的結果 [Cooke et al., 2005]。故若能同時定量尿液(或其它體液)中 8-oxoGua 及 8-oxodGua，應能更有效反映體內基因氧化傷害的修復情形。然而過去研究大部份量測的修復產物是以 8-oxodGua 為主，文獻中對於 8-oxoGua 分析技術描述不多。對於又能同時分析體液中 8-oxodGua 及 8-oxoGua 更是少之又少。另一方面，體液中 8-oxoGua 及 8-oxodGua (repair products)與細胞 DNA 8-oxodGua(steady-state level)的相關性亦亟待了解。

各種生物檢體之 8-oxodGua & 8-oxoGua 分析技術發展現況

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

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

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



圖三、Isotope dilution LC-MS/MS 與 ELISA 分析方法比較

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

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

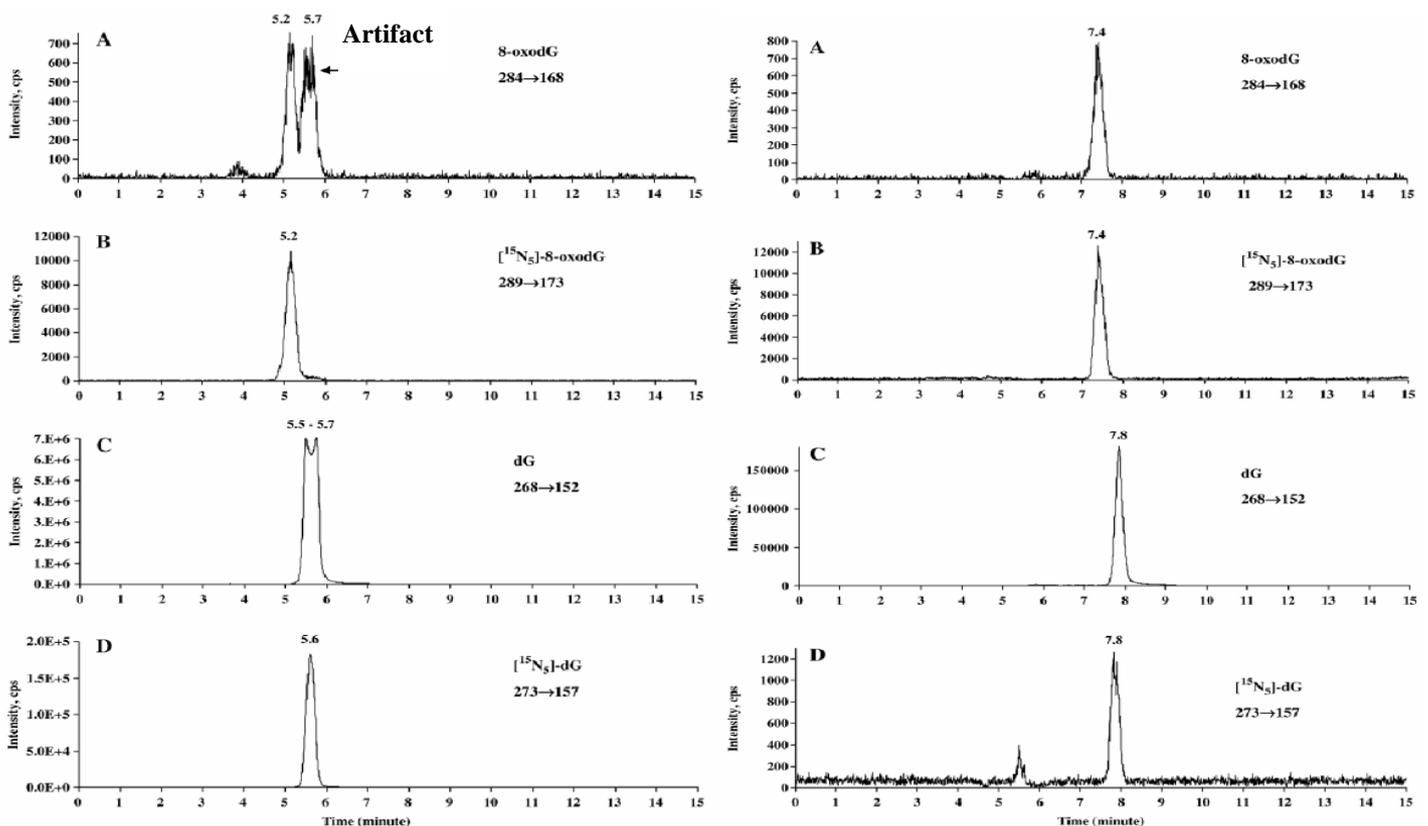
(3) 血液(血清/血漿)8-oxodGuo 分析: 8-oxodGuo 於血液樣本的相關分析在文獻中也很少見。特別是採血是侵入性的且血液 8-oxodGuo 的含量極低(~ pg/ml)並含多種蛋白，所以血液分析經常需要冗長的前處理，也因此臨床上的應用受到限制。目前文獻中的分析方法主要是 HPLC-ECD 與 ELISA kit。然而兩種方法所分析出一般健康人的背景值差異竟然高達~ 100 倍(HPLC-ECD: ~ 13 pg/ml; ELISA: > 1200 pg/ml)。因此已有學者建議當利用 ELISA kit 定量血液 8-oxodGuo 時，是需要以 HPLC 法純化血液以提高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

(4) 周邊血液細胞(leukocytes)/組織 DNA 8-oxodGuo 分析: 不同於前面各種體液的 8-oxodGuo 分析，直接定量白血球 DNA 或組織 DNA 中 8-oxodGuo 的含量反映的是體內穩定態(steady-state level)的基因氧化傷害程度。過去的文獻發現到不同的化學或生化分析方法所測的細胞 DNA 8-oxodGuo 的含量差異可大至 1000 倍 [reviewed in Collins et al., 2004; Gedik et al., 2005]。主要的原因是 DNA 樣本中有著極高量的正常核苷，所以 DNA 8-oxodGuo 的量測非常容易在前處理程序中造成 DNA 的人為氧化，導致 8-oxodGuo 含量高估。

有鑑於此，European Standards Committee on Oxidative DNA Damage (ESCODD) 於 1997 年開始

解決人為氧化的問題並確定不同分析方法造成差異的原因。ESCODD 一系列的研究結果發現 DNA 萃取及水解過程是造成人為氧化的主要來源，可藉由全程添加抗氧化劑與使用 chaotropic NaI-based DNA 萃取法來降低人為氧化的發生[Gedik et al., 2005]。另外在各種不同分析方法比較結果發現 [reviewed in ESCODD 2002; Guetens et al., 2002; Mateos and Bravo 2007]，HPLC-ECD 是最多人使用的分析方法且準確度高。而 GC-MS 因在衍生化的過程中會造成嚴重的人為氧化，建議 DNA 樣本在衍生化之前需先以 LC 純化。LC-MS/MS 分析法具高敏感性、特異性，近年來被認為是除 HPLC-ECD 外，另一個準確性高的分析方法。然而許多現有的 LC-MS/MS 分析法發現到在電噴灑離子化的過程會導致高量的正常核苷人為氧化，形成所謂的”artifactual response”進而影響 8-oxodGuo 的定量[Ravanat et al., 1998; Singh et al., 2003]。目前現有的解決方法是將 8-oxodGuo 與正常核苷(dGuo)在 LC 的層析時間拉開 (> 4 min) 且同時搭配 UV 偵測儀分析高量的正常核苷，而不以質譜儀直接分析 [Matter et al., 2006; Regulus et al., 2004]。

在我們最新的研究已完全克服了 LC-MS/MS 在電噴灑離子化所造成的”artifactual response”問題並能同時準確定量 8-oxodGuo 與 dG。其原理主要是利用連線固相萃取搭配同位素內標的使用將 DNA 水解物中高量的正常核苷 (dGuo)先行移除，只保留 < 1% 的正常核苷進入質譜分析，如此可避免高量 dGuo 在電噴霧離子化的過程產生”artifactual response”及質譜儀飽和。如圖四所示，左邊層析圖是未將 DNA 水解物中高量 dGuo 先行移除，進而在電噴霧離子化的過程產生嚴重的”artifactual response”。相反的，右圖則是已利用 on-line SPE 移除高量的 dGuo 再進入質譜分析，很明顯的，”artifactual response”已完全消失。此外，我們也證明了常用於 DNA 水解物分析的前處理步驟(如萃取及濃縮)，將造成嚴重的”人為氧化”問題，而抗氧化劑的添加只能避免部分的人為氧化。因此為避免樣本前處理所衍生的”人為氧化”，最佳的策略便是採用我們所建議的 on-line SPE 直接量測方法。相關的研究成果最近已發表在 *Free Radical Biology and Medicine* 國際知名期刊 [Chao et al., 2008]。



圖四、來自電噴灑離子化的人為氧化[Chao et al., 2008]

不同於 8-oxodGuo 的分析方法眾多，文獻中對於 8-oxoGua 於各種體液的分析方法描述非常有限。其中目前 8-oxoGua 分析只限於尿液樣本。Gackowski et al. (2003) 先是利用 HPLC 分離出再以 GC-MS 分別定量，其分析程序繁瑣、耗時。Chiou et al. (2003) 曾利用 ELISA 方法同時分析尿液中所有 8-oxodGuo 及 8-oxoGua，然而此法所利用的抗體無法分辨來自 RNA 的氧化產物 (8-oxoguanosine) 而造成誤判。最近 Malayappan et al. (2007) 嘗試以 LC-MS/MS 同時分析尿液 8-oxodGuo、8-oxoGua、8-oxoguanosine 及 fapy-guanine。然而此方法並沒有搭配連線固相萃取，同時由於尿液基質複雜直接注射尿液樣本的結果造成離子抑制及離子源污染等問題，使得方法敏感度不足及影響定量的準確性。因此對於可準確、快速且能同時定量各種體液中 8-oxodGuo 及 8-oxoGua 的分析方法急待建立。

基因氧化傷害量測作為臨床指標之可行性

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

(1) 一般健康人其體內基礎背景值範圍(reference range)?

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

(2) 體內各種細胞其氧化傷害程度是否相同?

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

(3) 周邊血液單核細胞(如白血球/淋巴球)是否可作為其他組織的替代檢體?

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

(4) 標準分析方法?

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

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

二、研究目的

本研究計畫為期兩年，將建立一系列「連線固相萃取-液相層析串聯質譜儀配合同位素稀釋法」

於各種生物檢體的 8-oxodGuo (及 8-oxoGua) 定量以期未來能全面應用於臨床分析。同時並參與國際合作計畫藉由國際間不同分析方法的比較以確立基因氧化傷害之標準分析方法及一般人體內 8-oxodGuo 之基礎背景值範圍。

第一年 建立「連線固相萃取-液相層析串聯質譜儀(on-line SPE LC-MS/MS)配合同位素稀釋法」之分析技術，能夠同時準確且快速分析各種生物檢體之 8-oxodGuo 含量。尿液及細胞內 8-oxodGuo 量測的 on-line SPE LC-MS/MS 分析方法已在計畫主持人執行中的國科會計畫初步建立完成 [NSC 96-2314-B-040-021]。然而，目前對於血液及唾液中 8-oxodGuo 量測的 on-line SPE LC-MS/MS 分析方法仍待建立。

1. 開發血液樣本 8-oxodGuo (及 8-oxoGua) 之「連線固相萃取-液相層析串聯質譜儀(on-line SPE LC-MS/MS) 配合同位素稀釋法」分析方法。由於血液中 8-oxodGuo 含量遠小於尿液、富含蛋白質、基質干擾大，樣本需要濃縮及純化才能進行分析。未來血液加入同位素內標後，經簡單的前處理(如:蛋白質沉澱法或離心過濾法)即可上機分析，大大節省分析之時間與耗材，同時可快速連續分析大量樣本。
2. 開發唾液樣本 8-oxodGuo (及 8-oxoGua) 之「連線固相萃取-液相層析串聯質譜儀(on-line SPE LC-MS/MS) 配合同位素稀釋法」分析方法。由於唾液中 8-oxodGuo 含量遠小於尿液、富含蛋白質且黏稠，樣本需要濃縮及純化才能進行分析。未來唾液加入同位素內標後，經簡單的前處理(如:蛋白質沉澱法或離心過濾法)即可上機分析，大大節省分析之時間與耗材，同時可快速連續分析大量樣本。

第二年 由於受到歐盟組織「European Standards Committee for the Analysis of Urinary (DNA) Lesions (ESCUA)」的邀請，共同參與基因氧化傷害的相關研究。未來將以我們所建立的 on-line SPE LC-MS/MS 於各種生物檢體的 8-oxodGuo 分析方法與歐洲、美國、日本其他實驗室的分析方法進行比較，以找出不同分析方法造成分析結果差異的原因並確立基因氧化傷害之標準分析方法。(分析方法包括: LC-MS/MS、GC-MS、LC-EC、ELISA)

三、參考文獻

Basset-Seguin N, Moles JP, Mills V, Dereure O, Guilhou JJ. TP53 tumor suppressor gene and skin carcinogenesis. *J Invest Dermatol* 1994;103(5 Suppl):102S-106S.

Breton J, Sichel F, Bianchini F, Prevost V. Measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by a commercially available ELISA test: comparison with HPLC/electrochemical detection in calf thymus DNA and determination in human serum. *Anal Lett* 2003;36:123-34.

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 Radic Biol Med* 2008;44:464-737.

- Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, Nishimura S, Loeb LA. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G---T and A---C substitutions. *J Biol Chem* 1992;267:166-72.
- Chiou CC, Chang PY, Chan EC, Wu TL, Tsao KC, Wu JT. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine and its analogs as DNA marker of oxidative stress: development of an ELISA and measurement in both bladder and prostate cancers. *Clin Chim Acta* 2003;334:87-94.
- Collins AR, Cadet J, Möller L, Poulsen HE, Viña J. Are we sure we know how to measure 8-oxo-7,8-dihydroguanine in DNA from human cells? *Arch Biochem Biophys* 2004;423:57-65.
- Cooke MS, Lunec J, Evans MD. Progress in the analysis of urinary oxidative DNA damage. *Free Radic Biol Med* 2002;33:1601-14.
- Cooke MS, Evans MD, Dove R, Rozalski R, Gackowski D, Siomek A, Lunec J, Olinski R. DNA repair is responsible for the presence of oxidatively damaged DNA lesions in urine. *Mutat Res* 2005;574:58-66.
- Cooke MS, Singh R, Hall GK, Mistry V, Duarte TL, Farmer PB, Evans MD. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography-tandem mass spectrometry methodology for the analysis of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in saliva and urine. *Free Radic Biol Med* 2006a;41:1829-1836.
- Cooke MS, Olinski R, Evans MD. Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance? *Clin Chim Acta* 2006b;365:30-49.
- Dianov G, Bischoff C, Piotrowski J, Bohr VA. Repair pathways for processing of 8-oxoguanine in DNA by mammalian cell extracts. *J Biol Chem* 1998;273:33811-6.
- Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med* 2002;32:1102-15.
- ESCODD (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage). Comparative analysis of baseline 8-oxo-7,8-dihydroguanine in mammalian cell DNA, by different methods in different laboratories: an approach to consensus. *Carcinogenesis* 2002;23:2129-33.
- European Standards Committee on Urinary (DNA) Lesion Analysis, Evans MD, Olinski R, Loft S, Cooke MS. Toward consensus in the analysis of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine as a noninvasive biomarker of oxidative stress. *FASEB J.* 2010;24:1249-60.
- Espinosa O, Jiménez-Almazán J, Chaves FJ, Tormos MC, Clapes S, Iradi A, Salvador A, Fandos M, Redón J, Sáez GT. Urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG), a reliable oxidative stress marker in hypertension. *Free Radic Res* 2007;41:546-54.

- Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res* 2004;567:1-61.
- Foksinski M, Kotzbach R, Szymanski W, Olinski R. The level of typical biomarker of oxidative stress 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine is higher in uterine myomas than in control tissues and correlates with the size of the tumor. *Free Radic Biol Med* 2000;29:597-601.
- Fraga CG, Shigenaga MK, Park JW, Degan P, Ames BN. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:4533-7.
- Gackowski D, Speina E, Zielinska M, Kowalewski J, Rozalski R, Siomek A, Paciorek T, Tudek B, Olinski R. Products of oxidative DNA damage and repair as possible biomarkers of susceptibility to lung cancer. *Cancer Res* 2003;63:4899-902.
- Gedik CM, Collins A; ESCODD (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage). Establishing the background level of base oxidation in human lymphocyte DNA: results of an interlaboratory validation study. *FASEB J* 2005;19:82-4.
- Guertens G, De Boeck G, Highley M, van Oosterom AT, de Bruijn EA. Oxidative DNA damage: biological significance and methods of analysis. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2002;39:331-457.
- Halliwell B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem J* 2007;401:1-11.
- Hu CW, Wu MT, Chao MR, Pan CH, Wang CJ, Swenberg JA, Wu KY. Comparison of analyses of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine using isotope-dilution liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry and enzyme-linked immunosorbent assay. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2004;18:505-10.
- Hu CW, Wang CJ, Chang LW, Chao MR. Clinical-scale high-throughput analysis of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine by isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry with on-line solid-phase extraction. *Clin Chem* 2006;52:1381-8.
- Hu CW, Chao MR, Sie CH. Urinary analysis of 8-oxo-7,8-dihydroguanine and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine by isotope-dilution LC-MS/MS with automated solid-phase extraction: Study of 8-oxo-7,8-dihydroguanine stability. *Free Radic Biol Med*. 2010a;48:89-97.
- 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. *Clin Chim Acta*. 2010b;411:1218-22.
- Kono Y, Nakamura K, Kimura H, Nishii N, Watanabe A, Banba K, Miura A, Nagase S, Sakuragi S, Kusano KF, Matsubara H, Ohe T. Elevated levels of oxidative DNA damage in serum and myocardium of patients with heart failure. *Circ J* 2006;70:1001-5.

- Malayappan B, Garrett TJ, Segal M, Leeuwenburgh C. Urinary analysis of 8-oxoguanine, 8-oxoguanosine, fapy-guanine and 8-oxo-2'-deoxyguanosine by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry as a measure of oxidative stress. *J Chromatogr A* 2007;1167:54-62.
- Mateos R, Bravo L. Chromatographic and electrophoretic methods for the analysis of biomarkers of oxidative damage to macromolecules (DNA, lipids, and proteins). *J Sep Sci* 2007;30:175-91.
- Matsui A, Ikeda T, Enomoto K, Hosoda K, Nakashima H, Omae K, Watanabe M, Hibi T, Kitajima M. Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, in human breast cancer tissue and its relationship to GSTP1 and COMT genotypes. *Cancer Lett* 2000;151:87-95.
- Matter B, Malejka-Giganti D, Csallany AS, Tretyakova N. Quantitative analysis of the oxidative DNA lesion, 2,2-diamino-4-(2-deoxy-beta-D-erythro-pentofuranosyl)amino]-5(2H)-oxazolone (oxazolone), in vitro and in vivo by isotope dilution-capillary HPLC-ESI-MS/MS. *Nucleic Acids Res* 2006;34:5449-60.
- Mecocci P, Polidori MC, Cherubini A, Ingegneri T, Mattioli P, Catani M, Rinaldi P, Cecchetti R, Stahl W, Senin U, Beal MF. Lymphocyte oxidative DNA damage and plasma antioxidants in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2002;59:794-8.
- Musarrat J, Arezina-Wilson J, Wani AA. Prognostic and aetiological relevance of 8-hydroxyguanosine in human breast carcinogenesis. *Eur J Cancer* 1996;32A:1209-14.
- Pan HZ, Chang D, Feng LG, Xu FJ, Kuang HY, Lu MJ. Oxidative damage to DNA and its relationship with diabetic complications. *Biomed Environ Sci* 2007;20:160-3.
- Park EM, Shigenaga MK, Degan P, Korn TS, Kitzler JW, Wehr CM, Kolachana P, Ames BN. Assay of excised oxidative DNA lesions: isolation of 8-oxoguanine and its nucleoside derivatives from biological fluids with a monoclonal antibody column. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:3375-9.
- Pilger A, Ivancsits S, Germadnik D, Rudiger HW. Urinary excretion of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine measured by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002;778:393-401.
- Poulsen HE. Oxidative DNA modifications. *Exp Toxicol Pathol* 2005;57 Suppl 1:161-9.
- Ravanat JL, Duret B, Guiller A, Douki T, Cadet J. Isotope dilution high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry assay for the measurement of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in biological samples. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1998;715:349-56.

- Regulus P, Spessotto S, Gateau M, Cadet J, Favier A, Ravanat JL. Detection of new radiation-induced DNA lesions by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2004;18:2223-8.
- Rozalski R, Winkler P, Gackowski D, Paciorek T, Kasprzak H, Olinski R. High concentrations of excised oxidative DNA lesions in human cerebrospinal fluid. *Clin Chem* 2003;49:1218-21.
- Rozalski R, Siomek A, Gackowski D, Foksinski M, Gran C, Klungland A, Olinski R. Substantial decrease of urinary 8-oxo-7,8-dihydroguanine, a product of the base excision repair pathway, in DNA glycosylase defective mice. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37:1331-6.
- Sato S, Mizuno Y, Hattori N. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine levels as a biomarker for progression of Parkinson disease. *Neurology* 2005;64:1081-3.
- Sawamoto Y, Sugano N, Tanaka H, Ito K. Detection of periodontopathic bacteria and an oxidative stress marker in saliva from periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* 2005;20:216-20.
- Shimoi K, Kasai H, Yokota N, Toyokuni S, Kinae N. Comparison between high-performance liquid chromatography and enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in human urine. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11:767-70.
- Singh R, McEwan M, Lamb JH, Santella RM, Farmer PB. An improved liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the determination of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in DNA samples using immunoaffinity column purification. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2003;17:126-34.
- Singh R, Farmer PB. Liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry: the future of DNA adduct detection. *Carcinogenesis* 2006;27:178-96.
- Takane M, Sugano N, Iwasaki H, Iwano Y, Shimizu N, Ito K. New biomarker evidence of oxidative DNA damage in whole saliva from clinically healthy and periodontally diseased individuals. *J Periodontol* 2002;73:551-4.
- Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* 1996;313 (Pt 1):17-29.
- Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT. Urinary 8-oxodGuo: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta* 2004;339:1-9.

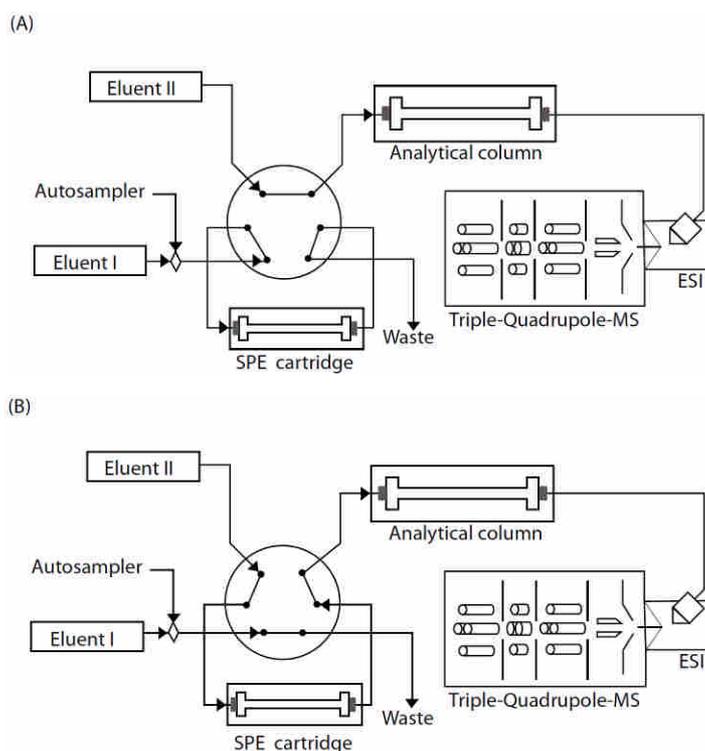
四、研究方法

本研究計畫為期兩年，將建立一系列「連線固相萃取-液相層析串聯質譜儀配合同位素稀釋法」於各種生物檢體的 8-oxodGuo(及 8-oxoGua)定量以期未來能全面應用於臨床分析。同時並參與國際合作計畫藉由國際間不同分析方法的比較以確立基因氧化傷害之標準分析方法及一般人體內 8-oxodGuo 之基礎背景值範圍。

1. 唾液/血液中 8-oxodGuo(及 8-oxoGua)分析

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

然而由於唾液與血液中 8-oxodGuo 濃度甚低且富含多種蛋白質，所以檢體需要濃縮及純化才能進入 on-line SPE LC-MS/MS 分析。過去文獻曾利用手動固相萃取法(manual solid phase extraction)以去除雜質再以 LC-MS/MS 分析，然而效果不佳且程序繁瑣不易於臨床分析使用[Cooke et al., 2006a]。本研究將重新開發較簡易之前處理以搭配 on-line SPE LC-MS/MS，如蛋白質沉澱法：藉由不同溶劑以沉澱分離蛋白質。



圖五、On-line SPE LC-MS/MS 系統示意圖 (A) position A (purification/enrichment) (B) position B (analysis)

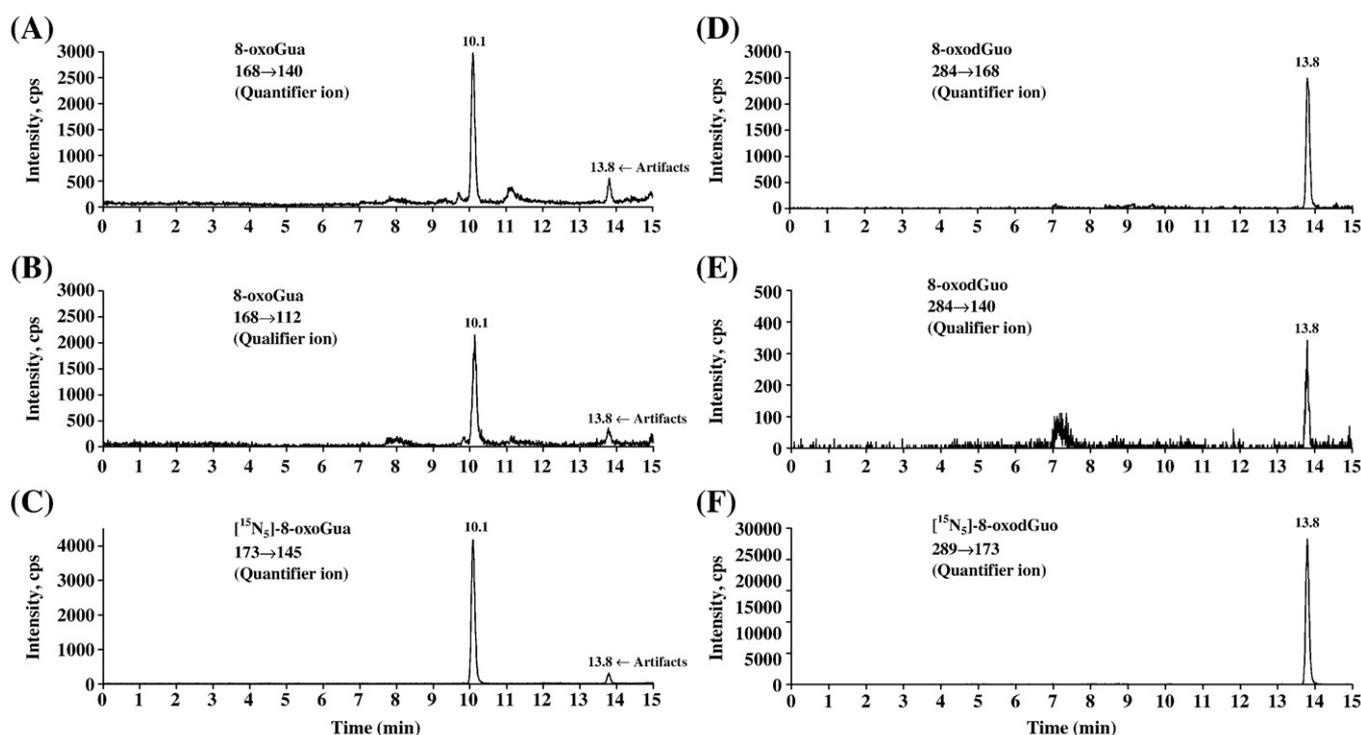
2. 人體樣本來源

本計畫為期兩年，收集人體樣本估計約 50 人。研究對象之招募將配合中山醫學大學附設醫院之健檢，收集年齡為 20-60 歲之健康成人(排除女性已懷孕者)。收集之檢體包括：尿液 (20 ml)、血液 (8 ml)及唾液 (2 ml)。研究對象的個人特徵資料，是在每個研究對象提供其同意書後經由面對面的問卷訪視所收集。問卷內容包括：人口學特質、生活型態如抽煙及飲酒習慣與疾病史。

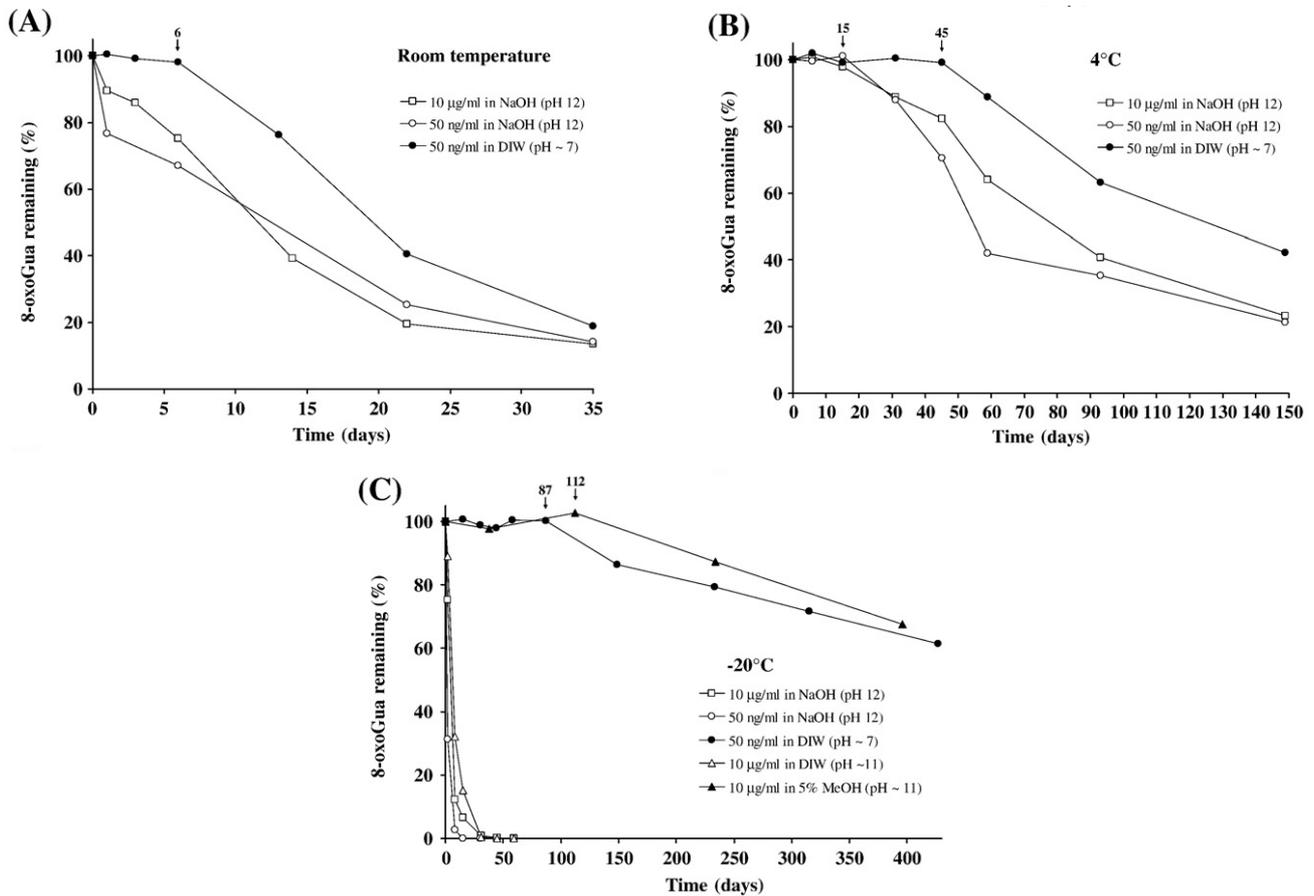
五、研究結果與討論

1. 成功建立 on-line SPE LC-MS/MS 分析多種體液中 8-oxodGuo (及 8-oxoGua)

在尿液分析方面，本研究成功建立 on-line SPE LC-MS/MS 分析法可同時定量尿液 8-oxoGua 及 8-oxodGuo，研究成果已發表在國際知名期刊 *Free Radical Biology and Medicine* (Hu et al., 2010 a)。尿液只需要簡單稀釋，在添加同位素內標準品後，即可上機分析。一般健康成人尿液分析結果，如下圖所示。本研究更進一步探討 8-oxoGua 的穩定性。研究結果發現不同儲存環境下 8-oxoGua 的穩定程度差異甚大。其中以在 -20°C 含有 5% methanol 的情況下，8-oxoGua 的保存期限為最久可達 112 天，如圖七所示。

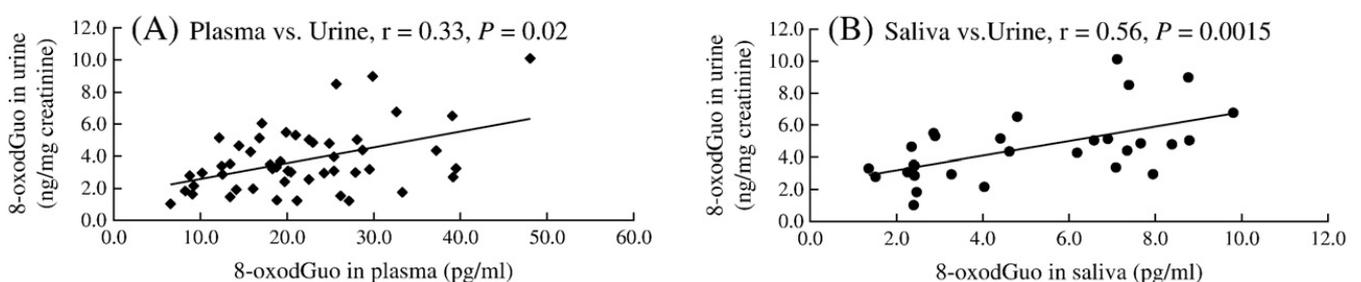


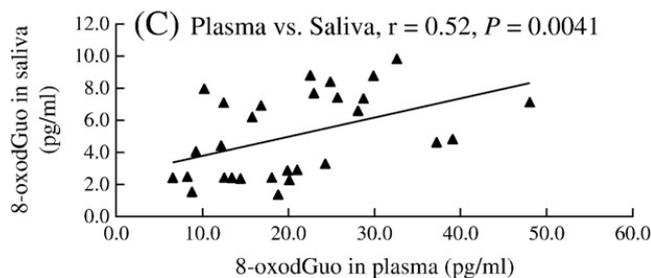
圖六、尿液 8-oxoGua 及 8-oxodGuo 層析圖 (Hu et al., 2010a)



圖七、8-oxoGua 於不同儲存環境下之穩定性(Hu et al., 2010a)

由於唾液及血液基質複雜，本研究曾嘗試以蛋白質沉澱法進行初步純化。取 0.5 ml (或 1 ml) 唾液(或血液)在添加 $^{15}\text{N}_5$ -8-oxodGuo 內標後，加入有機溶劑(如 Methanol、Ethanol、Acetonitrile、Acetone) (有機溶劑占全部體積的 75%)以進行蛋白質沉澱。經離心取上層液，使用真空減壓乾燥機濃縮乾燥後以 5% methanol/0.1% formic acid (v/v) 回溶，最後以連線固相萃取-液相層析串聯質譜儀分析。然而初步結果發現，4 種有機溶劑以 Acetonitrile 去除蛋白質的效果最好，但純化效果仍有限。本研究另改以手動固相萃取 (manual SPE by Sep-Pak C18 cartridge)的方式進行樣本前處理再以 on-line SPE LC-MS/MS 分析。此分析方法已可成功定量血液及唾液中的 8-oxodGuo。相關成果已發表在國際期刊 *Clinica Chimica Acta* (Hu et al., 2010b)。其中本研究更進一步探討各種體液間 8-oxodGuo 的相關性。如圖八所示，尿液 8-oxodGuo 與唾液或血液中 8-oxodGuo 濃度成明顯正相關。此結果證實經修復的 8-oxodGuo 進入血液後會再排出至尿液中。



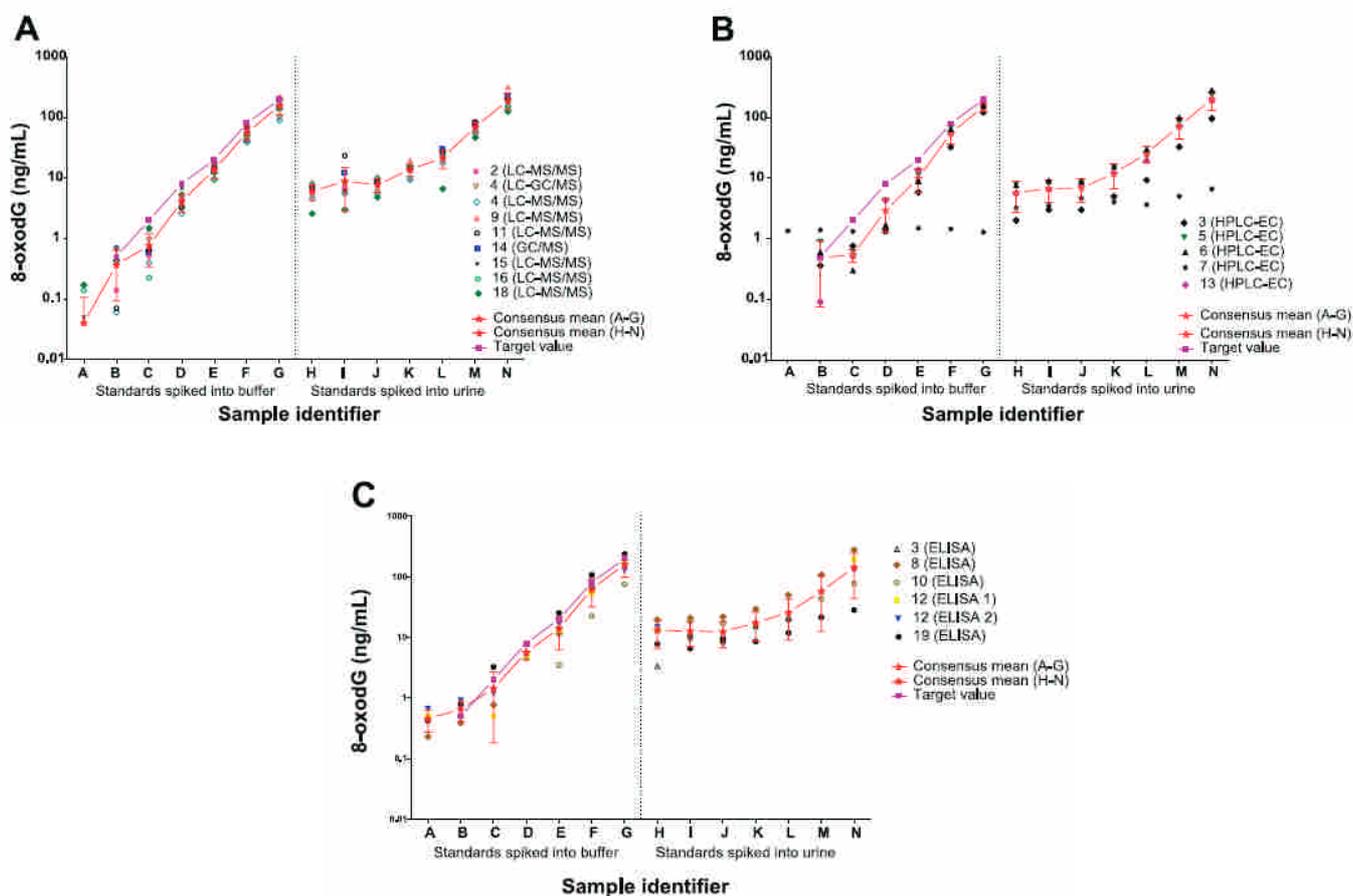


圖八、8-oxodGuo 於不同體液間之相關性(Hu et al., 2010b)

2. 尿液 8-oxodGuo 國際分析方法比對

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

初步比較結果發現到 4 種分析方法，以 LC-MS/MS 較為準確且穩定能有效定量 8-oxodGuo。而 HPLC-ECD 及 ELISA 實驗室間比對結果差異較大。目前仍持續比較對於實際尿液 8-oxodGuo 的量測結果，其部份比較結果已發表在 *The FASEB Journal* (ESCUA et al., 2010)。



圖九、8-oxodGuo 各種分析方法比較 (ESCUA et al., 2010)

六、研究成果自評

過去十年，研究已證實基因氧化性傷害與癌症、多種慢性病以及老化有著密不可分的關係。許多臨床研究更進一步認為基因氧化傷害的檢測未來可作為疾病發展的風險指標及評估治療的效標。然而在基因氧化傷害量測作為臨床的指標之前，如前面所提過的有些問題仍待進一步釐清。為解決這些問題，當前亟需的是去建立敏感性、特異性高，且能高通量運用在臨床上的分析方法(如 on-line SPE LC-MS/MS)，以幫助全球分析方法的標準化及背景值範圍的確立。本研究相關成果兩年來共 3 篇 SCI 期刊發表 (平均 impact fact = 5)及 3 篇國際會議論文。同時本研究也開始第二階段的國際分析比對工作已進一步釐清各國實驗室分析方法造成差異的原因。

無研發成果推廣資料

97 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：胡瓊文		計畫編號：97-2314-B-040-017-MY2					
計畫名稱：基因氧化傷害之全面臨床分析檢驗方法開發及國際合作(二)							
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數(含實際已達成數)	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力 (本國籍)	碩士生	1	1	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
國外	論文著作	期刊論文	3	3	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	3	3	100%		
		專書	0	0	100%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力 (外國籍)	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		

<p>其他成果</p> <p>(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。)</p>	<p>本研究相關成果已有 3 篇 SCI 國際期刊(平均 impact fact = 5)及 3 篇發表於國際會議中。</p>
---	---

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

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：

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 100 字為限）

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

研究已證實基因氧化性傷害與癌症、多種慢性病以及老化有著密不可分的關係。許多臨床研究更進一步認為基因氧化傷害的檢測未來可作為疾病發展的風險指標及評估治療的效標。然而在基因氧化傷害量測作為臨床的指標之前，如前面所提過的有些問題仍待進一步釐清。為解決這些問題，當前亟需的是去建立敏感性、特異性高，且能高通量運用在臨床上的分析方法(如 on-line SPE LC-MS/MS)，以幫助全球分析方法的標準化及背景值範圍的確立。本研究已初步開發完成多種體液中 8-oxodGuo 之 ' on-line SPE LC-MS/MS' 的分析方法。同時本研究也已初步完成與歐盟研究團隊與其他國家實驗室各種現有分析方法的比較(HPLC-ECD、GC-LC-MS、LC-MS/MS 及 ELISA)。部份國際分析方法比對結果 (HPLC-ECD vs. ELISA vs. LC-GC/MS)已發表在國際期刊。本研究相關成果已有 3 篇 SCI 國際期刊(平均 impact fact = 5)及 3 篇發表於國際會議中。