

國立臺灣大學公共衛生學院職業醫學與工業衛生研究所



碩士論文

Graduate Institute of Occupational Medicine and Industrial Hygiene

College of Public Health

National Taiwan University

Master thesis

分析經 2',3' - 環氧黃樟素處理的小白鼠的 DNA 共價鍵結物

Analysis of DNA adducts in mice treated with safrole 2',3'-oxide

魏宇孜

Wei, Yu-Tzu

指導教授：吳焜裕 博士

Advisor: Wu Kuen-Yuh, Ph.D.

中華民國 103 年 7 月

July, 2014

國立臺灣大學碩士學位論文  
口試委員會審定書



分析經 2',3' - 環氧黃樟素處理的小白鼠的 DNA 共價鍵結  
物

Analysis of DNA adducts in mice treated with safrole  
2',3'-oxide

本論文係魏宇孜君 (R01841005) 在國立臺灣大學職業醫學與工業衛生研究所完成之碩士學位論文，於民國 103 年 7 月 24 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

吳焜裕

(簽名)

(指導教授)

鄭育心

劉宗榮

江素瑛

吳焜裕

## 誌謝



感謝父母的支持讓我能夠心無旁騖的準備我的研究所課業、感謝吳焜裕老師擔任我的指導老師，在碩士班兩年裡給了我許多學習的資源與指教、感謝實驗室學長、姐們的協助，其中，特別感謝三位學長、姐，陳鑫昌、陳淑婷與沈璫卿博士，在我實驗上遇到困難時，給了我許多寶貴的建議，讓我的實驗得以順利進行、感謝江素瑛老師與老師的助理寶穗學姐，在細胞實驗、動物實驗的前置作業與過程中給予我許多幫助、感謝碩班的同學(書妤、思韓、軒綺、律學、力瑄、育正、思源、怡臻、君綺、芙慧、佩靜.....)，大家一起熬夜做實驗、一起朝畢業的目標努力，讓我的學習路上不孤單、感謝大學的趙玉英老師，在我實驗上遇到挫折時，鼓勵我、陪伴我找出解決辦法。最後，要最感謝的是一路鼓勵我、鞭策我的羅宇軒學長，感謝你總是在我脆弱的時後拉我一把。在我碩士兩年生涯中，幫助過我的人真的太多了，謝謝你們讓我能帶著滿滿的祝福，繼續往下一個人生的階段走下去！



## 摘要

黃樟素為自然存在之物質，為黃樟油的主要成分，也存在於許多香料中，如：羅勒、荳蔻、肉桂、黑與白胡椒...等，一般人在日常生活中可能會暴露到黃樟素。黃樟素進入人體後會被代謝成四種主要代謝物，而其中2',3'-環氧黃樟素(SFO)為黃樟素的親電子代謝物質之一，前人研究嘗試以<sup>32</sup>P-後標籤法分析，無法在暴露SFO的小鼠肝臟組織內分析到SFO在體內生成的DNA共價鍵結物，因此在過去一直被認為不具有基因毒性，然而，其結構與已知的動物致癌物環氧苯乙烯(Styrene-7,8-oxide)相似，此外，根據先前研究顯示，暴露SFO會造成小鼠紅血球細胞中的微核(micronuclei)增加以及細胞的DNA鍊斷裂，而我們實驗室先前已證實SFO會在體外與DNA形成共價鍵結物，經分析尿液中鹼基共價鍵結物證明SFO會誘發小鼠形成該共價鍵結物，但動物體內組織的鹼基共價結物還有待研究。因此本論文的目的在於探討環氧黃樟素在動物體內組織產生DNA共價鍵結與劑量間的關係，此結果將有助了解環氧黃樟素在動物體內造成基因毒性的機制。

本研究利用腹腔注射CD-1品系之雌性小鼠進行持續四週的重覆暴露實驗，分成七組：控制組(olive oil)、黃樟素低高劑量組(150, 300 mg/kg)以及環氧黃樟素四個劑量組(30, 60, 90, 120 mg/kg)的環氧黃樟素劑量，接著取出器官組織進行DNA萃取，並使用液相層析搭配電噴灑離子化串聯式質譜儀進行分析。我們成功地在環氧黃樟素處理組小鼠的肝臟組織DNA與尿液中分析到N7γ-SFO-Gua，此共價鍵結物含量隨環氧黃樟素劑量增加而增加，但多數的鹼基共價鍵結物經尿液排出。這些結果暗示了環氧黃樟素形成共價鍵結物後，經去嘌呤化的機制使DNA產生缺鹼基位置(apurinic/apyrimidinic site, AP site)而導致環氧黃樟素具有致突變性，這也是國際上首度有研究顯示SFO在活體內會產生DNA共價鍵結物。

關鍵字：黃樟素、環氧黃樟素、DNA共價鍵結物、基因毒性、小鼠



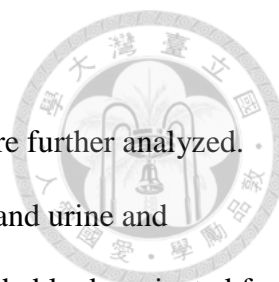
## Abstract

Safrole (1-allyl-3,4-methylenedioxybenzene), the main component of the sassafras oil, is commonly present in plants such as anise, cinnamon, basil, nutmeg, and pepper. People could be exposed to safrole in their daily life. Safrole-2',3'-oxide (SFO), an active metabolite and an electrophile of safrole, is suspected to be responsible for genotoxicity and mutagenicity in *Salmonella typhimurium* strains TA1535 and TA100. In a previous study, scientists tried to analyze SFO-induced DNA adducts by using  $^{32}\text{P}$ -postlabeling method. Nevertheless, they failed to analyze any SFO-induced DNA adducts in liver tissue of mice. Therefore, SFO was not considered as a genotoxic carcinogen. However, the structure of SFO is similar with that of styrene-7,8-oxide, an animal carcinogen, and recent studies have shown that SFO can induce cytotoxicity, DNA strand breaks, micronuclei formation both *in vitro* and *in vivo*. Recently, our lab verified that SFO could cause *in vivo* formation of N7 $\gamma$ -SFO-Gua, which might then be rapidly depurinated from the DNA backbone and excreted through urine. In the present study, we aimed to further investigate SFO-induced DNA adducts in animal tissue and in HepG2 cells. Analysis of SFO-induced DNA adducts not only confirms SFO genotoxicity, but also serves as risk-associated biomarkers for cancers. Therefore, the objective of this study was to determine the SFO-induced DNA adducts in HepG2 cell and tissues of mice-treated with SFO by using an solid-phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry method.

N7-(3-benzo[1,3]dioxol-5-yl-2-hydroxypropyl)guanine(N7 $\gamma$ -SFO-Gua),

N1-(3-benzo[1,3]dioxol-5-yl-2-hydroxypropyl)adenine(N1 $\gamma$ -SFO-dAdo) were first measured in

HepG2 cells treated with 250 and 375  $\mu\text{M}$  SFO. Female CD-1 mice were repeatedly treated with 150 and 300 mg/kg/day of safrole and 30, 60, 90, and 120 mg/kg/day of SFO through ip injection



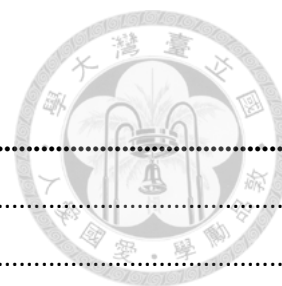
for continuous 28 days. N7 $\gamma$ -SFO-Gua in liver DNA and urine samples were further analyzed. Results show dose-dependent increases in N7 $\gamma$ -SFO-Gua contents in liver and urine and demonstrate that SFO indeed caused formation of DNA adducts, which probably depurinated from DNA backbone and suggested the genotoxicity of SFO in mice.

Key words: Safrole 2',3'-oxide / DNA adducts / DNA damage / Safrole /  
N7-(3-benzo[1,3]dioxol-5-yl-2-hydroxypropyl)guanine(N7 $\gamma$ -SFO-Gua)



# 目錄

口試委員會審定書 .....	i
誌謝 .....	ii
摘要 .....	iii
Abstract .....	iv
目錄 .....	vi
圖目錄 .....	viii
表目錄 .....	x
<b>第一章 前言 .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 黃樟素(Safrole)簡介 .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 物理化學特性 .....	1
1.1.3 黃樟素的代謝物 .....	2
1.1.4 環氧黃樟素以及前人動物實驗數據 .....	3
<b>1.2 去氧核糖核酸(DNA)與 DNA 共價鍵結物(DNA adducts)簡介.....</b>	<b>4</b>
1.2.1 DNA 共價鍵結物的修復與癌症的關係 .....	4
1.2.2 環氧黃樟素致癌機制的相關研究 .....	5
1.2.3 DNA 共價鍵結物的分析方法 .....	6
<b>1.3 同位素稀釋質譜法 .....</b>	<b>7</b>
<b>1.4 研究設計背景 .....</b>	<b>8</b>
<b>1.5 研究目的 .....</b>	<b>9</b>
<b>第二章 實驗材料與方法 .....</b>	<b>10</b>
<b>2.1 樣本來源 .....</b>	<b>10</b>
2.1.1 化學標準品 .....	10
2.1.2 實驗動物 .....	10
<b>2.2 實驗架構 .....</b>	<b>11</b>
<b>2.3 動物實驗處理 .....</b>	<b>14</b>



2.4	DNA 共價鍵結物實驗方法.....	15
2.4.1	組織與細胞樣本前處理.....	15
2.4.2	尿液樣本前處理.....	17
2.5	液相層析串聯式質譜儀分析方法.....	18
2.6	分析方法之驗證.....	18
2.6.1	DNA 基質校正曲線配製與結果.....	18
2.6.2	尿液基質校正曲線配製與結果.....	19
2.6.3	組織 DNA 基質效應、回收率、過程效率.....	19
2.6.4	同日及異日檢量線之再現性.....	22
2.7	鳥糞嘌呤定量.....	23
2.7.1	酸水解.....	23
2.7.2	高效能液相層析儀分析方法.....	23
第三章	結果.....	24
3.1	動物體外細胞實驗.....	24
3.2	動物實驗.....	24
第四章	討論.....	26
4.1	綜合結果討論.....	26
4.2	研究限制.....	28
4.3	結論.....	28
參考文獻	.....	29





## 圖目錄

圖 一、黃樟素化學結構式.....	35
圖 二、黃樟素的代謝途徑.....	36
圖 三、1'-羥基黃樟素代謝情形.....	37
圖 四、去氧核糖核酸的基本結構.....	38
圖 五、DNA 被破壞與基因突變及癌症關係.....	39
圖 六、 <sup>32</sup> P-後標籤法( <sup>32</sup> P-postlabeling).....	40
圖 七、SFO 的 DNA 共價鍵結物化學結構圖.....	41
圖 八、去離子水配製之檢量線.....	42
圖 九、小鼠肝臟組織 DNA 基質中配製之檢量線.....	43
圖 十、尿液檢量線結果.....	44
圖 十一、HepG2 肝癌細胞控制組.....	45
圖 十二、HepG2 肝癌細胞 250 μM 環氧黃樟素暴露組.....	46
圖 十三、HepG2 肝癌細胞 375 μM 環氧黃樟素暴露組.....	47
圖 十四、連續 28 天黃樟素與環氧黃樟素暴露後小鼠之平均體重變化情形.....	48
圖 十五、CD-1 小鼠肝臟 DNA 分析之控制組.....	49
圖 十六、CD-1 小鼠肝臟 DNA 分析之黃樟素 150 mg/kg/day 暴露組.....	50
圖 十七、CD-1 小鼠肝臟 DNA 分析之黃樟素 300 mg/kg/day 暴露組.....	51
圖 十八、CD-1 小鼠肝臟 DNA 分析之環氧黃樟素 30 mg/kg/day 暴露組.....	52
圖 十九、CD-1 小鼠肝臟 DNA 分析之環氧黃樟素 60 mg/kg/day 暴露組.....	53
圖 二十、CD-1 小鼠肝臟 DNA 分析之環氧黃樟素 90 mg/kg/day 暴露組.....	54
圖 二十一、CD-1 小鼠肝臟 DNA 分析之環氧黃樟素 120 mg/kg/day 暴露組.....	55
圖 二十二、CD-1 小鼠尿液分析之控制組.....	56
圖 二十三、CD-1 小鼠尿液分析之黃樟素 150 mg/kg/day 暴露組.....	57
圖 二十四、CD-1 小鼠尿液分析之黃樟素 300 mg/kg/day 暴露組.....	58
圖 二十五、CD-1 小鼠尿液分析之環氧黃樟素 30 mg/kg/day 暴露組.....	59




圖 二十六、CD-1 小鼠尿液分析之環氧黃樟素 60 mg/kg/day 暴露組.....	60
圖 二十七、CD-1 小鼠尿液分析之環氧黃樟素 90 mg/kg/day 暴露組.....	61
圖 二十八、CD-1 小鼠尿液分析之環氧黃樟素 120 mg/kg/day 暴露組.....	62
圖 二十九、暴露環氧黃樟素後小鼠肝臟組織 N7 $\gamma$ -SFO-Gua DNA 共價鍵結物濃度 .....	63
圖 三十、尿液 N7 $\gamma$ -SFO-Gua 分析結果長條圖 .....	64



## 表目錄

表 一、DNA 鹼基上不同親核位置之相對反應性.....	65
表 二、DNA 共價鍵結物定量方法之比較.....	66
表 三、暴露不同劑量環氧黃樟素與相關化合物之小鼠動物實驗設計.....	67
表 四、CD-1 小鼠暴露黃樟素後肝、腎、肺臟重量和其相對重量.....	68
表 五、CD-1 小鼠暴露環氧黃樟素後肝、腎、肺臟重量和其相對重量.....	69
表 六、暴露不同劑量的環氧黃樟素與黃樟素小鼠肝臟組織之液相層析搭配電噴灑離子化串聯式質譜儀分析結果.....	70
表 七、暴露不同劑量的環氧黃樟素與黃樟素小鼠尿液之液相層析搭配電噴灑離子化串聯式質譜儀分析結果.....	71

# 第一章 前言



## 1.1 黃樟素(Safrole)簡介

黃樟素(1,2-methylenedioxy-4-allyl-benzene)，分子式( $C_{10}H_{10}O_2$ )、分子量(162.2)屬於苯基丙烯的一種，為存在於自然界中的物質，常見於許多辛香料植物中。其結構如圖一所示。

同義字：1-allyl-3,4-methylene dioxy benzene;

5-allyl-1,3-benzodioxole;4-allyl-1,2-methylene dioxy benzene

(Scientific Committee on Food of the European Union)

### 1.1.1 物理化學特性

黃樟素是芳香族酚醚1,3-胡椒醛苯(aromatic phenol ether 1,3-benzodioxole)的衍生物，在室溫下呈現無色或是淺黃色的油狀物質形態並具有檫樹(sassafras)的氣味，幾乎不溶於水和甘油、微溶於丙二醇(propylene glycol)、溶於酒精或是氣仿(chloroform)與醚(ether)的混合物(*Carcinogens, Twelfth Edition* 2011)。

### 1.1.2 暴露途徑以及健康危害

黃樟素除了是黃樟油的主要成分(70-80%)外，也存在於許多香料植物中，如：荳蔻(basil)、大茴香(anise)、肉桂(nutmeg)、黑與白胡椒(black/white pepper)等。除被做為食品添加劑加入食物中外，也可以存在於化妝品與可樂飲料內。(Archer and Jones 2002, Liu, Chung et al. 2004, Munerato, Sinigaglia et al. 2005, Ueng, Hsieh et al. 2005) (Council of Europe, 1997, Datasheet on safrole)。

此外，嚼食檳榔也會有黃樟素的暴露，台灣的檳榔不同於東南亞的其他地區，是由檳榔子(areca nut)、熟石灰(slaked lime)以及荖花(*Piper betle* inflorescence)或葉子取代菸草(tobacco) (Chen, Chi et al. 1999)。其中，每公克的荖花就含有 15 毫克的黃樟素，嚼食過程會導致高濃度的黃樟素暴露( $420\mu\text{M}$ ) (Chung, Chen et al. 2008)。因此，除了辛香料的攝取外，嚼食檳榔也是黃樟素重要的暴露途徑之一。歐盟食品科學委員會(The Scientific Committee for Food of the European Union)提出以一個 60kg 的人而言平均每天會攝取 0.3 mg 的黃樟素，另外，聯合國糧農組織/世界衛生組織聯合食品添加物專家委員會(Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)則估計一個 60kg 的人每天的最大攝取量為  $879\mu\text{g}$  (Martati,

Boersma et al. 2011)，根據致癌力資料庫(the carcinogenic potency database, CPDB)的資料，黃樟素在啮齒類動物的標的器官(target organ)為肝臟，大鼠與小鼠的半數致癌劑量(median tumor dose, TD<sub>50</sub>)為 441 與 51.3 mg/kg/day，世界衛生組織國際化學品安全規劃(international programme on chemical safety, IPCS)指出，黃樟素對於大鼠與小鼠的口服(oral)半致死劑量(median lethal dose, LD<sub>50</sub>)分別為 1950 與 2350 mg/kg。

當攝入高劑量黃樟素時，代謝/排泄途徑可能受到傷害，持續的攝取或暴露高劑量的黃樟素可能會累積在身體組織中(Benedetti, Malnoe et al. 1977)。前人之動物實驗研究，Abbott 等人在大鼠的飲食中添加 390 或 1170 ppm(0.039 與 0.117%)的黃樟素，持續兩年，結果顯示黃樟素會導致肝腫瘤的形成(Abbott, Packman et al. 1961) (Long, Nelson et al. 1963)。上述結果顯示，黃樟素具有啮齒類動物的致癌性，且會在雄性幼鼠的肝臟與肺臟中產生腫瘤，因此，黃樟素在 1976 年被國際癌症研究機構(International Agency for Research on Cancer, IARC)分類為可能的人類致癌物質(group 2B carcinogen) (IARC 1976)。

Daimon 等人施予 F344 大鼠五種重覆劑量，分別為 62.5、125、125、250 mg/kg 的黃樟素，結果證實隨著黃樟素劑量增加，大鼠肝細胞內可發現黃樟素 DNA 共價鍵結物隨之上升，姊妹染色體交換(sister chromatid exchanges)頻率增加，染色體亦可觀察到發生畸變，上述現象皆支持黃樟素具有基因毒性(Daimon, Sawada et al. 1998)。

### 1.1.3 黃樟素的代謝物

如圖二所示(Martati, Boersma et al. 2011)，黃樟素被攝入人體後，會在體內被代謝成四種主要的代謝物，1'-羥基黃樟素(1'-hydroxysafrole)(Borchert, Wislocki et al. 1973, Stillwell, Carman et al. 1974)、1,2-二羥基-4-烯丙基苯(1,2-dihydroxy-4-allylbenzene 或 Hydroxychavicol) (Benedetti, Malnoe et al. 1977)、3'-羥基黃樟素(3'-hydroxysafrole) (Benedetti, Malnoe et al. 1977)、2',3'-黃樟素環氧化物(3,4-(Methylenedioxy)-1-(2',3'-epoxypropyl)-benzene or safrole-2',3'-oxide) (Wislocki, Borchert et al. 1976)。而在體內，黃樟素的中間體(intermediates)或代謝物(metabolites)的致癌性(carcinogenicity)更勝於黃樟素本身，因此，瞭解其代謝過程產生之物質相當重要(Nakagawa, Suzuki et al. 2009)。

1'-羥基黃樟素：

如圖三(Jeurissen, Bogaards et al. 2004)，1'-羥基黃樟素為黃樟素在肝臟細胞色素 P450 (cytochromes P450)的催化下形成可能的致癌物質，1'-羥基黃樟素會在細胞質經硫酸基轉移酶(sulfotransferases)產生硫化作用(sulfation)形成最終的致癌代謝物質 1'-磺酸基黃樟素(1'-sulfooxysafrole)，而其親電子的性質可與細胞大分子形成共價鍵結之共價鍵結物(covalent adducts) (Borchert, Miller et al. 1973); (Wislocki, Borchert et al. 1976); (Wislocki, Miller et al. 1977); (Jeurissen, Bogaards et al. 2004);(Ioannides, Delaforge et al. 1981); (Chung, Chen et al. 2008)。因此，1'-羥基黃樟素一直以來被認為是最可能致癌的黃樟素代謝物(Borchert, Miller et al. 1973)。

1,2-二羥基-4-烯丙基苯：

黃樟素的亞甲二氧基團(methylenedioxy group)經氧化脫烷基作用(oxidative dealkylation)形成 1,2-二羥基-4-烯丙基苯作為大鼠、豚鼠、人類的主要的代謝物並經共軛鍵結(conjugation)從尿液(口服後總劑量的 70%以上)排出體外(Stillwell, Carman et al. 1974); (Benedetti, Malnoe et al. 1977); (Chang, Ko et al. 2002); (Klungsoyr and Scheline 1982)。

3'-羥基黃樟素(3'-hydroxysafrole)：

1'-羥基黃樟素主要會經由葡萄糖苷酸酶(glucuronidase)作用，異構化(isomerization)形成 3'-羥基黃樟素(3'-hydroxysafrole) (Borchert, Wislocki et al. 1973) (Stillwell, Carman et al. 1974)，或是經另一較小途徑，由 3'-羥基化作用(3'-hydroxylation)產生 (Boberg, Miller et al. 1986)。前人研究指出，可在施予黃樟素之大鼠尿液偵測到少量的 3'-羥基黃樟素，但無法在人類偵測到(Benedetti, Malnoe et al. 1977)

2',3'-黃樟素環氧化物：

2',3'-黃樟素環氧化物為黃樟素的一個親電子代謝物質，黃樟素的丙烯基側鏈(allyl side chain)上的雙鍵經環氧化作用(epoxidation)後得到 2',3'-黃樟素環氧化物(2',3'-safrole epoxide)，2',3'-黃樟素環氧化物易被微粒體環氧化水解酶(microsomal epoxide hydrolase)水解成 2',3'-二羥基黃樟素(2',3'-dihydroxysafrole) (Ioannides, Delaforge et al. 1981) (Klungsoyr and Scheline 1983)。

#### 1.1.4 環氧黃樟素以及前人動物實驗數據

前人體外細菌試驗指出，2',3'-黃樟素環氧化物在沙門氏菌(*Salmonella typhimurium*)TA1535和TA100的安姆氏試驗(Ames Test)中發現其具有中度致突

變性(moderate mutagenicity) (Swanson, Chambliss et al. 1979)。根據前人研究使用<sup>32</sup>P-後標籤法(<sup>32</sup>P-postlabeling)分析，發現2',3'-黃樟素環氧化物能在與小牛胸腺DNA(calf thymus DNA)在體外形成至少八種DNA共價鍵結物，但是給予小鼠2',3'-黃樟素環氧化物(600 μmol/kg)後，取其標的器官肝臟分析，卻無法偵測到與2',3'-黃樟素環氧化物相關之DNA共價鍵結物(Qato and Guenther 1995)。而當重覆腹腔注射給予2',3'-黃樟素環氧化物(60 mg/kg)後發現，其會造成網狀紅血球微核(micronuclei)的增加與DNA的斷裂(Chiang, Lee et al. 2011)，因此作者認為環氧黃樟素具有細胞毒性與基因毒性。

## 1.2 去氧核糖核酸(DNA)與 DNA 共價鍵結物(DNA adducts)簡介

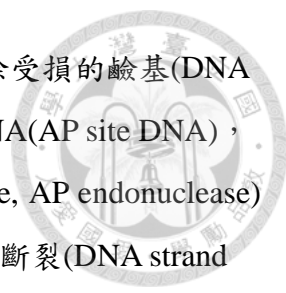
核酸是以核苷酸(nucleotides)為單元體所鍵結而成的大分子，而核苷酸的組成為去氧核糖、磷酸、以及含氮鹼基。去氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)的四種含氮鹼基分別為腺嘌呤(adenine, A)、鳥糞嘌呤(guanine, G)、胞嘧啶(cytosine, C)、與胸腺嘧啶(thymine, T)，如圖 四所示。其中 A 與 T 可形成兩個氫鍵，而 G 與 C 可形成三個氫鍵，因此，A 與 T、G 與 C 易因氫鍵互相吸引，並且由於核苷酸本身具有許多氫、氧、氮原子，所以在許多地方形成氫鍵，使得 DNA 彼此形成立體的雙股螺旋結構，使能傳遞遺傳訊息。

DNA 易受親電子試劑(electrophilic reagent)影響，使得含氮鹼基上的親核性位置(nucleophilic sites)發生改變，在許多親電子試劑的作用下，某些官能基取代了正常含氮鹼基上的結構，與其產生共價鍵結，形成具突變性的修飾鹼基，這些被修飾過的鹼基都可稱為 DNA 共價鍵結物 (DNA adduct)，它們會使 DNA 結構發生改變而阻礙正常的鹼基配對關係，即 AT、GC 配對(Chen and Hong 2001)。

### 1.2.1 DNA 共價鍵結物的修復與癌症的關係

過去研究證實，DNA 損傷的部位(如修飾過的鹼基)繼續複製或是經由錯誤的修復就會導致突變的發生，當 DNA 持續的改變，造成原致癌基因(proto-oncogenes)的活化與腫瘤抑制基因(tumour-suppressor genes)的去活性，染色體不穩定的情形就會導致惡性腫瘤的發生(Hemminki 1993)。

在 DNA 共價鍵結物形成的同時，體內亦具備修復機制，DNA 共價鍵結物的兩種單股 DNA 修復機制(錯誤! 找不到參照來源。): (1)鹼基切除修復(base excision repair): 涉及 DNA 螺旋結構扭曲的損傷(可能阻礙轉錄與正常複製)時的



修復機制，修復過程為 DNA 糖基酶(DNA glycosylase)作用移除受損的鹼基(DNA 共價鍵結物上與化學物質鍵結的鹼基)，移除後形成無嘌呤 DNA(AP site DNA)，接著脫嘌呤/嘧啶內切核酸酶(apurinic/apyrimidinic endonuclease, AP endonuclease)再由 3'端將去鹼基位置去氧核糖之磷酸骨架切除形成 DNA 鏈斷裂(DNA strand breakage)，最後由 DNA 聚合酶(DNA polymerase) 填入正確的鹼基與 DNA 連接酶(DNA ligase)進行修補或 DNA 聚合酶直接由 5'端進行複製直接取代去鹼基位置的 DNA 之修復途徑(Boiteux and Guillet 2004) (Hoeijmakers 2001);(2)核苷酸切除修復(nucleotide excision repair)：針對鹼基上化學結構的改變時的修復機制，用以修復胸腺嘧啶二聚體(thymine dimer)，首先，解螺旋酶(helicase)分離 DNA 的兩股，接著由內切酶(endonuclease)從 3'端將含去氧核糖之磷酸骨架(包含二聚體)切除，最後同樣以 DNA 聚合酶(DNA polymerase)與 DNA 連接酶(DNA ligase)進行修補(Hoeijmakers 2001)。經由以上修復途徑後，這些被切除下來的 DNA 共價鍵結物會經由尿液排出體外(Singh and Farmer 2006)。

不論 DNA 共價鍵結物是直接經由基因複製造成突變，亦或是修復過程中導致基因突變，皆是誘導癌症形成的因素(Singh and Farmer 2006)。而這些 DNA 共價鍵結物的濃度與化學因子的暴露、飲食、生理狀況...有關，當其濃度越高時，罹患癌症的風險也相對提高，因此，DNA 共價鍵結物的生成量被認為是生物有效劑量之指標(biologically-effective doses) (Chen and Hong 2001)，分析化學物 DNA 共價鍵結物形成的情形，有助於釐清法定遺傳毒性測試(statutory genotoxicity assays)與動物的生物毒性測試(animal bioassays)的不尋常或令人費解處(Phillips, Farmer et al. 2000)。

### 1.2.2 環氧黃樟素致癌機制的相關研究


常見的工業原料苯乙烯(styrene)於代謝過程中所形成的環氧代謝產物，為已知可能人類致癌物質環氧苯乙烯(Styrene-7,8-oxide)，會經由麩胺基硫轉移酵素(glutathione S-transferase, GSTs)和環氧化合物水解酶去毒化(Luo, Qato et al. 1992) (Krause, Sharer et al. 1997) (Faller, Csanady et al. 2001) (Csanady, Kessler et al. 2003) (Wu, Chiang et al. 2011)，雖然有此去毒途徑，卻仍能在體內生成 DNA 共價鍵結物(表一)，並與 2'-去氧腺嘌呤反應形成 N1-、N<sup>6</sup>-、N3-位置取代之腺嘌呤 DNA 共價鍵結物、與 2'-去氧鳥糞嘌呤反應形成 N7-和 N2-位置取代之鳥糞



呤 DNA 共價鍵結物、與 2'-去氧胞嘧啶 N3-、N4-位置取代之胞嘧啶 DNA 共價鍵結物以及與胸腺嘧啶反應形成 N3-位置取代之胸腺嘧啶共價鍵結物。(Pongracz, Kaur et al. 1989);(Tretyakova, Lin et al. 1997); (Koskinen and Plna 2000);(Koskinen, Vodicka et al. 2000); (Munter, Cottrell et al. 2002); (Boysen, Pachkowski et al. 2009) , 由表可知 N3-、N1-<sup>6</sup>-取代之腺嘌呤共價鍵結物與 N7-取代之鳥糞嘌呤共價鍵結物是環氧代謝產物與雙股螺旋 DNA 反應生成最多之 DNA 共價鍵結物，而環氧黃樟素的結構與環氧苯乙烯相似，因此，Qato 等人將環氧黃樟素分別與小牛胸腺 DNA 和 2'-去氧鳥糞嘌呤行體外反應，搭配 <sup>32</sup>P-後標籤法分析發現有至少九種 DNA 共價鍵結物的產生，同時進行動物實驗，卻無法在暴露單一劑量環氧黃樟素(600 μmol/kg)之老鼠體內偵測到 DNA 共價鍵結物(Qato and Guentner 1995) , 而作者推論主要原因為環氧黃樟素能夠經由麩胺基硫轉移酵素(glutathione S-transferase)和環氧化合物水解酶(epoxide hydrolases)去毒化過程中被代謝(Luo, Qato et al. 1992) (Luo and Guentner 1994) (Luo and Guentner 1995)。我們實驗室的沈瑛卿學姐使小鼠暴露單一劑量之環氧黃樟素(30 mg/kg body wt)後，分別收集 24、48、72 小時的尿液，發現可以在尿液中偵測到環氧黃樟素在 N7-位置取代之鳥糞嘌呤 DNA 共價鍵結物 (N7-(3-benzo[1,3]dioxol-5-yl-2-hydroxypropyl)guanine, N7γ-SFO-Gua) , 而其半衰期約 60 小時，證實環氧黃樟素能夠在動物體內生成 DNA 共價鍵結物(Shen, Chiang et al. 2012) , 與前人研究證實在環氧黃樟素處理過的小鼠的紅血球細胞中的微核和 DNA 鏈斷裂的頻率增加的結果是一致的，環氧黃樟素對於小鼠具有基因毒性(Chiang, Lee et al. 2011) , 然而，為了探討環氧黃樟素是否也是黃樟素的致癌機轉之一，仍需作進一步研究。

### 1.2.3 DNA 共價鍵結物的分析方法

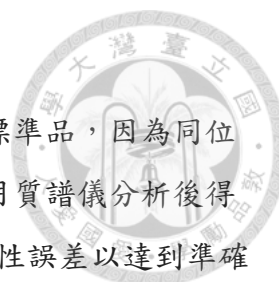
目前有數種用以定量 DNA 共價鍵結物的方法，分別是 <sup>32</sup>P-後標籤法 (<sup>32</sup>P-post-labelling)、螢光與電化學檢測法(fluorescence and electrochemical detection)、免疫分析法(immunological methods)、質譜法(mass spectrometry) , 以上方法之優劣如表二 (Brown 2012)。<sup>32</sup>P-後標籤法的發展始於 1980 年代初期，此方法利用 T<sub>4</sub> 聚核苷酸激酶(T<sub>4</sub> polynucleotide kinase)將[γ-<sup>32</sup>P]ATP 上的 <sup>32</sup>P 標記之磷酸基團(<sup>32</sup>P-containing phosphate group)轉移至帶有共價鍵結物的去氧核糖



(2-deoxyribose)上的 5'-OH 端(圖 六)(Phillips and Arlt 2007)，雖然此方法具有高靈敏度以及較小的樣本量(1-10  $\mu\text{g}$  DNA)，卻不適合用以分析核苷鍵不穩定之 DNA 共價鍵結物，也不具有高專一性(Himmelstein, Boogaard et al. 2009) (Koc and Swenberg 2002) (Swenberg, Fryar-Tita et al. 2008)。螢光與電化學檢測法則是根據部分共價鍵結物固有的特性，特別是螢光或氧化還原的性質，可分別使用螢光光譜儀與電化學偵測儀器搭配高效能液相層析儀(high performance liquid chromatography, HPLC)或電泳(electrophoresis, CE)去分析，高專一性但缺乏靈敏度，且只能夠分析具有螢光、電化學活性特性的共價鍵結物(Brown 2012)。免疫分析法分成數種，主要原理為利用抗原與抗體結合之特異性，在附有抗原的免疫分析盤(well)加入含有抗體的分析物，若是分析物存在共價鍵結物，則抗體與共價鍵結物結合；若無，則抗體與分析盤上抗原結合，經由沖洗後，含有共價鍵結物與抗原結合物會被移去，分析盤經由酵素、受質(substrate)處理後進行定量分析，具有高專一性但缺乏靈敏度(Santella 1999) (Brown 2012)。質譜法的基本原理為使有機或無機的化合物產生離子，除了可提供化合物構造外，也能利用分子產生離子的質荷比(mass-to-charge ratio,  $m/z$ )來區分不同的化學物質，達到定性的功能，以及以波峰面積(peak area)達到定量的功能，因為質譜法能同時定性與定量的優點，因此常被應用在 DNA 共價鍵結物的分析(Ho, Lam et al. 2003)。

### 1.3 同位素稀釋質譜法

同位素稀釋法的起源目前尚不明確，但於西元 1933 年有文獻指出其用於動物學，用以計算島嶼中稀有鳥類的數量，而早在西元 1913 年 Hevesy 與 Paneth 就利用放射性鉛同位素以分析硫化鉛在水中之溶解度，此同位素應用方式如今被稱為同位素稀釋法。而若干年後以同位素搭配質譜儀進行分析，即目前已知的同位素稀釋質譜法(isotope dilution mass spectrometry, IDMS) (Vogl and Pritzkow 2010)。



### 1.3.1 同位素稀釋法搭配液相層析串聯式質譜儀原理

在欲分析的樣本中加入與分析物組成相同之同位素標定內標準品，因為同位素標定內標準品具有與分析物相同的物理、化學性質，故利用質譜儀分析後得到分析物與同位素內標的比值(ratio)，可達到消除儀器之系統性誤差以達到準確定量的效果(Vogl and Pritzkow 2010)，加上質譜儀利用離子的質荷比來區分化合物，使同位素稀釋法搭配液相層析串聯式質譜儀能同時具有準確定性與定量的優點，因此取代<sup>32</sup>P-後標籤法成為分析 DNA 共價鍵結物的主要分析方法(Koc and Swenberg 2002)。

## 1.4 研究設計背景

本研究延續沈璫卿學姐在 2012 年的學術論文(Shen, Chiang et al. 2012)，利用雄性小鼠進行單一劑量環氧黃樟素(30 mg/kg body wt)暴露的實驗，分別收集暴露後第一、二、三天的尿液，經液相層析質譜儀分析後，證實環氧黃樟素能夠在動物體內生成 DNA 共價鍵結物，而本研究的目的為進一步探討環氧黃樟素之基因毒性，嘗試進行為期 28 天的環氧黃樟素重覆暴露之實驗，並取出肝臟之組織，進行 DNA 萃取，並搭配同位素稀釋質譜法進行分析。動物小鼠的品系根據致癌力資料庫(the carcinogenic potency database, CPDB)的黃樟素動物實驗資料，選擇對於黃樟素較為敏感之 CD-1 品系雌性小鼠並針對黃樟素的標的器官肝臟進行分析。DX 等人將大鼠暴露單一劑量 300 mg/kg/day 的黃樟素(Tan, Poeggeler et al. 1993)、Daimon 等人將大鼠分別暴露單一劑量 1000 mg/kg/day 以及重覆劑量 500 mg/kg/day 的黃樟素(每天一次，持續五天)(Daimon, Sawada et al. 1997)，以上兩篇研究皆以<sup>32</sup>P-後標籤法進行肝臟組織分析，並成功分析到黃樟素暴露後形成之 DNA 共價鍵結物；Borchert 等人則將大鼠暴露單一劑量 300 mg/kg/day 的黃樟素，分析尿液中共軛形式(conjugated form)的黃樟素代謝物(Borchert, Wislocki et al. 1973)；Friedman 等人將小鼠暴露單一劑量 640 mg/kg/day 的黃樟素，進行小鼠睪丸 DNA 合成抑制的實驗(Friedman and Staub 1976)；Chung 等人將小鼠暴露單一劑量 250 mg/kg/day 的黃樟素，以液相層析/電噴灑離子化質譜儀(liquid chromatography/electrospray ion trap mass spectrometry, LC/ESI-ITMS<sup>n</sup>)分析肝臟組織 DNA 的 DNA 共價鍵結物(Chung, Chen et al. 2008)；Delaforge M 等人與 Stillwell 等人分別將大鼠暴露單一劑量 200 與 125 mg/kg/day 的黃樟素後，皆能夠在尿液中分析到環氧黃樟素(Stillwell, Carman et

al. 1974, Delaforge, Janiaud et al. 1980)，綜合上述前人研究，我們選擇以 150 與 300 mg/kg/day 做為動物實驗黃樟素的暴露劑量。

### 1.5 研究目的

黃樟素常見於自然界中，許多香料植物、食品添加，甚至在化妝品、可樂中也能發現其成份，而對台灣民眾特別有意義的是台灣檳榔中的萜花成份，也具有高濃度的黃樟素，因此嚼食檳榔的過程中會導致高濃度的黃樟素暴露。在黃樟素的四種主要的代謝物中，1'-羥基黃樟素一直被認為是最可能致癌的黃樟素代謝物，環氧黃樟素在過去則一直不被認為具有基因毒性。正常情況下，我們主要暴露的化合物是黃樟素而非環氧黃樟素，但根據前人研究指出，環氧黃樟素能使人類臍靜脈上皮細胞(umbilical vein endothelial cell)與大鼠骨髓間葉幹細胞(bone-marrow mesenchymal stem cells)轉變成神經樣細胞(neuron-like cells) (Su, Zhao et al. 2011) (Zhao, Xin et al. 2012)，未來若是發展出環氧黃樟素治療神經系統疾病的藥物，就有機會直接暴露到高濃度的環氧黃樟素，也因此環氧黃樟素在動物的基因毒性，將會是重要的一項議題。而在我們實驗室沈璫卿學姐先前的研究中，已觀察到環氧黃樟素能在動物體內產生 N7-取代之鳥糞嘌呤共價鍵結物並在尿液中排出的情形，因此，我們欲進一步探討環氧黃樟素其對動物體外、體內產生之基因毒性。根據前人研究指出 N3-、N1-與 N<sup>6</sup>-取代之腺嘌呤共價鍵結物與 N7-取代之鳥糞嘌呤共價鍵結物是環氧代謝產物與雙股螺旋 DNA 反應生成最多之 DNA 共價鍵結物，而由於 N1-與 N<sup>6</sup>-腺嘌呤 DNA 共價鍵結物會導致鹼基轉換(transition) (Latham, Zhou et al. 1993) (Sisk, Pluta et al. 1994) (Recio and Meyer 1995) (Bastlova and Podlutsky 1996)，其致突變性更甚於其他位置取代之共價鍵結物。其中 N7-取代之鳥糞嘌呤共價鍵結物是所有環氧黃樟素與雙股螺旋 DNA 反應形成的共價鍵結物中數量最多的一種共價鍵結物，因此，在分析對象的選擇上，我們同時分析 N1-<sup>6</sup>-取代腺嘌呤與 N7-取代之鳥糞嘌呤共價鍵結物，化學結構圖如圖 七。

## 第二章 實驗材料與方法



### 2.1 樣本來源

#### 2.1.1 化學標準品

N1-取代之腺嘌呤共價鍵結物

(N1-(3-benzo[1,3]dioxol-5-yl-2-hydroxypropyl)adenine, N1 $\gamma$ -SFO-dAdo)、N<sup>6</sup>-取代之腺嘌呤共價鍵結物(N<sup>6</sup>-(3-benzo[1,3]dioxol-5-yl-2-hydroxypropyl) adenine,

N<sup>6</sup> $\gamma$ -SFO-dAdo)與 N7-取代之鳥糞嘌呤共價鍵結物

(N7-(3-benzo[1,3]dioxol-5-yl-2-hydroxypropyl)guanine, N7 $\gamma$ -SFO-Gua)以及同位素內標準品，氮 15 標記 N1-取代之腺嘌呤共價鍵結物([<sup>15</sup>N<sub>5</sub>]- N1 $\gamma$ -SFO-dAdo)、氮 15 標記 N<sup>6</sup>-取代之腺嘌呤共價鍵結物([<sup>15</sup>N<sub>5</sub>]- N<sup>6</sup> $\gamma$ -SFO-dAdo)、氮 15 標記 N7-取代之鳥糞嘌呤共價鍵結物([<sup>15</sup>N<sub>5</sub>]-N7 $\gamma$ -SFO-Gua)由本實驗室製備(Shen, Chiang et al. 2012, Shen, Chiang et al. 2012)。黃樟素(safrole)標準品購買自美國

Sigma-Aldrich 公司。環氧黃樟素(safrole 2',3'-oxide, SFO)由本實驗室製備(Shen, Chiang et al. 2012)。人類肝癌母細胞株(human hepatocellular liver carcinoma, HepG2)購自台灣生物資源保存及研究中心。

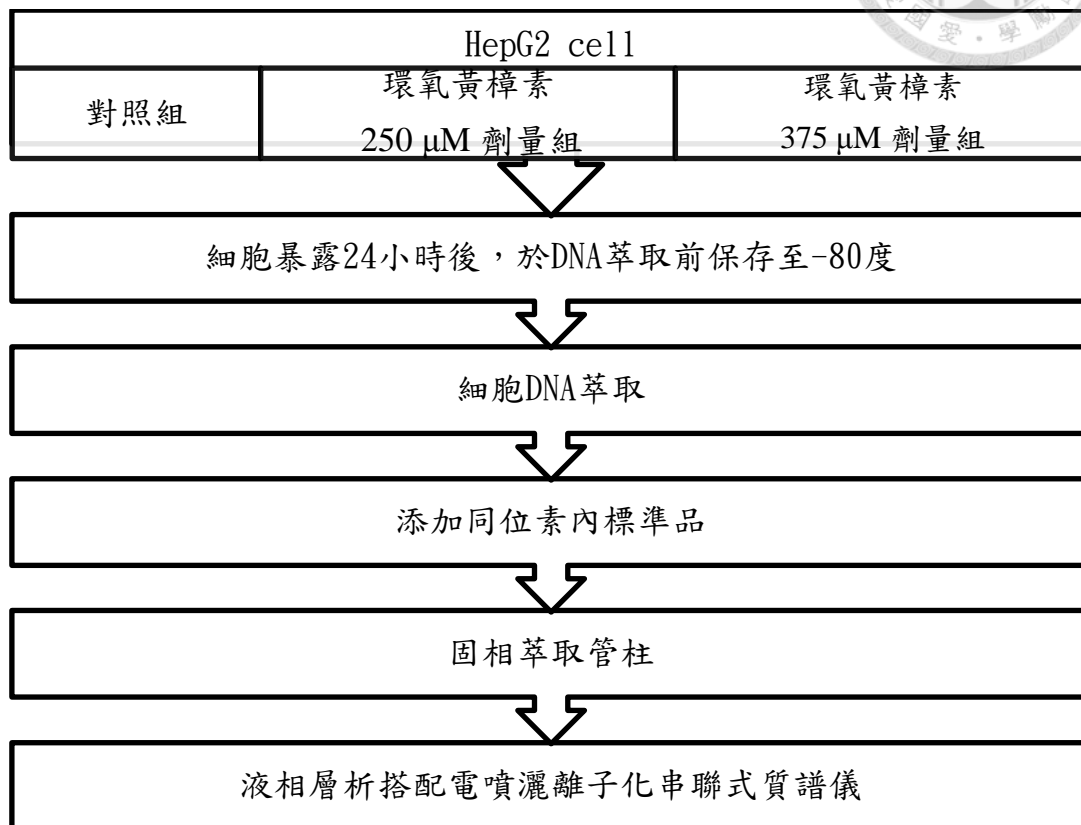
#### 2.1.2 實驗動物

動物實驗過程皆遵守實驗動物規範，實驗動物購買自認證實驗室-樂斯科生物科技公司所生產之 CD-1(ICR)品種遠交系健康無特定疾病之三週大雌性小鼠，平均重量 18 公克，所有小鼠皆以相同條件飼養(溫度 25°C, 12 小時光照與 12 小時黑暗環境)，並提供每隻小鼠相同之食物與水，再進行實驗前先於動物房飼養六至八天，待其適應後，再進行後續動物實驗，暴露 28 天後進行 24 小時之尿液收集，並以二氧化碳方式犧牲。

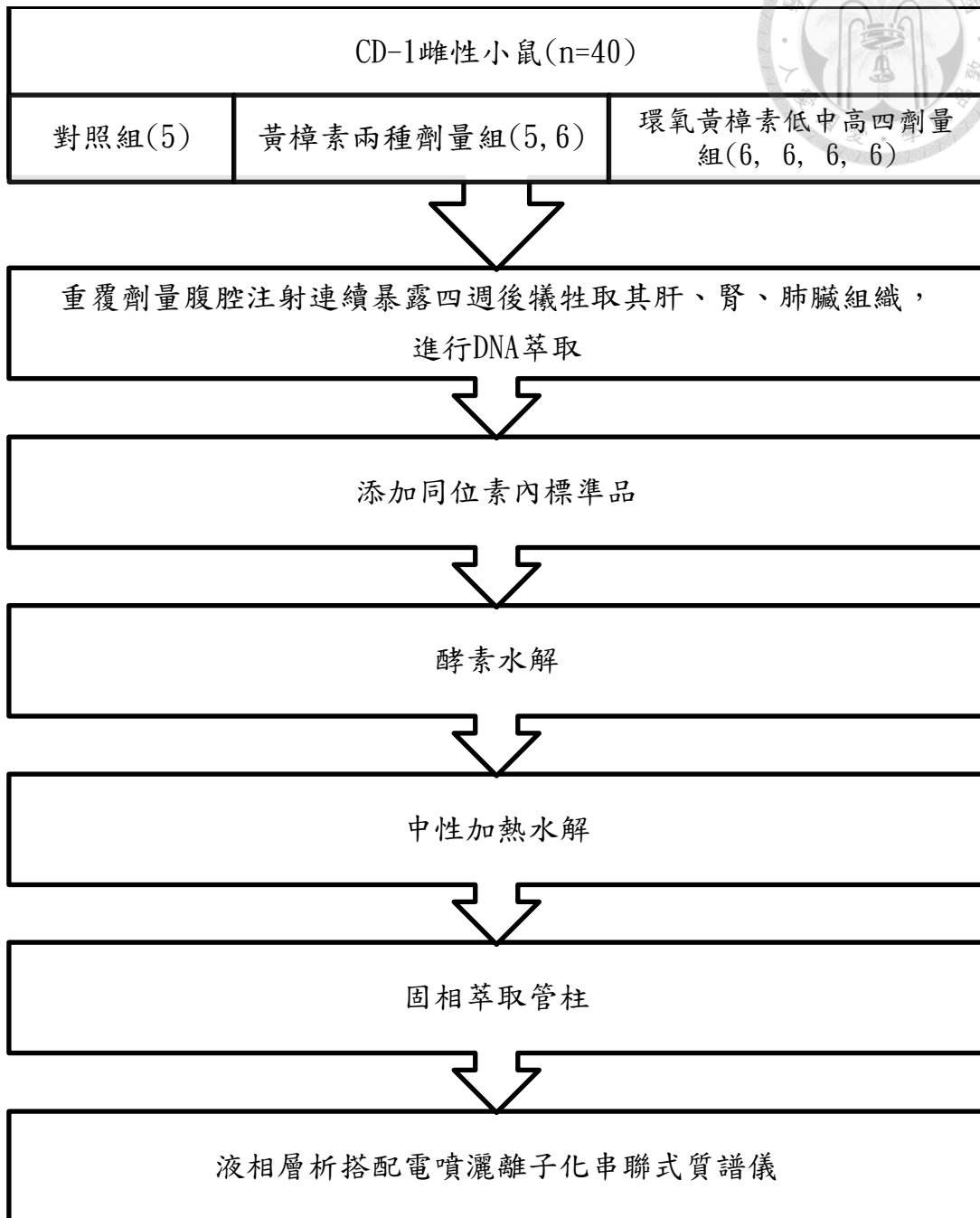


## 2.2 實驗架構

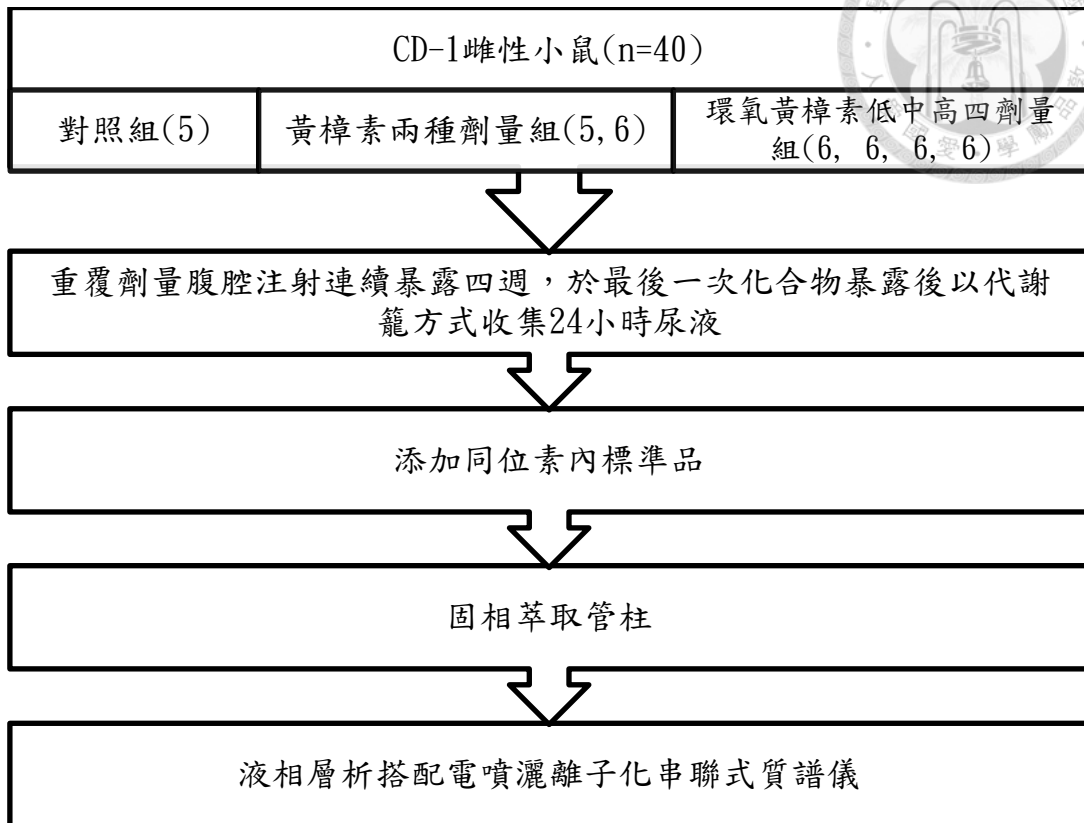
### 細胞 DNA 前處理方法



## 組織 DNA 前處理方法



## 尿液前處理方法





### 2.3 動物實驗處理

本研究將實驗總數 40 隻小鼠分為七組，控制組(5 隻)、黃樟素低劑量組(5 隻)、黃樟素高劑量組(6 隻)以及環氧黃樟素之最低劑量組(6 隻)、低劑量組(6 隻)、中劑量組(6 隻)、高劑量組(6 隻)，進行暴露前，會先將黃樟素或環氧黃樟素溶解在橄欖油中形成混合溶液再進行腹腔注射，並依照小鼠的體重調整至相同暴露劑量，控制組僅於腹腔注射橄欖油，黃樟素低劑量組於腹腔注射 150 mg/kg、高劑量組於腹腔注射 300 mg/kg 黃樟素混和溶液，而環氧黃樟素最低劑量組於腹腔注射 30 mg/kg、低劑量組於腹腔注射 60 mg/kg、中劑量組於腹腔注射 90 mg/kg、高劑量組於腹腔注射 120 mg/kg 之環氧黃樟素混和溶液，以上數據為重覆暴露之劑量，暴露頻率為每天暴露一次，為期 28 天，於第 28 天最後一次暴露後立即進行 24 小時的代謝籠尿液收集，並於尿液收集後進行犧牲，每隻小鼠皆以二氧化碳方式犧牲並收集其肝、腎、肺臟組織，取下組織後皆以生理食鹽水沖洗並以液態氮迅速冷凍後，於 DNA 萃取前保存在-80°C 冰箱。



## 2.4 DNA 共價鍵結物實驗方法

### 2.4.1 組織與細胞樣本前處理

#### (1)組織研磨(細胞樣本省略此步驟)

1. 將組織由-80°C 冰箱中取出，並將組織置於碎冰中
2. 以微量天秤將組織秤重(300-400 公克)之樣本
3. 準備研鉢、杵、刮勺
4. 取出冰桶內樣本置於研鉢中
5. 將樣本研磨成粉狀，研磨過程中需不斷補充液態氮至鉢內，以避免組織因回溫變質，研磨成粉狀後裝入 50 mL 離心管中，加入預冷之 5 mL 磷酸鹽緩衝液，放入離心機以轉速 3200 rpm，4°C，15 分鐘進行離心。
6. 將組織取出後，將上層液倒掉，等待後續之 DNA 萃取

#### (2)DNA 萃取

本研究之 DNA 萃取步驟參考 William M. Strauss(Strauss 2001)所提供之方法，方法步驟如下：

1. 將離心管倒去上層之組織敲散後加入 5 mL 1x lysis buffer、50  $\mu$ L BHT 溶液 (butylhydroxytoluene)
2. 加入 125  $\mu$ L proteinase K
3. 放入 37 °C 水浴中搖晃，並放置一晚
4. 將離心管由水浴中取出，加入等體積(5 mL)的酚：氯仿：異戊醇(25:24:1)，上下搖晃 3-5 分鐘
5. 將離心管放入離心機中，以轉速 3200 rpm，4°C，10 分鐘進行離心
6. 將離心管取出，拿到抽風櫃中將上層液取出至另一新離心管中
7. 離心管加入等體積(5 mL)的酚：氯仿：異戊醇(25:24:1)，上下搖晃 3-5 分鐘
8. 將離心管放入離心機中，以轉速 3200 rpm，4°C，10 分鐘進行離心
9. 將離心管取出，拿到抽風櫃中將上層液取出至另一新離心管中
10. 離心管加入等體積的氯仿，震盪約三分鐘，以轉速 3200 rpm，4°C，10 分鐘離心
11. 將上清液抽取置於新的離心管中
12. 加入 0.1 倍體積 3 M 醋酸鈉(pH 5.5)，和 2 倍體積 95% 冰乙醇，溫和的上下



- 搖晃，使 DNA 凝集並沉澱
13. 留下白色的 DNA 沉澱物，以 70% 冰乙醇清洗 DNA
  14. 將 DNA 沉澱物均勻溶在 3 mL 10 mM Tris-HCl (pH 7.4)(加 1/1000 BHT) 溶液中，於 4°C 冰箱中反應一個晚上，以溶解 DNA
  15. 加入 5  $\mu$ l 的 RNase A 和 20  $\mu$ l 的 RNase T<sub>1</sub>
  16. 放入 37°C 水浴槽中反應 1 小時
  17. 以等體積的氯仿萃取一次，以轉速 3200 rpm，4°C，10 分鐘離心
  18. 取出上清液至新離心管，加入 0.1 倍體積 3 M 醋酸鈉(pH 5.5)，和 2 倍體積 95% 冰乙醇，溫和的上下搖晃，使 DNA 沉澱
  19. 留下白色 DNA，再以 70% 冰乙醇清洗
  20. 將 DNA 放於 1.5 mL 離心管中，拿到抽風櫃風乾約 20 分鐘，再加入 300  $\mu$ l HPLC 水(加 1/1000 BHT)，於 4°C 冰箱中一個晚上，於分析前保存在 -20°C 冰箱。

### (3) 中性加熱水解

由於 N<sup>7</sup>-鳥糞嘌呤為不穩定之 DNA 共價鍵結物，為使 N<sup>7</sup> $\gamma$ -SFO-Gua 由 DNA 骨架中釋出，故於酵素水解前進行中性加熱水解，本研究中性加熱水解步驟參考 Li-Ching Shen 等人(Shen, Chiang et al. 2012)所使用之水解方法，方法步驟為：將萃取之 DNA 水溶液於 70°C 水浴中加熱 1-2 小時

### (4) 酵素水解

本研究之酵素水解效率為 64.28%，而酵素水解步驟參考 Bo Pang 與 Brock Matter 等人 (Pang, Zhou et al. 2007) (Matter, Malejka-Giganti et al. 2006) 提出之酵素水解方法，方法步驟如下：

1. DNA 水溶液(100  $\mu$ L, 100  $\mu$ g)加上 DNase I (4 U)、phosphodiesterase I (32 mU)、phosphodiesterase II (80 mU)、acid phosphatase(1 U)四種酵素，以及 10 mM MgCl<sub>2</sub>。
2. 在 37 °C 水浴中反應 8 至 10 小時

### (5) 固相萃取管柱

使用的固相萃取柱為 Sep – Pak Vac cartridge C-18 : 3 c.c. 200mg，主要分成四個步驟，方法步驟如下：



#### 1. 預處理萃取管柱

此步驟為潤濕固相萃取柱之填料,故以滿管溶劑衝洗管柱

- 使用 100% 的乙腈(acetonitrile, ACN)以 3 mL 體積沖洗兩次
- 使用 100% 的去離子水(de-ionized water, DIW)以 3 mL 體積沖洗兩次

#### 2. 加入樣品

此步驟將樣品裝入萃取管柱,使萃取管柱的填料吸附欲分析之化合物

- 將樣品加入萃取管柱中(體積為 1 mL)

#### 3. 沖洗填料

此步驟以能沖去樣品中雜質又得以保留欲分析化合物之沖洗液來沖去雜質

- 使用 100% 的去離子水以 3 mL 體積沖洗第一次
- 使用 100% 的去離子水以 3 mL 體積沖洗第二次
- 使用 5% 的乙腈以 3 mL 體積沖洗一次

#### 4. 洗脫欲收集之化合物

此步驟利用溶劑將被吸附在萃取管柱上之欲分析化合物洗脫下來,並收集以便後續分析

- 使用 30% 的乙腈以 3 mL 體積沖洗一次,並收集至試管中
- 使用真空濃縮離心機(speed-vac)以不加熱之條件將樣品抽乾(約 6-8 小時),並保存至 $-20^{\circ}\text{C}$ 等待分析

### 2.4.2 尿液樣本前處理

#### (1)尿液樣本前處理步驟

- 實驗小鼠在第 28 天最後一次暴露後,立即收集 24 小時之尿液  
(在尿液在收集前每個樣本之尿液收集管內會加入 5  $\mu\text{L}$  的疊氮化鈉( $\text{NaN}_3$ )做為抗菌劑)
- 取 100 $\mu\text{L}$  尿液樣本加入 10 $\mu\text{L}$  500 ppb 之內標準品( $[^{15}\text{N}_5]$ -N7 $\gamma$ -SFO-Gua)
- 加入去離子水使樣本體積達 1000  $\mu\text{L}$
- 透過固相萃取管柱進行固相萃取(方法同 DNA 固相萃取步驟)
- 使用真空濃縮離心機(speed-vac)以不加熱之條件將樣品抽乾(約 6-8 小時),並保存至 $-20^{\circ}\text{C}$ 等待分析
- 進行液相層析串聯式質譜儀分析前以 100 $\mu\text{L}$  回溶分析



## (2) 尿液生化指標

尿液中的肌酸酐(creatinine)委託專業之邱內科檢驗所進行檢驗。

### 2.5 液相層析串聯式質譜儀分析方法

本研究使用液相層析搭配電噴灑離子化串聯式質譜儀分析各組小鼠肝臟 DNA 之樣本。經前述之前處理方式後以去離子水以相同體積回溶後再進行液相層析串聯式質譜儀分析，本研究之液相層析串聯式質譜儀分析方法參考沈璫卿等人 (Shen, Chiang et al. 2012) 提供之方法，方法細節如下：

#### 1. 層析管柱：

C18 column(150 mm×2.1 mm, 3 μm, HyPURITYR C18; Thermo Hypersil-Keystone)

#### 2. 移動相：

水 相：10 mM 甲酸胺(ammonium formate)，pH5.1

有機相：乙腈(Acetonitrile, ACN) +0.1% 甲酸(Formic acid)

#### 3. 液相層析串聯式質譜儀情形

➤ 離子源：ESI<sup>+</sup> in selected reaction monitoring (SRM)

➤ 樣本之分析體積 20 μL

➤ 分析梯度情形：零分到第二十五分鐘，甲酸胺由 100% 降至 58%，第二十五分開始到第二十七分鐘，甲酸胺比例維持 0%，第二十七分始至三十二分鐘，甲酸胺維持 100%；由初始至三十二分鐘之流速維持 200μL/min。

## 2.6 分析方法之驗證

### 2.6.1 DNA 基質校正曲線配製與結果

本研究萃取未暴露環氧黃樟素之 BALB/c 品系小鼠的肝臟組織 DNA(濃度約 877.87 ng/μL)，進行校正曲線配製。將空白小鼠肝臟 DNA 進行酵素水解後加入各濃度之標準品，N7γ-SFO-Gua 濃度範圍為：0.5 ppb、1 ppb、2.5 ppb、5 ppb、25 ppb、100 ppb 的六個濃度點，並加入 10 μL 濃度 500 ppb 之同位素內標準品，使內標準品之最終濃度達 50 ppb，以此建立出 DNA 基質之校正曲線，去離子水建立之之校正曲線如圖 八(A)(B)(C)；DNA 基質建立之之校正曲線如圖 九 (A)(B)(C)。



### 2.6.2 尿液基質校正曲線配製與結果

本研究以暴露前之 CD-1 小鼠的尿液，進行校正曲線配製。將尿液加入各濃度之標準品，N7 $\gamma$ -SFO-Gua 濃度範圍為: 1 ppb、2.5 ppb、5 ppb、10 ppb、25 ppb、50 ppb、100 ppb 的七個濃度點，並加入 20  $\mu$ L 濃度 50 ppb 之同位素內標準品，使內標準品之最終濃度達 10 ppb，以此建立出 DNA 基質之校正曲線，分析結果如圖 十(A)(B)。

### 2.6.3 組織 DNA 基質效應、回收率、過程效率

本研究之基質效應、回收率、過程效率實驗方法參考 Matuszewski 等人 (Matuszewski, Constanzer et al. 2003) 提出之方法，方法如下：

A：將標準品與同位素內標配在水中，直接進行質譜分析

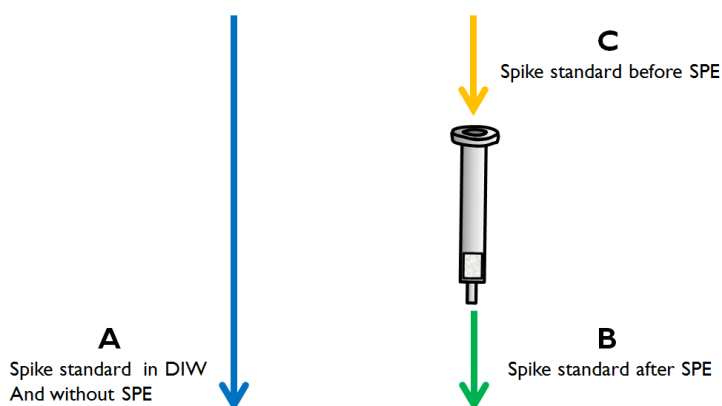
B：將 DNA 基質經過固相萃取後，加入標準品與同位素內標，以質譜分析

C：將標準品與同位素內標配在 DNA 基質中，再經固相萃取後以質譜分析

以上皆配製低、高兩個不同濃度之標準品，而 N7 $\gamma$ -SFO-Gua 與 N1 $\gamma$ -SFO-dAdo、N<sup>6</sup> $\gamma$ -SFO-dAdo 配製的濃度分別為 2.5, 50、8.325, 100  $\mu$ L/L 與 5.644, 67.751  $\mu$ L/L。

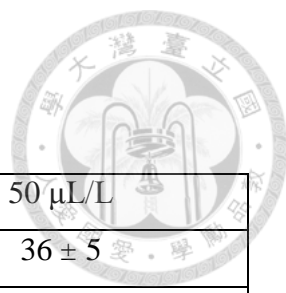
計算方法：

- 基質效應 =  $B/A \times 100$
- 回收率(%) =  $C/B \times 100$
- 過程效率(%) =  $C/A \times 100$



計算結果：

➤ 基質效應



		2.5 µL/L	50 µL/L
<b>N7γ-SFO-Gua</b>	m/z 330	37 ± 21	36 ± 5
	m/z 335	33 ± 4	33 ± 8
	330/335	108 ± 52	111 ± 11
		8.325 µL/L	100 µL/L
<b>N1γ-SFO-dAdo</b>	m/z 430	41 ± 6	60 ± 14
	m/z 435	45 ± 7	52 ± 10
	430/435	90 ± 6	115 ± 4
		5.644 µL/L	67.751 µL/L
<b>N6γ-SFO-dAdo</b>	m/z 430	53 ± 9	37 ± 6
	m/z 435	54 ± 7	30 ± 5
	430/435	97 ± 6	121 ± 1

\*基質效應以百分比(%) ± 標準差表示

根據文獻定義，數值接近 100% 表示分析物在水中的分析與在基質中沒有差異，即無基質的干擾，當數值大於 100% 即有離子化增強(ionization enhancement)的基質效應、而數值小於 100% 則表示有離子化抑制(ionization suppression)的基質效應。根據本研究的實驗結果顯示，N7γ-SFO-Gua 不論在低、高濃度的情形下，得到的數值均稍低於 100%，顯示 N7γ-SFO-Gua 在 DNA 基質中有微弱的離子化抑制，而 N6γ-SFO-dAdo 則是有顯著的離子化增強的情形，因此，需以 DNA 基質配製的檢量線來做為動物實驗樣本分析定量的依據。

➤ 回收率

		2.5 μL/L	50 μL/L
<b>N7γ-SFO-Gua</b>	m/z 330	88 ± 1.92	102 ± 8.44
	m/z 335	85 ± 18.34	106 ± 20.23
	330/335	92 ± 17.22	96.31 ± 7.45
		8.325 μL/L	100 μL/L
<b>N1γ-SFO-dAdo</b>	m/z 430	77 ± 11.58	87 ± 18.51
	m/z 435	79 ± 6.77	98 ± 23.29
	430/435	98 ± 12.73	89 ± 3.86
		5.644 μL/L	67.751 μL/L
<b>N6γ-SFO-dAdo</b>	m/z 430	39 ± 11.22	46 ± 9.81
	m/z 435	37.06 ± 17.28	46.83 ± 13.93
	430/435	101 ± 12.57	100 ± 22.43

\*回收率以百分比(%) ± 標準差表示

結果如上，N7γ-SFO-Gua 以及 N1γ-SFO-dAdo 的回收率在兩個不同濃度的情形下均接近 90%，N6γ-SFO-dAdo 則有約 40 % 的回收率，顯示本實驗固相萃取的方法對於 N7γ-SFO-Gua 與 N1γ-SFO-dAdo 兩分析物具有良好的回收率。

➤ 過程效率

		2.5 μL/L	50 μL/L
<b>N7γ-SFO-Gua</b>	m/z 330	28 ± 8.26	31.90 ± 8.65
	m/z 335	28 ± 6.12	30 ± 9.53
	330/335	99 ± 18.60	107 ± 8.30
		8.325 μL/L	100 μL/L
<b>N1γ-SFO-dAdo</b>	m/z 430	31 ± 4.70	52 ± 11.12
	m/z 435	35.51 ± 3.06	51 ± 12.13
	430/435	89 ± 11.46	103 ± 4.44
		5.644 μL/L	67.751 μL/L
<b>N6γ-SFO-dAdo</b>	m/z 430	16 ± 6.79	17 ± 3.61
	m/z 435	19 ± 9.01	14.21 ± 4.23
	430/435	87 ± 17	122 ± 27.21

\*過程效率以百分比(%) ± 標準差表示



#### 2.6.4 同日及異日檢量線之再現性

本研究之同日檢量線之再現性實驗方法為在同一天內重覆分析三次低、高兩種不同濃度之標準品(N=6)，異日檢量線之再現性則是連續三天分析並重新配製相同之標準品，而 N7 $\gamma$ -SFO-Gua 與 N1 $\gamma$ -SFO-dAdo、N6 $\gamma$ -SFO-dAdo 配製的濃度分別為 2.5075, 30.9、5.165, 62  $\mu$ L/L 與 0.5, 50  $\mu$ L/L。

方法準確性(Accuracy)之評估：

N7 $\gamma$ -SFO-Gua	Day 1	Day 2	Day 3
2.5075 $\mu$ L/L	88 $\pm$ 0.34	92 $\pm$ 0.16	110 $\pm$ 0.36
30.9 $\mu$ L/L	91 $\pm$ 5.54	115 $\pm$ 4.61	120 $\pm$ 3.48
N1 $\gamma$ -SFO-dAdo	Day 1	Day 2	Day 3
5.165 $\mu$ L/L	117 $\pm$ 1.11	96 $\pm$ 1.87	100 $\pm$ 0.21
62 $\mu$ L/L	103 $\pm$ 4.41	108 $\pm$ 13.60	84 $\pm$ 0.98
N6 $\gamma$ -SFO-dAdo	Day 1	Day 2	Day 3
0.5 $\mu$ L/L	112 $\pm$ 0.62	111 $\pm$ 0.33	106 $\pm$ 0.86
50 $\mu$ L/L	89 $\pm$ 12.71	81 $\pm$ 6.64	89 $\pm$ 12.09

\*方法準確性以百分比(%)  $\pm$  標準差表示

異日(inter-day)間相對標準偏差(RSD)：

	Concentration( $\mu$ L/L)	N7 $\gamma$ -SFO-Gua	N1 $\gamma$ -SFO-dAdo	N6 $\gamma$ -SFO-dAdo
<b>Day 1</b>	2.5075	19%	7%	15%
	30.9	17%	4%	22%
<b>Day 2</b>	5.165	9%	12%	12%
	62	5%	13%	7%
<b>Day 3</b>	0.5	15%	3%	1%
	50	4%	9%	9%



## 2.7 鳥糞嘌呤定量

本研究使用高效能液相層析儀進行每一小鼠肝臟組織 DNA 之鳥嘌呤(Guanine)定量，在進行分析前以酸水解方式使 DNA 中的含氮鹼基釋出，以便分析鳥嘌呤之含量。

### 2.7.1 酸水解

本研究使用之酸水解步驟參考吳等人(Wu, Scheller et al. 1999)提出之方法，方法步驟如下：

1. 取 10  $\mu\text{g}$  DNA(體積為 20 $\mu\text{L}$ ) 加入 500  $\mu\text{L}$  0.1 N HCl
2. 於 70°C 水浴中加熱 30 分鐘
3. 使用真空濃縮離心機(speed-vac)以不加熱之條件將樣品抽乾(約 1 小時)
4. 以 400  $\mu\text{L}$  之去離子水回溶
5. 透過 0.22  $\mu\text{m}$  之尼龍針筒過濾器(nylon syringe filter)過濾後進行分析

### 2.7.2 高效能液相層析儀分析方法

1. 層析管柱：
  - BDS HYPERSIL C18 column(4.6 $\times$ 150 mm, 5  $\mu\text{m}$ )
2. 移動相：
  - 水相：50 mM 甲酸胺(ammonium formate)，pH5.5
  - 有機相：乙腈(Acetonitrile, ACN)
3. 高效能液相層析儀情形
  - 樣本之分析體積 10  $\mu\text{L}$
  - 分析梯度情形：零分到第七分鐘，甲酸胺由 100%降至 97%，第七分開始到第九分鐘，甲酸胺比例降至 50%，第九分始至二十分鐘，甲酸胺維持 100%；由初始至二十分鐘之流速維持 1000  $\mu\text{L}/\text{min}$ 。



## 第三章 結果

### 3.1 動物體外細胞實驗

將肝癌細胞(Hepatocellular carcinoma, HepG2 cell)分成三組，控制組、高低劑量細胞暴露組(250  $\mu\text{M}$ 、375  $\mu\text{M}$ )，萃取細胞之 DNA 後，依序進行中性加熱水解、酵素水解、固相萃取後使用液相層析串聯式質譜儀進行共價鍵結物分析，實驗結果證實細胞暴露環氧黃樟素後能產生環氧黃樟素相關之 DNA 共價鍵結物，分別是 N7 $\gamma$ -SFO-Gua 與 N1 $\gamma$ -SFO-dAdo，肝癌細胞低劑量與高劑量濃度 N7 $\gamma$ -SFO-Gua 分別為 1287 與 2051 DNA adducts/ $10^7$  base 而 N1 $\gamma$ -SFO-dAdo 分別為 7 與 10 DNA adducts/ $10^7$  base(圖 十一、十二、十三)。

### 3.2 動物實驗

本研究之環氧黃樟素與相關化合物小鼠動物實驗暴露劑量設計如表 三，連續 28 天黃樟素與環氧黃樟素暴露後小鼠之體重變化情形如圖 十四所示。連續 28 天黃樟素暴露後小鼠之肝、腎、肺臟之相對重量，黃樟素高劑量組的肝臟重量顯著的高於控制組，而黃樟素低與高劑量組之腎臟重量皆顯著低於控制組(表 四)。環氧黃樟素暴露後小鼠之肝臟、腎臟、肺臟之重量與其相對重量，環氧黃樟素暴露組肝臟重量除最低劑量(30 mg/kg/day)外，皆顯著低於控制組，而環氧黃樟素所有劑量之腎臟相對重量皆顯著低於控制組(表 五)。

### 3.3 液相層析串聯式質譜儀分析結果

#### 3.3.1 肝臟組織結果

暴露不同劑量環氧黃樟素與黃樟素小鼠的肝臟組織 DNA 之液相層析搭配電噴灑離子化串聯式質譜儀分析結果，在控制組、黃樟素低高暴露組皆無法分析到 N7 $\gamma$ -SFO-Gua，環氧黃樟素低劑量組部份樣本可看到些微波峰，其中 30 mg/kg/day 組有兩個樣本、60 mg/kg/day 組有一個樣本低於我們分析方法的偵測極限，因此，在計算平均值與標準差時，我們未將低於偵測極限的樣本帶入計算，剩下高於偵測極限的樣本由於其波峰面積低於我們的檢量線範圍，我們以檢量線公式外推得到濃度值，這兩個組別的 N7 $\gamma$ -SFO-Gua 濃度分別為  $0.338 \pm 0.0370$  與  $0.342 \pm 0.0528$ (DNA adducts/ $10^7$  base)，而環氧黃樟素高劑量組(90 mg/kg/day)與最高劑量組(120 mg/kg/day)除 90 mg/kg/day 組有一個樣本低於偵測極限外，皆可看見明顯之波峰，且其濃度分別為  $0.435 \pm 0.075$  與  $0.648 \pm 0.212$ (DNA adducts/ $10^7$  base)，證實環氧黃樟素確實能在動物體內形成 DNA 共價鍵結物(表 六)並且具有劑量反應關係(圖 二十九)，



肝臟組織 DNA 質譜圖(圖 十五 至 圖 二十一)。

### 3.3.2 尿液樣本分析結果

CD-1 小鼠於最後一次暴露後以代謝籠連續收集 24 小時尿液之液相層析搭配電噴灑離子化串聯式質譜儀分析分析圖譜如圖 二十二 至 圖 二十八。尿液質譜分析結果，無論在控制組與黃樟素低、高暴露組皆無法分析到 N7 $\gamma$ -SFO-Gua，環氧黃樟素低至高劑量則皆可分析到 N7 $\gamma$ -SFO-Gua，有明顯訊號並具有劑量反應關係(圖 三十)，由低至高劑量的濃度分別為  $9.62 \pm 5.08$ 、 $43.33 \pm 15.42$ 、 $83.46 \pm 27.73$ 、 $164.29 \pm 40.99$   $\mu\text{g/g creatinine}$ (表 七)。



## 第四章 討論

### 4.1 綜合結果討論

環氧化合物是烯類化合物在動物體內代謝過程中產生的代謝物，在過去許多毒性試驗被證實此類化合物常能與 DNA 產生共價鍵結具有基因毒性(Koskinen and Plna 2000)。然而，黃樟素之代謝產物-環氧黃樟素，在過去一直不被認為是重要的黃樟素活性代謝物，如 1974 年時 Stillwell 等人認為環氧黃樟素在動物體內至腹腔後進入肝腸循環，並經代謝後由尿液排出(Stillwell, Carman et al. 1974)。於 1995 年時，Qato 等人曾將成年的雄性 Balb/C 品系小鼠暴露單一劑量(600  $\mu\text{mol/kg}$ )的黃樟素或環氧黃樟素，並搭配  $^{32}\text{P}$ -後標籤法進行分析，認為環氧黃樟素雖可在體外動物實驗觀察到有八種 DNA 共價鍵結物的產生，但無法在體內形成 DNA 共價鍵結物(Qato and Guentner 1995)。但由於  $^{32}\text{P}$ -後標籤法如前面所提到，是將  $^{32}\text{P}$  標記之磷酸基團轉移到至去氧核糖分析，故不適於分析核苷鍵不穩定之 N7 $\gamma$ -SFO-Gua DNA 共價鍵結物，導致 Qato 等人無法成分析到體內形成的 DNA 共價鍵結物，此外，在 2011 年時我們實驗室成功的在暴露了單一劑量環氧黃樟素(30 mg/kg/day)的小鼠身上分析到 N7 $\gamma$ -SFO-Gua，暴露後連續收集三天尿液，第一、二天濃度分別為  $1.02 \pm 0.14$  與  $0.73 \pm 0.68$   $\mu\text{g/g creatinine}$ ，而在第三天低於定量極限，並估計半衰期為 60 小時(Shen, Chiang et al. 2012)。因此，我們進一步進行組織 DNA 分析，欲探討環氧黃樟素之基因毒性。

在正式動物實驗前，為確保我們所開發之分析方法能夠分析到欲分析到之環氧黃樟素共價鍵結物，我們進行了肝癌細胞的環氧黃樟素暴露實驗，並成功的在肝癌細胞萃取之 DNA 中分析到共價鍵結物 N7 $\gamma$ -SFO-Gua 與 N1 $\gamma$ -SFO-dAdo，接著進行為期一個月的動物實驗，本研究最初以肝臟組織萃取之 DNA(100  $\mu\text{g}$ )進行 DNA 共價鍵結物之分析，DNA 萃取後便添加同位素內標準品，接著進行中性加熱水解、酵素水解後經固相萃取搭配 LC-MS/MS 分析，然而初步結果不彰，僅分析到在 N7 $\gamma$ -SFO-Gua 位置上之微小波峰，因此，為進一步確認此波峰即為我們欲研究之 DNA 共價鍵結物，我們捨去酵素水解後將 DNA 添加同位素內標準品後捨去酵素水解之步驟，經中性加熱水解與固相萃取濃縮三倍體積後使用 LC-MS/MS 分析，因此能在環氧黃樟素暴露組中得到明顯之 N7 $\gamma$ -SFO-Gua 波峰訊號，證實環氧黃樟素能在肝臟組織中產生 DNA 共價鍵結物。

過去文獻報導，環氧化合物的 DNA 共價鍵結產物中 N7-取代之鳥糞嘌呤的共價鍵結物



在動物體內生成的量最多，且本身具有熱不穩定、自發性去嘌呤的特性，容易由尿液排出，因此 N7-取代之鳥糞嘌呤的共價鍵結物可以做為評估致癌性烷化物暴露情形的生物標記 (Shuker and Farmer 1992)。而根據我們的尿液分析結果顯示在暴露了環氧黃樟素後，會產生許多 DNA 共價鍵結物 N7 $\gamma$ -SFO-Gua 透過尿液排泄，因此，我們認為這是在肝臟組織中僅能分析到少量的 N7 $\gamma$ -SFO-Gua 的可能原因。而在相同劑量環氧黃樟素暴露下，根據先前單一劑量 (30 mg/kg)環氧黃樟素暴露之研究，第一天尿液中 N7 $\gamma$ -SFO-Gua 的濃度為  $1.02 \pm 0.14 \mu\text{g/g creatinine}$  (n=4)，在第二天的濃度為  $0.73 \pm 0.68 \mu\text{g/g creatinine}$ ，到了第三天則低於偵測極限，而我們動物實驗在 28 天重覆暴露同樣劑量環氧黃樟素後，於最後一次暴露後收集之尿液中分析到的濃度為  $9.62 \pm 5.08 \mu\text{g/g creatinine}$  (n=5) (Shen, Chiang et al. 2012)，我們認為因為我們研究設計是每天一次施予環氧黃樟素，故未等到尿液中 N7 $\gamma$ -SFO-Gua 恢復至基準值(baseline level)即進行下一次暴露，因而造成連續 28 天暴露後尿液中 N7 $\gamma$ -SFO-Gua 的量高於單一劑量暴露的尿液。

雖然 N7 $\gamma$ -SFO-Gua 的去嘌呤位置通常能夠修復且不參與 Watson-Crick 鹼基配對(base pairing)，與其他位置產生的共價鍵結物相比之下較不重要(Koskinen and Plna 2000)，但因為 N7-鳥糞嘌呤之共價鍵結物相較於其他共價鍵結物濃度較高，因此較容易被偵測到。此外，在糖苷鍵(N-glycosylic bond)自發性的水解或 DNA 糖基轉移酶(N-glycosylases)作用下移除 N7-鳥糞嘌呤之共價鍵結物的過程中，都會導致 DNA 上產生無嘌呤或無嘧啶的地方(即 abasic site, AP site)，而 AP site 則會阻斷 DNA 的複製、DNA 股斷裂導致突變(Boiteux and Guillet 2004)。而在我們的分析結果不論在細胞、組織 DNA、尿液皆可以分析到 N7 $\gamma$ -SFO-Gua，我們能夠分析到 N7 $\gamma$ -SFO-Gua 顯示，環氧黃樟素形成 N7 $\gamma$ -SFO-Gua 後，可能會經由體內代謝形成 AP site，使具有突變性，且其生成也伴隨其他致突變性之 DNA 共價鍵結物之生成的可能，而根據先前與我們實驗室合作的中國醫藥大學江素瑛老師的研究結果發現，暴露環氧黃樟素會造成小鼠紅血球細胞中的微核(micronuclei)增加以及細胞的 DNA 鍊斷裂，因此認為環氧黃樟素具有細胞毒性與基因毒性(Chiang, Lee et al. 2011)，此結果與我們的研究相符，因此，我們認為環氧黃樟素是具有基因毒性的環氧代謝物。

在 2012 年時，Martati 等人曾以大鼠各部位組織中萃取之微粒體(microsome)與黃樟素作用，搭配生物動力學模式(Physiologically Based Biokinetic, PBBK modle)，推算出黃樟素各代



謝物於體內產生的百分比，其中，作者提到在他的微粒體試驗中無法分析到環氧黃樟素的可能原因為黃樟素產生環氧黃樟素後會迅速被微粒體環氧化物水解酶(microsomal epoxide hydrolases)水解成二羥基黃樟素(2',3'-dihydroxysafrole) (Martati, Boersma et al. 2011)，前人研究指出，黃樟素在肝臟經由細胞色素 P450(Cytochrome P450)轉變成環氧黃樟素後，便直接經由肝臟中的麩胺基硫轉移酵素(glutathione S-transferase, GSTs)與環氧化物水解酶(epoxide hydrolases, EHs)代謝，因此先前認為環氧黃樟素無法在體內與 DNA 形成共價鍵結物(Miller and Miller 1983) (Luo and Guenther 1994)。而不論在暴露黃樟素的動物組織 DNA 或是尿液中，皆無法分析到有關於環氧黃樟素形成之 DNA 共價鍵結物的原因以及環氧黃樟素實際在體內的代謝機制還待我們做進一步的研究。

#### 4.2 研究限制

本研究主要有幾個研究限制，限制如下：

第一：肝癌細胞暴露實驗樣本數僅有一個，但同時具有控制組以及兩個不同劑量，且在控制組並沒有分析到任何與環氧黃樟素形成 DNA 共價鍵結物，因此，此結果仍能夠當作參考。

第二：組織萃取的過程中，每個小鼠之肝臟組織，僅取約 300 毫克進行研磨，並無涵蓋整個肝臟組織，但因為每組實驗動物有五至六隻小鼠，因此能夠消除各組之差異。

第三：小鼠的尿液以代謝籠方式收集二十四小時，因無法控制每隻小鼠皆能有足夠尿量，所以在分析上會剔除部分尿量太少以致於無法分析之樣本，但每組僅剔除約一至兩個樣本，每組平均有 5 個樣本，仍具有代表性。

#### 4.3 結論

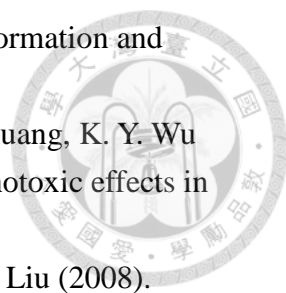
本研究成功的在動物體內組織分析到由環氧黃樟素形成之 DNA 共價鍵結物，除證實環氧黃樟素能在體外動物試驗形成 DNA 共價鍵結物外，也能在體內組織形成 DNA 共價鍵結物，而認為環氧黃樟素具有基因毒性，且本研究的結果與先前研究相符，環氧黃樟素在未來若是被開發成藥物，我們的實驗結果將可以提供評估藥物副作用的資訊。但黃樟素在體內代謝成環氧黃樟素的後續代謝、去毒情形仍待進一步研究，未來我們將進一步探討在暴露黃樟素的動物組織 DNA 以及尿液中，皆無法分析到有關於環氧黃樟素形成之 DNA 共價鍵結物的原因以及環氧黃樟素實際在體內的代謝機制。

## 參考文獻



- Abbott, D. D., E. W. Packman, B. M. Wagner and J. W. E. Harrison (1961). "Chronic oral toxicity of oil of sassafras and safrole." Pharmacologist 3: 62.
- Archer, V. E. and D. W. Jones (2002). "Capsaicin pepper, cancer and ethnicity." Med Hypotheses 59(4): 450-457.
- Bastlova, T. and A. Podlutzky (1996). "Molecular analysis of styrene oxide-induced hprt mutation in human T-lymphocytes." Mutagenesis 11(6): 581-591.
- Benedetti, M. S., A. Malnoe and A. L. Broillet (1977). "Absorption, metabolism and excretion of safrole in the rat and man." Toxicology 7(1): 69-83.
- Boberg, E. W., E. C. Miller and J. A. Miller (1986). "The metabolic sulfonation and side-chain oxidation of 3'-hydroxyisosafrrole in the mouse and its inactivity as a hepatocarcinogen relative to 1'-hydroxysafrole." Chem Biol Interact 59(1): 73-97.
- Boberg, E. W., E. C. Miller, J. A. Miller, A. Poland and A. Liem (1983). "Strong evidence from studies with brachymorphic mice and pentachlorophenol that 1'-sulfoxysafrole is the major ultimate electrophilic and carcinogenic metabolite of 1'-hydroxysafrole in mouse liver." Cancer Res 43(11): 5163-5173.
- Boiteux, S. and M. Guillet (2004). "Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*." DNA Repair (Amst) 3(1): 1-12.
- Borchert, P., J. A. Miller, E. C. Miller and T. K. Shires (1973). "1'-Hydroxysafrole, a proximate carcinogenic metabolite of safrole in the rat and mouse." Cancer Res 33(3): 590-600.
- Borchert, P., P. G. Wislocki, J. A. Miller and E. C. Miller (1973). "The metabolism of the naturally occurring hepatocarcinogen safrole to 1'-hydroxysafrole and the electrophilic reactivity of 1'-acetoxysafrole." Cancer Res 33(3): 575-589.
- Boysen, G., B. F. Pachkowski, J. Nakamura and J. A. Swenberg (2009). "The formation and biological significance of N7-guanine adducts." Mutat Res 678(2): 76-94.
- Brown, K. (2012). "Methods for the detection of DNA adducts." Methods Mol Biol 817: 207-230.
- Chang, M. J., C. Y. Ko, R. F. Lin and L. L. Hsieh (2002). "Biological monitoring of environment exposure to safrole and the Taiwanese betel quid chewing." Arch Environ Contam Toxicol 43(4): 432-437.
- Chen, C. L., C. W. Chi, K. W. Chang and T. Y. Liu (1999). "Safrole-like DNA adducts in oral tissue from oral cancer patients with a betel quid chewing history." Carcinogenesis 20(12): 2331-2334.



- 
- Chen, H. J. C. and C. L. Hong (2001). "Endogenous DNA adduct: formation and analysis." the Chinese Chemical Society 59(3): 299-317.
- Chiang, S. Y., P. Y. Lee, M. T. Lai, L. C. Shen, W. S. Chung, H. F. Huang, K. Y. Wu and H. C. Wu (2011). "Safrole-2',3'-oxide induces cytotoxic and genotoxic effects in HepG2 cells and in mice." Mutat Res 726(2): 234-241.
- Chung, Y. T., C. L. Chen, C. C. Wu, S. A. Chan, C. W. Chi and T. Y. Liu (2008). "Safrole-DNA adduct in hepatocellular carcinoma associated with betel quid chewing." Toxicol Lett 183(1-3): 21-27.
- Csanady, G. A., W. Kessler, H. D. Hoffmann and J. G. Filser (2003). "A toxicokinetic model for styrene and its metabolite styrene-7,8-oxide in mouse, rat and human with special emphasis on the lung." Toxicol Lett 138(1-2): 75-102.
- Daimon, H., S. Sawada, S. Asakura and F. Sagami (1997). "Inhibition of sulfotransferase affecting in vivo genotoxicity and DNA adducts induced by safrole in rat liver." Teratog Carcinog Mutagen 17(6): 327-337.
- Daimon, H., S. Sawada, S. Asakura and F. Sagami (1998). "In vivo genotoxicity and DNA adduct levels in the liver of rats treated with safrole." Carcinogenesis 19(1): 141-146.
- Delaforge, M., P. Janiaud, P. Levi and J. P. Morizot (1980). "Biotransformation of allylbenzene analogues in vivo and in vitro through the epoxide-diol pathway." Xenobiotica 10(10): 737-744.
- Faller, T. H., G. A. Csanady, P. E. Kreuzer, C. M. Baur and J. G. Filser (2001). "Kinetics of propylene oxide metabolism in microsomes and cytosol of different organs from mouse, rat, and humans." Toxicol Appl Pharmacol 172(1): 62-74.
- Friedman, M. A. and J. Staub (1976). "Inhibition of mouse testicular DNA synthesis by mutagens and carcinogens as a potential sample mammalian assay for mutagenesis." Mutat Res 37(1): 67-76.
- Hemminki, K. (1993). "DNA adducts, mutations and cancer." Carcinogenesis 14(10): 2007-2012.
- Himmelstein, M. W., P. J. Boogaard, J. Cadet, P. B. Farmer, J. H. Kim, E. A. Martin, R. Persaud and D. E. Shuker (2009). "Creating context for the use of DNA adduct data in cancer risk assessment: II. Overview of methods of identification and quantitation of DNA damage." Crit Rev Toxicol 39(8): 679-694.
- Ho, C. S., C. W. Lam, M. H. Chan, R. C. Cheung, L. K. Law, L. C. Lit, K. F. Ng, M. W. Suen and H. L. Tai (2003). "Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications." Clin Biochem Rev 24(1): 3-12.
- Hoeijmakers, J. H. (2001). "Genome maintenance mechanisms for preventing cancer." Nature 411(6835): 366-374.
- IARC (1976). "IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to

Humans: Some Naturally Occurring Substances, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France."

Ioannides, C., M. Delaforge and D. V. Parke (1981). "Safrole: its metabolism, carcinogenicity and interactions with cytochrome P-450." Food Cosmet Toxicol 19(5): 657-666.

Jeurissen, S. M., J. J. Bogaards, H. M. Awad, M. G. Boersma, W. Brand, Y. C. Fiamegos, T. A. van Beek, G. M. Alink, E. J. Sudholter, N. H. Cnubben and I. M. Rietjens (2004). "Human cytochrome p450 enzyme specificity for bioactivation of safrole to the proximate carcinogen 1'-hydroxysafrole." Chem Res Toxicol 17(9): 1245-1250.

Klungsoyr, J. and R. R. Scheline (1982). "Metabolism of isosafrole and dihydro safrole in the rat." Biomed Mass Spectrom 9(8): 323-329.

Klungsoyr, J. and R. R. Scheline (1983). "Metabolism of safrole in the rat." Acta Pharmacol Toxicol (Copenh) 52(3): 211-216.

Koc, H. and J. A. Swenberg (2002). "Applications of mass spectrometry for quantitation of DNA adducts." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 778(1-2): 323-343.

Koskinen, M. and K. Plna (2000). "Specific DNA adducts induced by some mono-substituted epoxides in vitro and in vivo." Chem Biol Interact 129(3): 209-229.

Koskinen, M., P. Vodicka and K. Hemminki (2000). "Adenine N3 is a main alkylation site of styrene oxide in double-stranded DNA." Chem Biol Interact 124(1): 13-27.

Krause, R. J., J. E. Sharer and A. A. Elfarra (1997). "Epoxide hydrolase-dependent metabolism of butadiene monoxide to 3-butene-1,2-diol in mouse, rat, and human liver." Drug Metab Dispos 25(8): 1013-1015.

Latham, G. J., L. Zhou, C. M. Harris, T. M. Harris and R. S. Lloyd (1993). "The replication fate of R- and S-styrene oxide adducts on adenine N6 is dependent on both the chirality of the lesion and the local sequence context." J Biol Chem 268(31): 23427-23434.

Liu, T. Y., Y. T. Chung, P. F. Wang, C. W. Chi and L. L. Hsieh (2004). "Safrole-DNA adducts in human peripheral blood--an association with areca quid chewing and CYP2E1 polymorphisms." Mutat Res 559(1-2): 59-66.

Long, E. L., A. A. Nelson, O. G. Fitzhugh and W. H. Hansen (1963). "Liver tumours produced in rats by safrole." Arch. Pathol. 75: 595.

Luo, G. and T. M. Guenther (1994). "Detoxication of the 2',3'-epoxide metabolites of allylbenzene and estragole. Conjugation with glutathione." Drug Metab Dispos 22(5): 731-737.

Luo, G. and T. M. Guenther (1995). "Metabolism of allylbenzene 2',3'-oxide and estragole 2',3'-oxide in the isolated perfused rat liver." J Pharmacol Exp Ther 272(2):

588-596.

Luo, G., M. K. Qato and T. M. Guenther (1992). "Hydrolysis of the 2',3'-allylic epoxides of allylbenzene, estragole, eugenol, and safrole by both microsomal and cytosolic epoxide hydrolases." Drug Metab Dispos 20(3): 440-445.

Martati, E., M. G. Boersma, A. Spenkeliink, D. B. Khadka, A. Punt, J. Vervoort, P. J. van Bladeren and I. M. Rietjens (2011). "Physiologically based biokinetic (PBBK) model for safrole bioactivation and detoxification in rats." Chem Res Toxicol 24(6): 818-834.

Matter, B., D. Malejka-Giganti, A. S. Csallany and N. Tretyakova (2006).

"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 34(19): 5449-5460.

Matuszewski, B. K., M. L. Constanzer and C. M. Chavez-Eng (2003). "Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS." Anal Chem 75(13): 3019-3030.

Miller, J. A. and E. C. Miller (1983). "The metabolic activation and nucleic acid adducts of naturally-occurring carcinogens: recent results with ethyl carbamate and the spice flavors safrole and estragole." Br J Cancer 48(1): 1-15.

Munerato, M. C., M. Sinigaglia, M. L. Reguly and H. H. de Andrade (2005).

"Genotoxic effects of eugenol, isoeugenol and safrole in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*." Mutat Res 582(1-2): 87-94.

Munter, T., L. Cottrell, S. Hill, L. Kronberg, W. P. Watson and B. T. Golding (2002).

"Identification of adducts derived from reactions of (1-chloroethenyl)oxirane with nucleosides and calf thymus DNA." Chem Res Toxicol 15(12): 1549-1560.

Nakagawa, Y., T. Suzuki, K. Nakajima, H. Ishii and A. Ogata (2009).

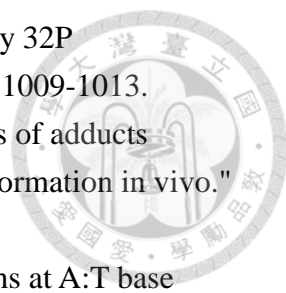
"Biotransformation and cytotoxic effects of hydroxychavicol, an intermediate of safrole metabolism, in isolated rat hepatocytes." Chem Biol Interact 180(1): 89-97.

Pang, B., X. Zhou, H. Yu, M. Dong, K. Taghizadeh, J. S. Wishnok, S. R. Tannenbaum and P. C. Dedon (2007). "Lipid peroxidation dominates the chemistry of DNA adduct formation in a mouse model of inflammation." Carcinogenesis 28(8): 1807-1813.

Phillips, D. H. and V. M. Arlt (2007). "The <sup>32</sup>P-postlabeling assay for DNA adducts." Nat Protoc 2(11): 2772-2781.

Phillips, D. H., P. B. Farmer, F. A. Beland, R. G. Nath, M. C. Poirier, M. V. Reddy and K. W. Turteltaub (2000). "Methods of DNA adduct determination and their application to testing compounds for genotoxicity." Environ Mol Mutagen 35(3): 222-233.

Pongracz, K., S. Kaur, A. L. Burlingame and W. J. Bodell (1989).



"O6-substituted-2'-deoxyguanosine-3'-phosphate adducts detected by 32P post-labeling of styrene oxide treated DNA." Carcinogenesis 10(6): 1009-1013.

Qato, M. K. and T. M. Guenther (1995). "32P-postlabeling analysis of adducts formed between DNA and safrole 2',3'-epoxide: absence of adduct formation in vivo." Toxicol Lett 75(1-3): 201-207.

Recio, L. and K. G. Meyer (1995). "Increased frequency of mutations at A:T base pairs in the bone marrow of B6C3F1 lacI transgenic mice exposed to 1,3-butadiene." Environ Mol Mutagen 26(1): 1-8.

Santella, R. M. (1999). "Immunological methods for detection of carcinogen-DNA damage in humans." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 8(9): 733-739.

Shen, L. C., S. Y. Chiang, I. T. Ho, K. Y. Wu and W. S. Chung (2012). "Synthesis and Characterization of Adducts Formed in the Reactions of Safrole 2',3'-Oxide with 2'-Deoxyadenosine, Adenine, and Calf Thymus DNA." European Journal of Organic Chemistry(4): 792-800.

Shen, L. C., S. Y. Chiang, M. H. Lin, W. S. Chung and K. Y. Wu (2012). "In vivo formation of N7-guanine DNA adduct by safrole 2',3'-oxide in mice." Toxicol Lett 213(3): 309-315.

Shuker, D. E. and P. B. Farmer (1992). "Relevance of urinary DNA adducts as markers of carcinogen exposure." Chem Res Toxicol 5(4): 450-460.

Singh, R. and P. B. Farmer (2006). "Liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry: the future of DNA adduct detection." Carcinogenesis 27(2): 178-196.

Sisk, S. C., L. J. Pluta, J. A. Bond and L. Recio (1994). "Molecular analysis of lacI mutants from bone marrow of B6C3F1 transgenic mice following inhalation exposure to 1,3-butadiene." Carcinogenesis 15(3): 471-477.

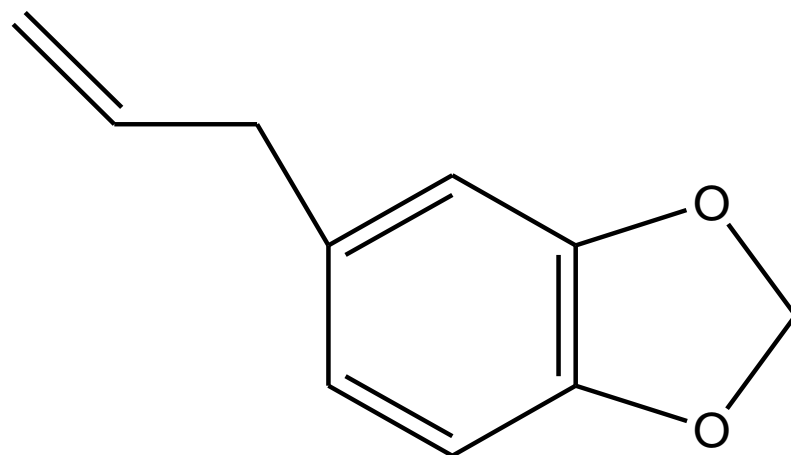
Stillwell, W., J. K. Carman, L. Bell and M. G. Horning (1974). "The metabolism of safrole and 2',3'-epoxysafrole in the rat and guinea pig." Drug Metab Dispos 2(6): 489-498.

Strauss, W. M. (2001). "Preparation of genomic DNA from mammalian tissue." Curr Protoc Neurosci Appendix 1: Appendix 1H.

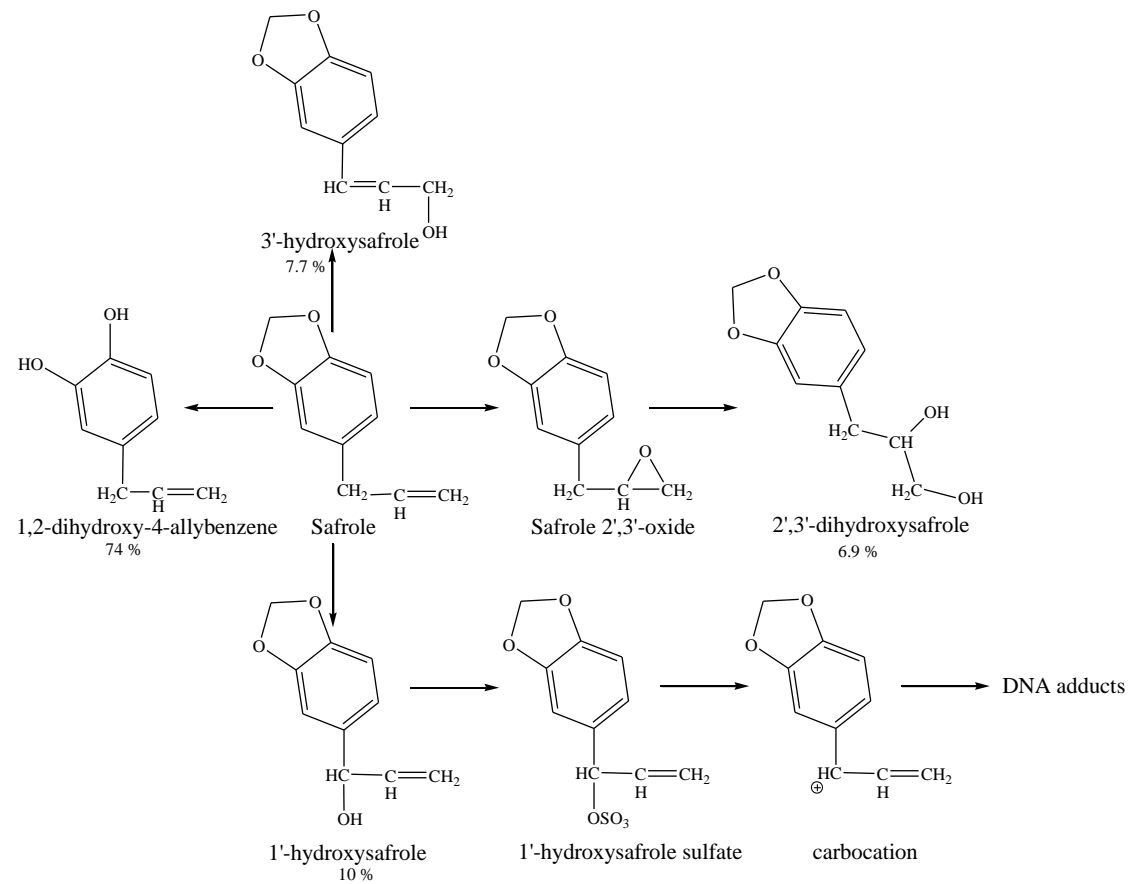
Su, L., J. Zhao, B. X. Zhao, S. L. Zhang and J. Y. Miao (2011). "Safrole oxide induces human umbilical vein endothelial cell transdifferentiation to 5-hydroxytryptaminergic neuron-like cells through tropomyosin receptor kinase A/cyclooxygenase 2/nuclear factor-kappa B/interleukin 8 signaling." Int J Biochem Cell Biol 43(10): 1512-1522.

Swanson, A. B., D. D. Chambliss, J. C. Blomquist, E. C. Miller and J. A. Miller (1979). "The mutagenicities of safrole, estragole, eugenol, trans-anethole, and some of their known or possible metabolites for Salmonella typhimurium mutants." Mutat Res 60(2): 143-153.

- Swenberg, J. A., E. Fryar-Tita, Y. C. Jeong, G. Boysen, T. Starr, V. E. Walker and R. J. Albertini (2008). "Biomarkers in toxicology and risk assessment: informing critical dose-response relationships." Chem Res Toxicol 21(1): 253-265.
- Tan, D. X., B. Poeggeler, R. J. Reiter, L. D. Chen, S. Chen, L. C. Manchester and L. R. Barlow-Walden (1993). "The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adduct formation induced by the chemical carcinogen safrole in vivo." Cancer Lett 70(1-2): 65-71.
- Tretyakova, N., Y. Lin, R. Sangaiah, P. B. Upton and J. A. Swenberg (1997). "Identification and quantitation of DNA adducts from calf thymus DNA exposed to 3,4-epoxy-1-butene." Carcinogenesis 18(1): 137-147.
- Ueng, Y. F., C. H. Hsieh and M. J. Don (2005). "Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by the natural hepatotoxin safrole." Food Chem Toxicol 43(5): 707-712.
- Vogl, J. and W. Pritzkow (2010). "Isotope Dilution Mass Spectrometry - A Primary Method of Measurement and Its Role for RM Certification." Mapan-Journal of Metrology Society of India 25(3): 135-164.
- Wislocki, P. G., P. Borchert, J. A. Miller and E. C. Miller (1976). "The metabolic activation of the carcinogen 1'-hydroxysafrole in vivo and in vitro and the electrophilic reactivities of possible ultimate carcinogens." Cancer Res 36(5): 1686-1695.
- Wislocki, P. G., E. C. Miller, J. A. Miller, E. C. McCoy and H. S. Rosenkranz (1977). "Carcinogenic and mutagenic activities of safrole, 1'-hydroxysafrole, and some known or possible metabolites." Cancer Res 37(6): 1883-1891.
- Wu, K. Y., S. Y. Chiang, W. C. Shih, C. C. Huang, M. F. Chen and J. A. Swenberg (2011). "The application of mass spectrometry in molecular dosimetry: Ethylene oxide as an example." Mass Spectrom Rev.
- Wu, K. Y., N. Scheller, A. Ranasinghe, T. Y. Yen, R. Sangaiah, R. Giese and J. A. Swenberg (1999). "A gas chromatography/electron capture/negative chemical ionization high-resolution mass spectrometry method for analysis of endogenous and exogenous N7-(2-hydroxyethyl)guanine in rodents and its potential for human biological monitoring." Chem Res Toxicol 12(8): 722-729.
- Zhao, Y., J. Xin, C. Sun, B. Zhao, J. Zhao and L. Su (2012). "Safrole oxide induced neuronal differentiation of rat bone-marrow mesenchymal stem cells by elevating Hsp70." Gene 509(1): 85-92.
- 沈璵卿(2012)。2',3'-環氧黃樟素所形成 DNA 加成產物之體外與體內研究。國立交通大學應用化學系碩博士班博士論文。全國博碩士論文資訊網。

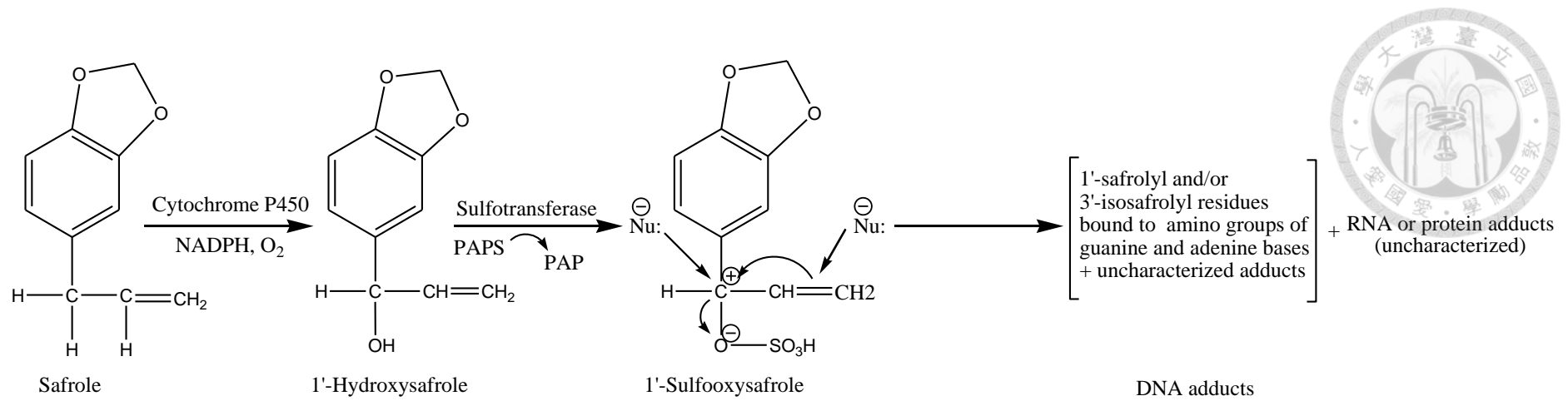


圖一、黃樟素化學結構式



圖二、黃樟素的代謝途徑

(Martati, Boersma et al. 2011)



圖三、1'-羥基黃樟素代謝情形

(Boberg, Miller et al. 1983)



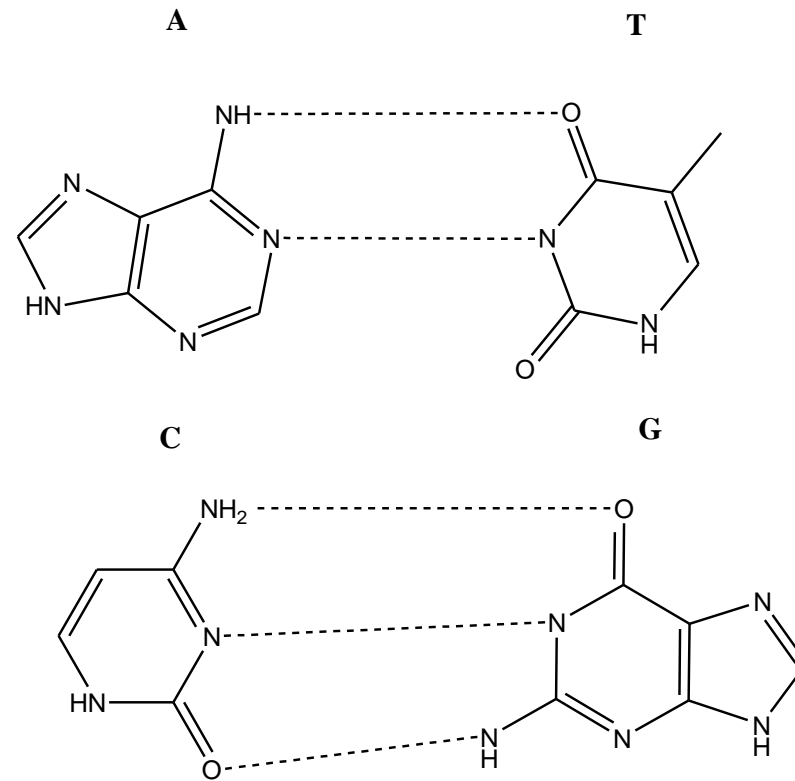


圖 四、去氧核糖核酸的基本結構

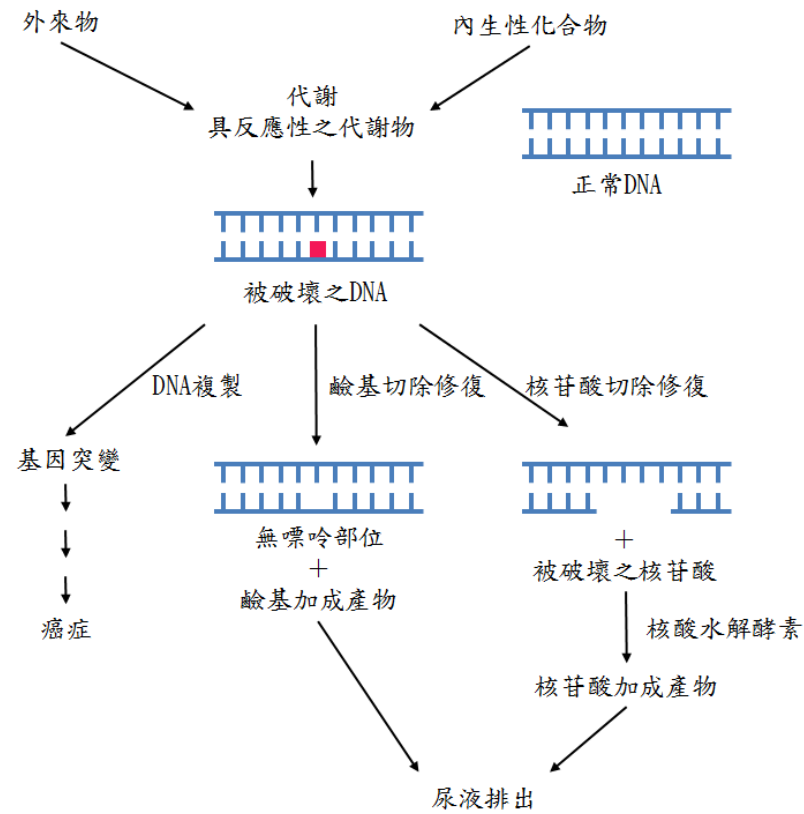
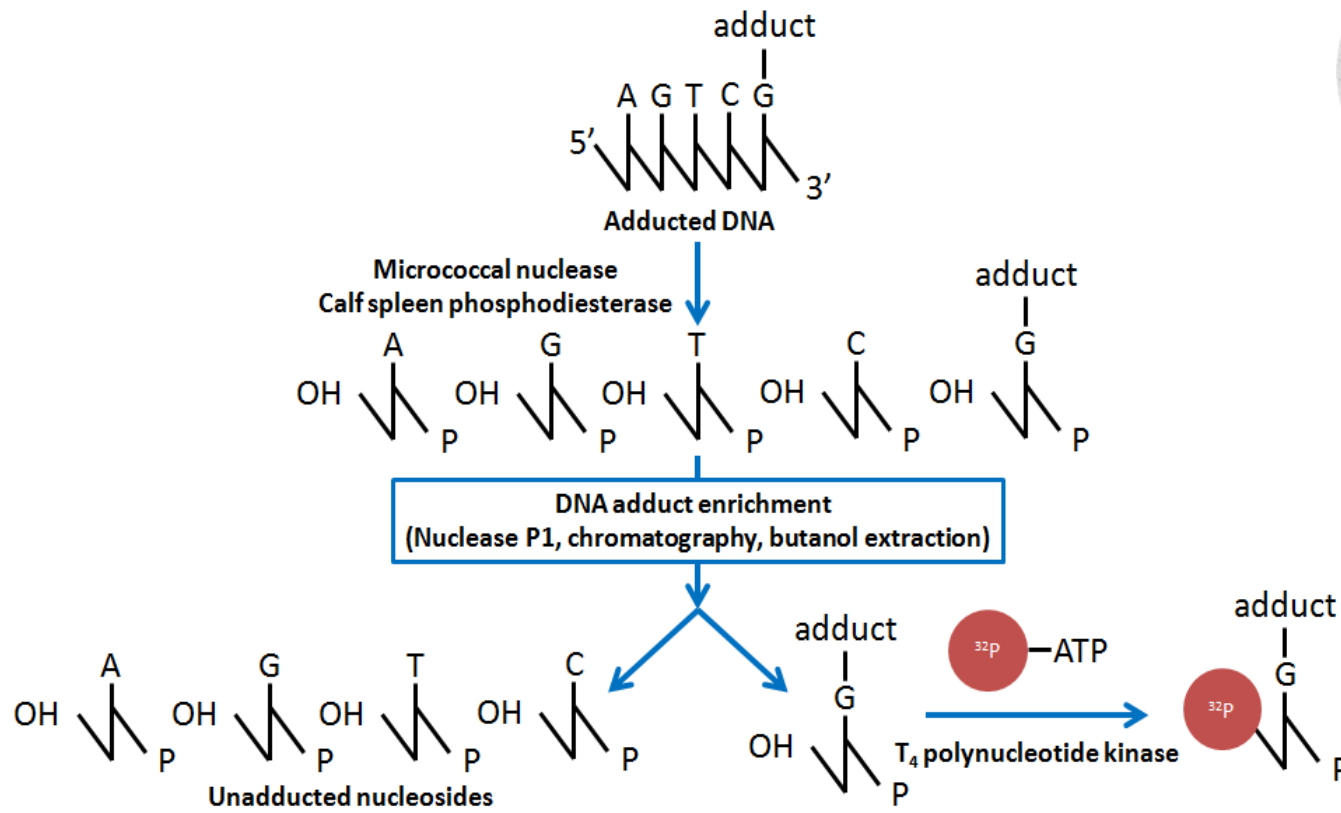


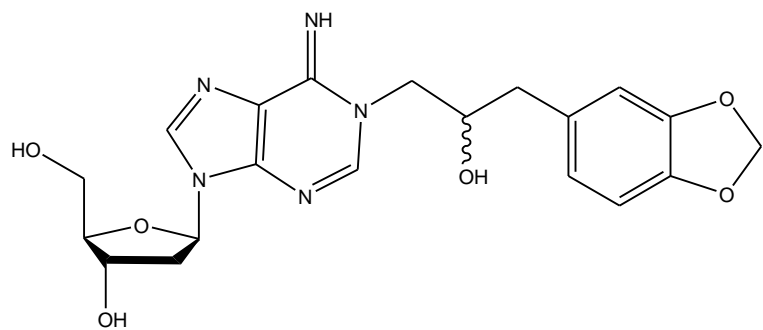
圖 五、DNA 被破壞與基因突變及癌症關係

(Chen and Hong 2001)

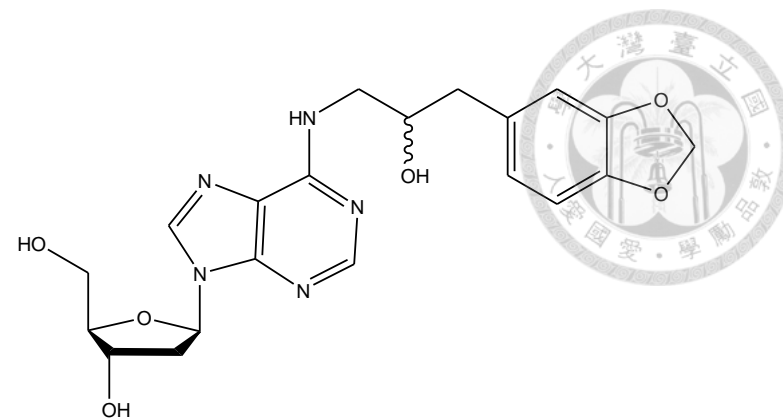


圖六、<sup>32</sup>P-後標籤法(<sup>32</sup>P-postlabeling)

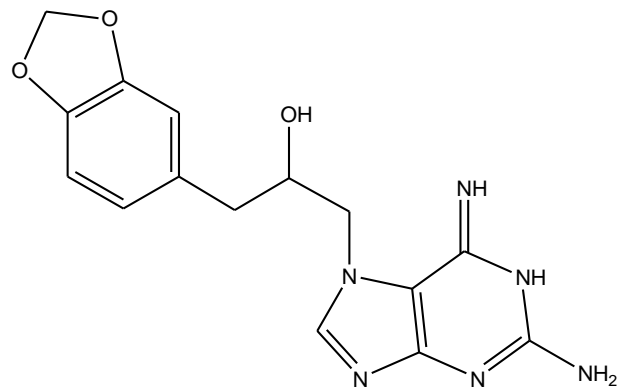
(Brown 2012)



(A)N1 $\gamma$ -SFO-dAdo

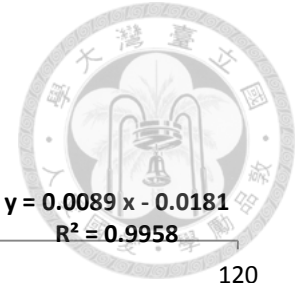


(B)N<sup>6</sup> $\gamma$ -SFO-dAdo

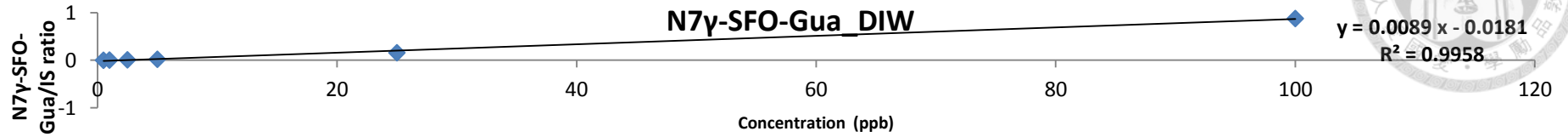


(B)N7 $\gamma$ -SFO-Gua

圖 七、SFO 的 DNA 共價鍵結物化學結構圖



(A)



(B)



(C)

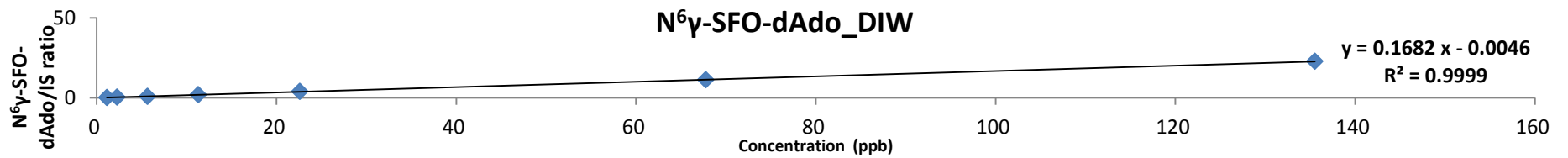
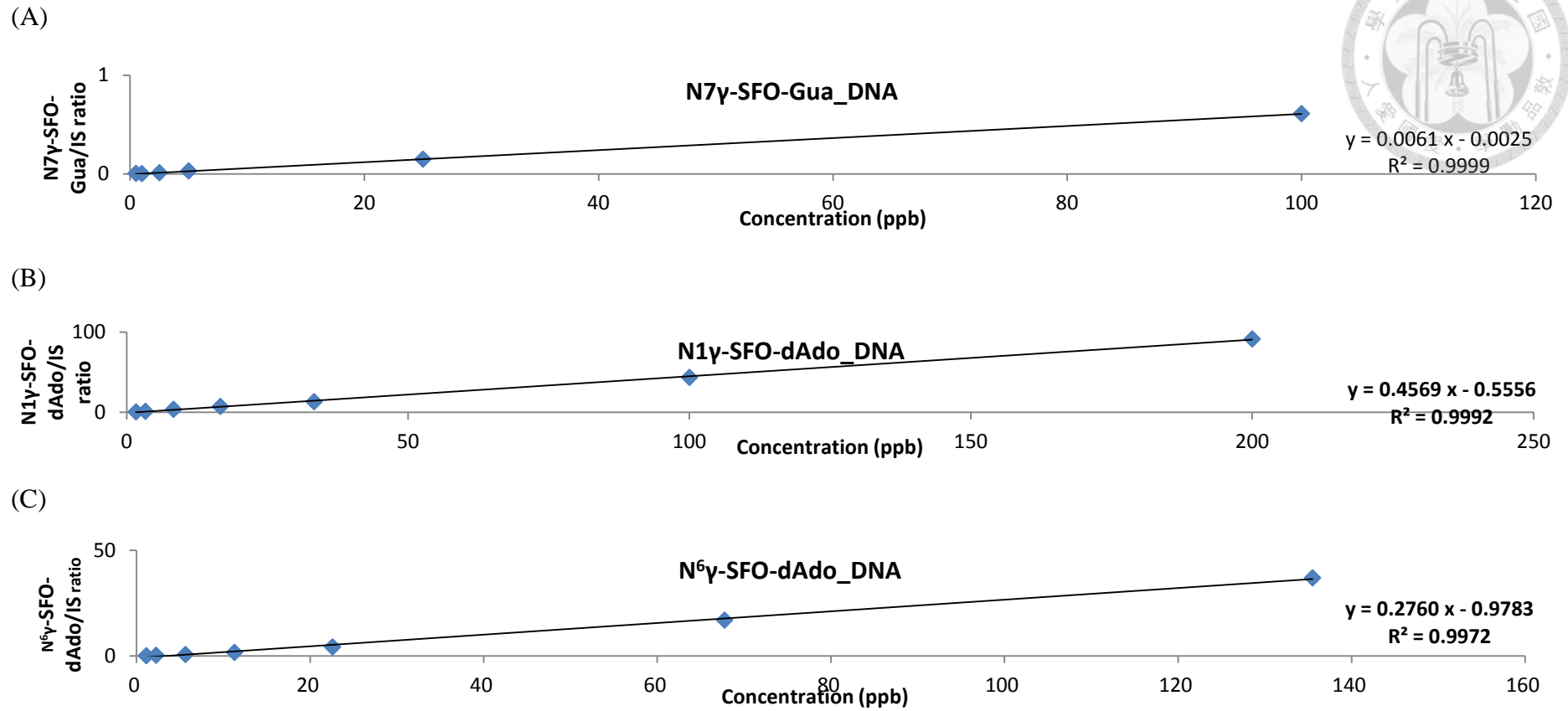


圖 八、去離子水配製之檢量線

(A)(B)(C)分別為 N7 $\gamma$ -SFO-Gua、N1 $\gamma$ -SFO-dAdo 與 N6 $\gamma$ -SFO-dAdo 之檢量線

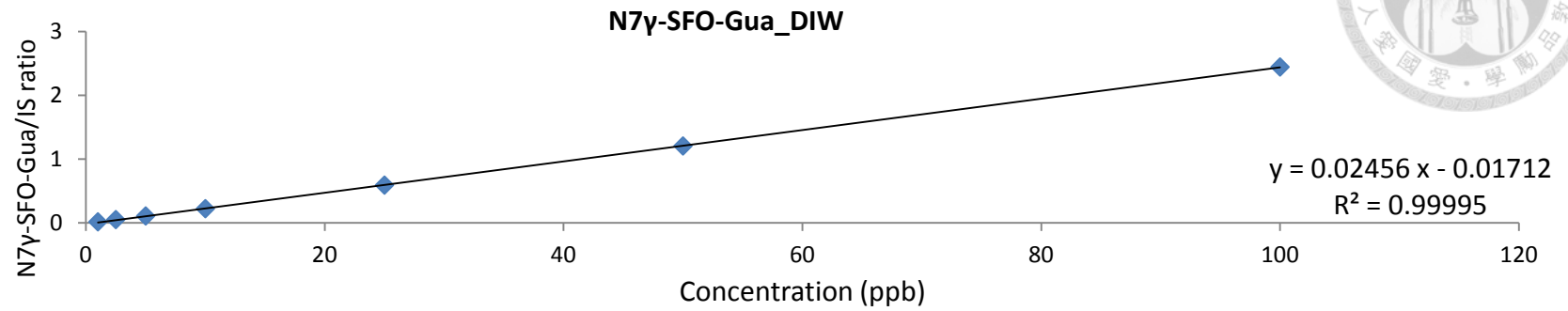


圖九、小鼠肝臟組織DNA基質中配製之檢量線

(A)(B)(C)分別為 N7 $\gamma$ -SFO-Gua、N1 $\gamma$ -SFO-dAdo 與 N6 $\gamma$ -SFO-dAdo 之檢量線



(A)



(B)

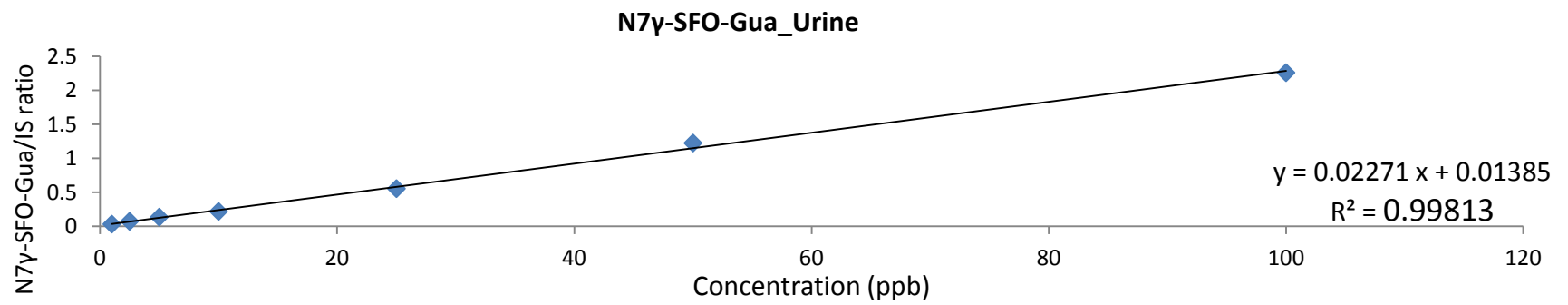
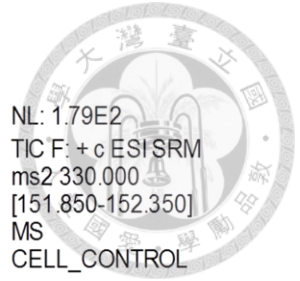


圖 十、尿液檢量線結果

(A) N7 $\gamma$ -SFO-Gua 在去離子水中配製之檢量線；(B)N7 $\gamma$ -SFO-Gua 在尿液基質中配製之檢量線



RT: 0.00 - 32.00 SM: 7B

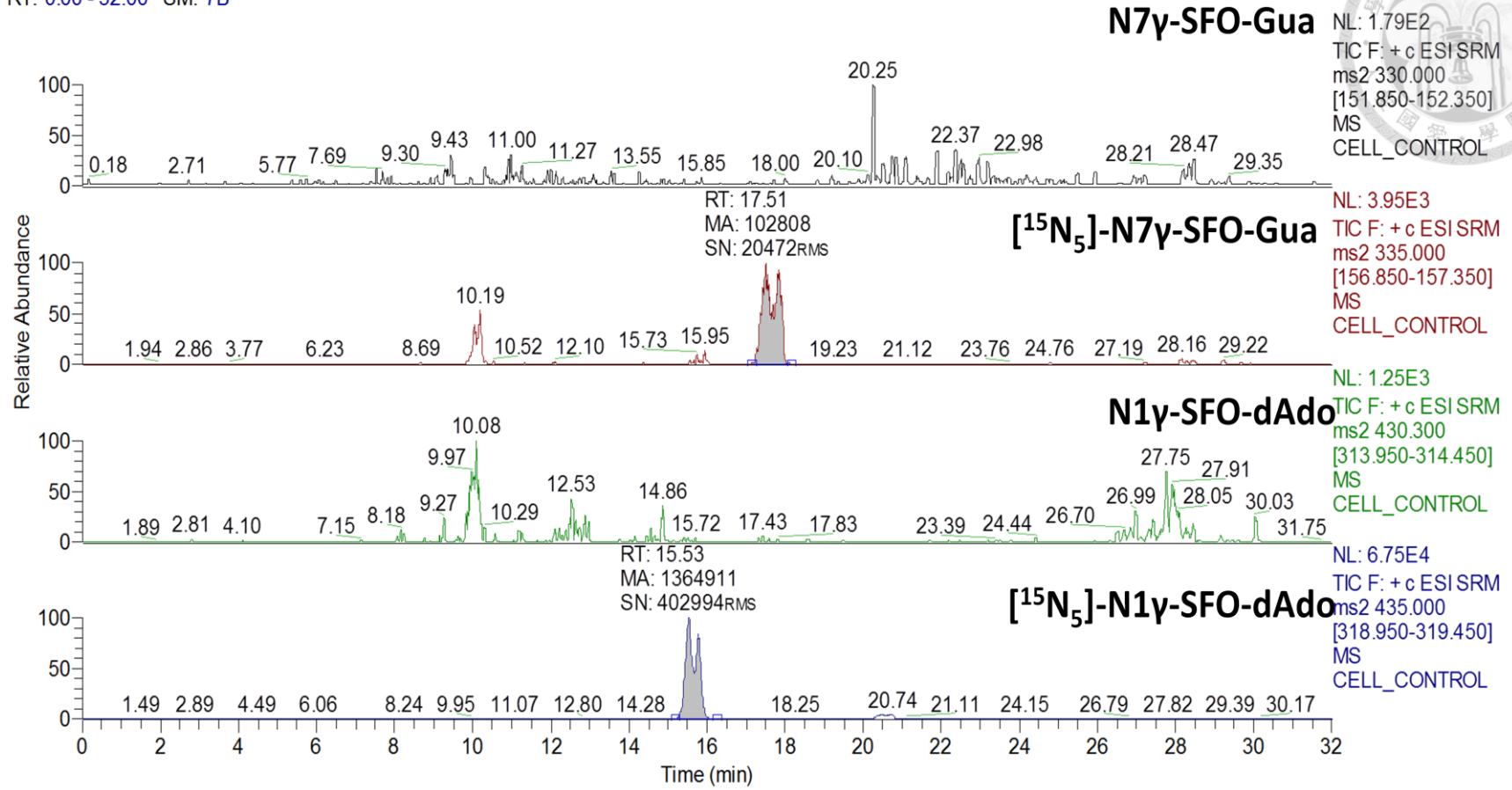


圖 十一、HepG2 肝癌細胞控制組





RT: 0.00 - 32.01 SM: 7B

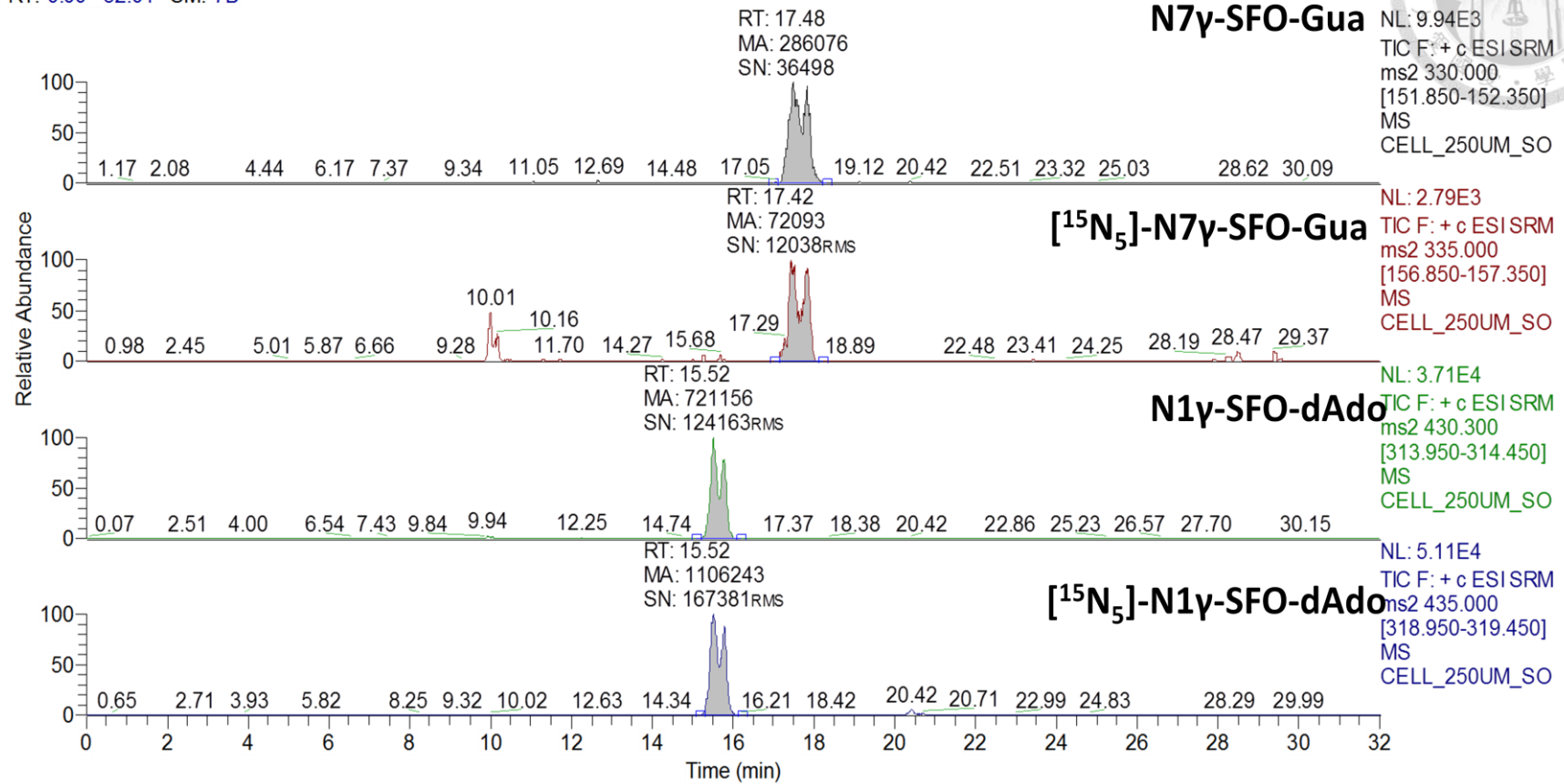


圖 十二、HepG2 肝癌細胞 250  $\mu$ M 環氧黃樟素暴露組



RT: 0.00 - 32.00 SM: 7B

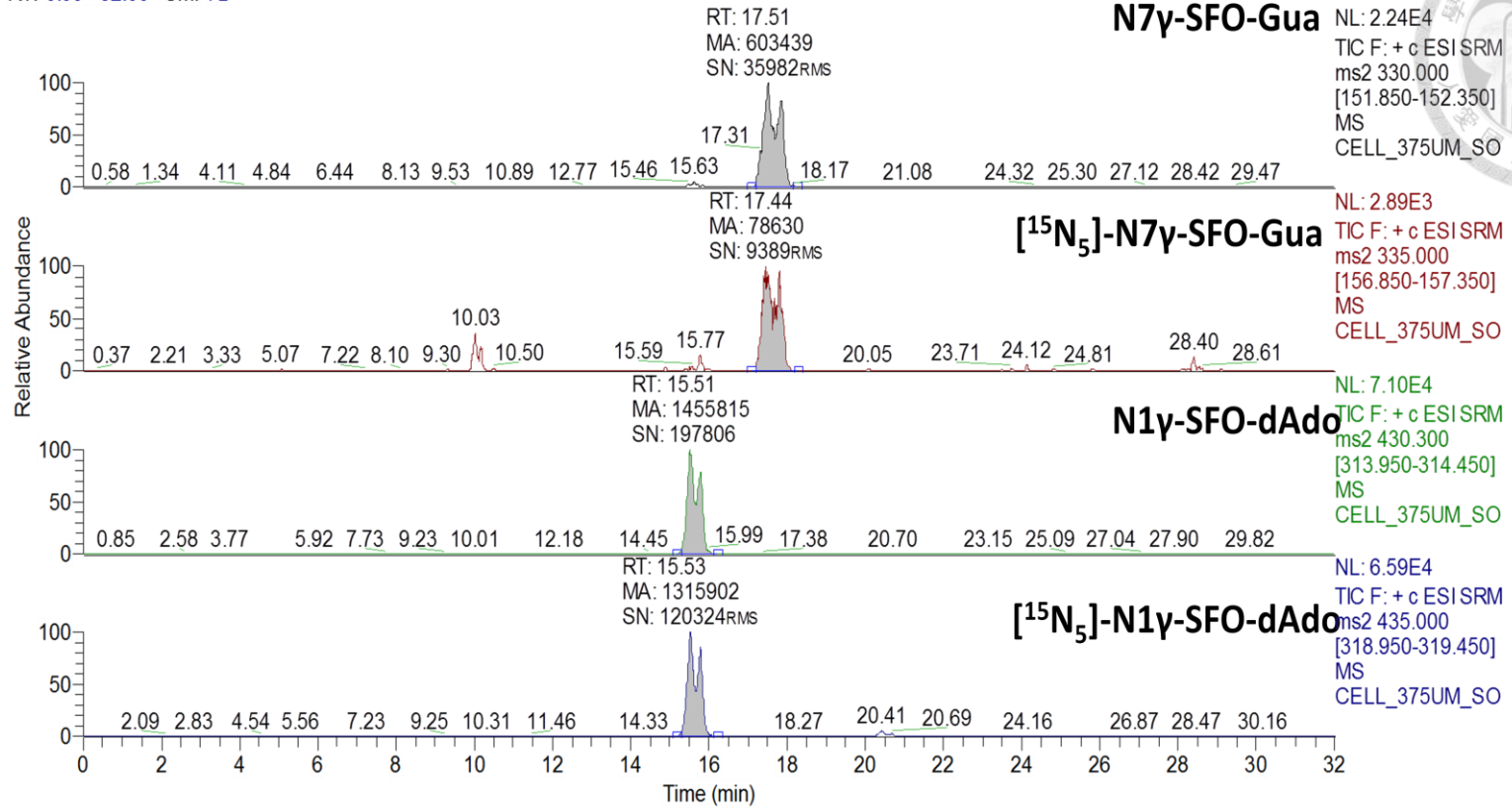


圖 十三、HepG2 肝癌細胞 375  $\mu$ M 環氧黃樟素暴露組

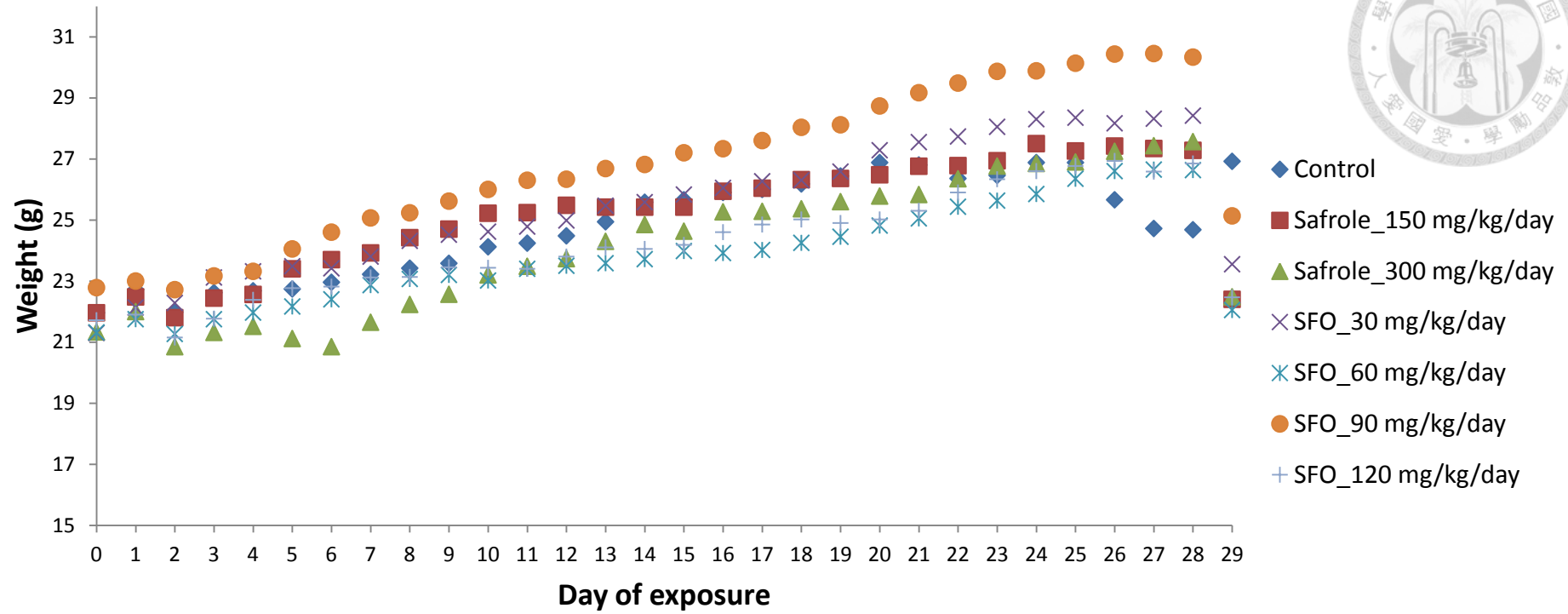


圖 十四、連續 28 天黃樟素與環氧黃樟素暴露後小鼠之平均體重變化情形

相對標準偏差(RSD)均低於 20 %

RT: 0.00 - 32.01 SM: 7B

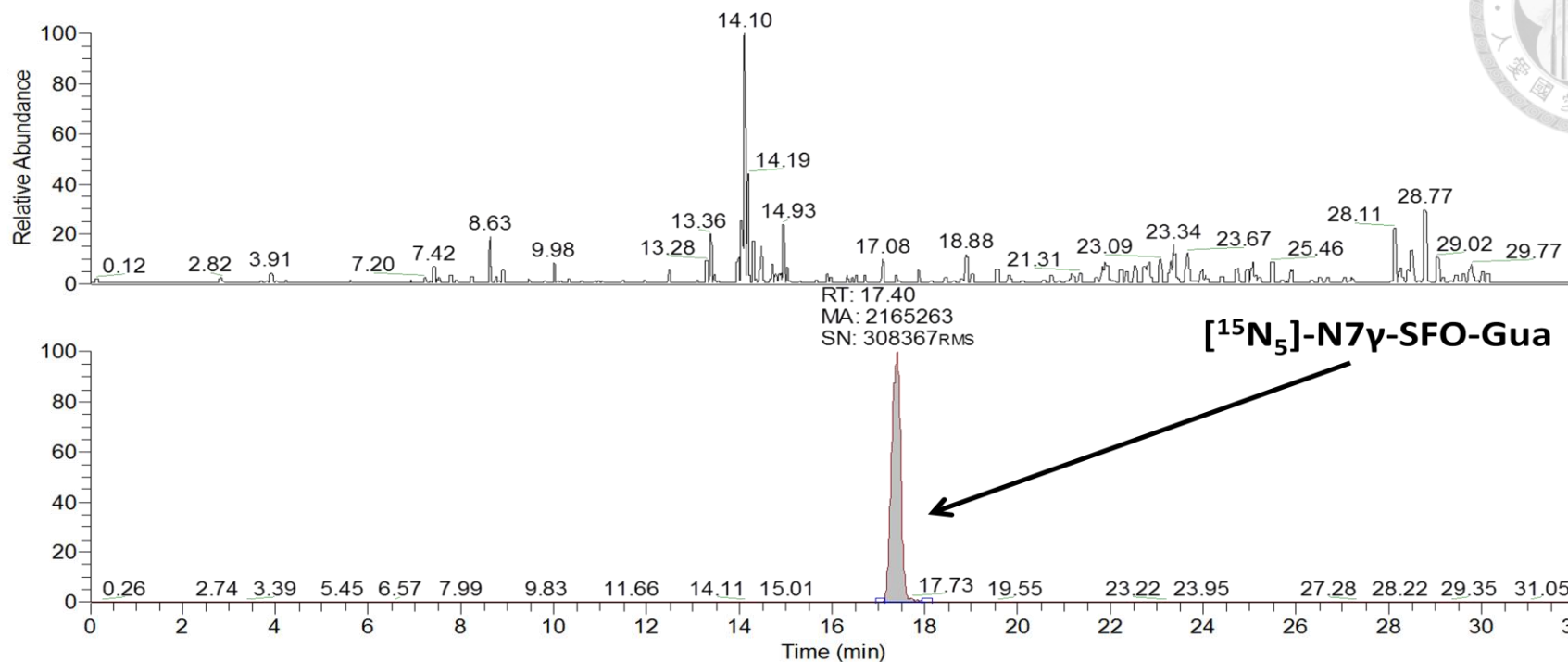
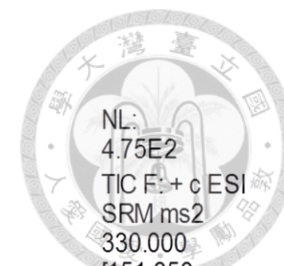
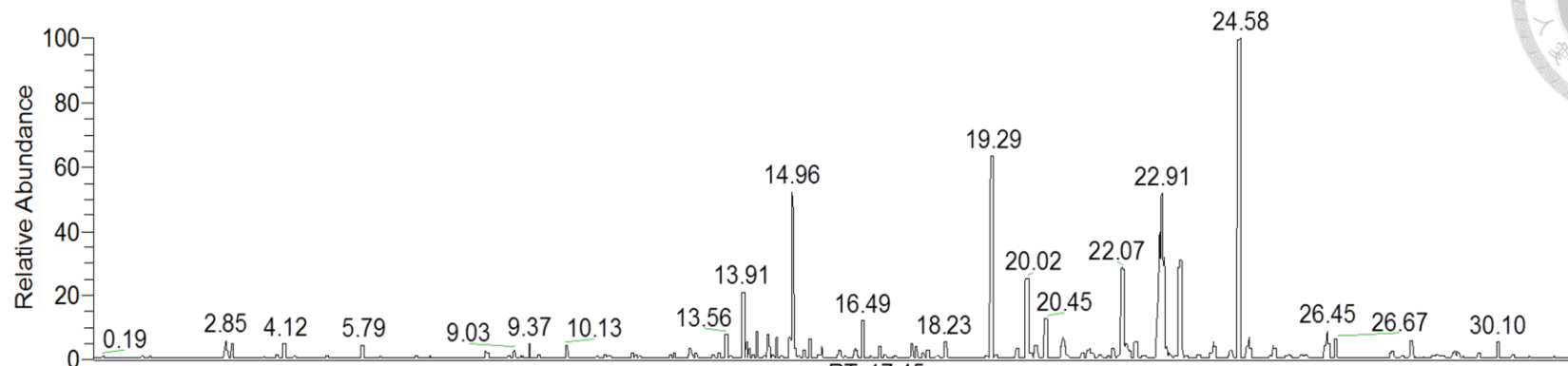


圖 十五、CD-1 小鼠肝臟 DNA 分析之控制組

RT: 0.00 - 32.01 SM: 7B



NL:  
4.75E2  
TIC F: + c ESI  
SRM ms2  
330.000  
[151.850-  
152.350] MS  
S150\_2



RT: 17.45  
MA: 1453564  
SN: 196360RMS

**[<sup>15</sup>N<sub>5</sub>]-N7γ-SFO-Gua**

NL:  
1.64E5  
TIC F: + c ESI  
SRM ms2  
335.000  
[156.850-  
157.350] MS  
S150\_2

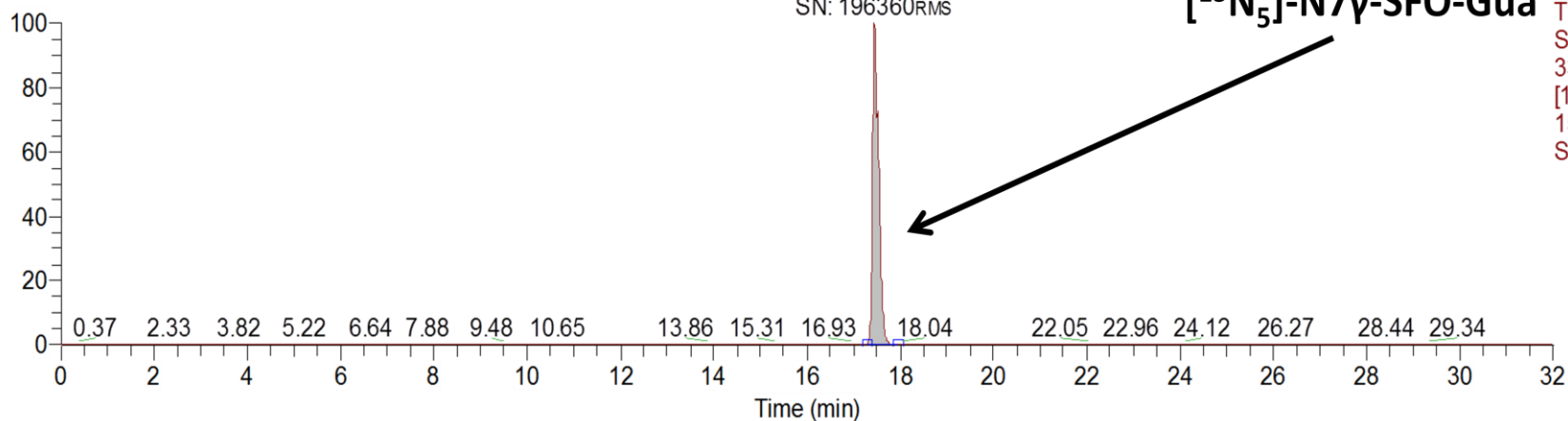
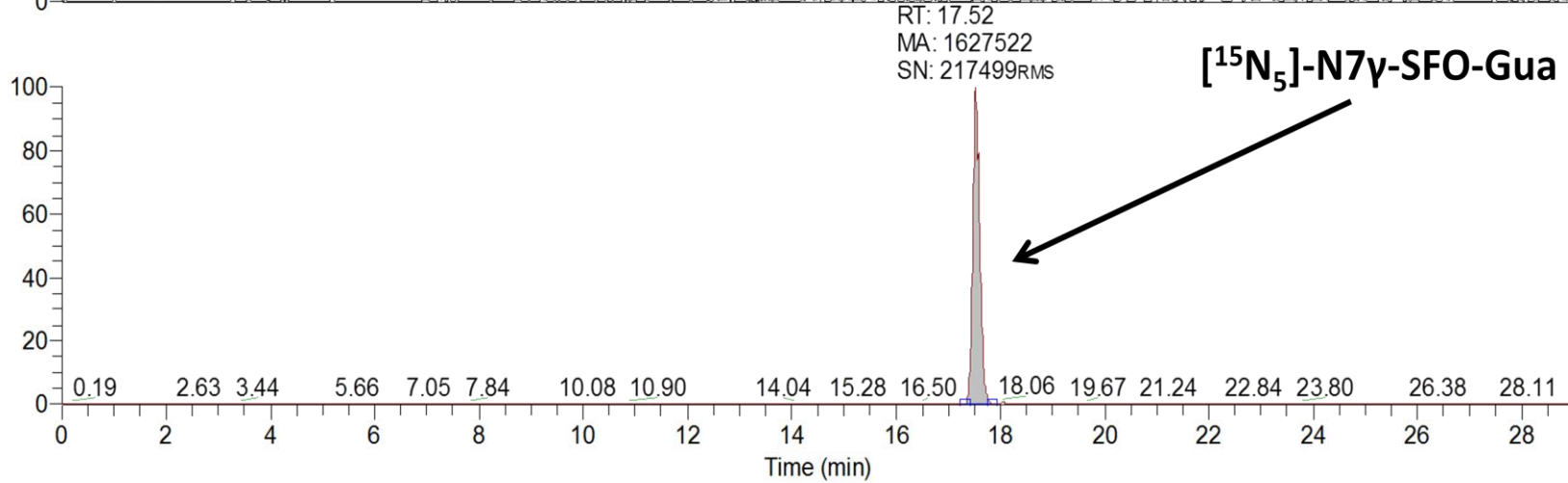
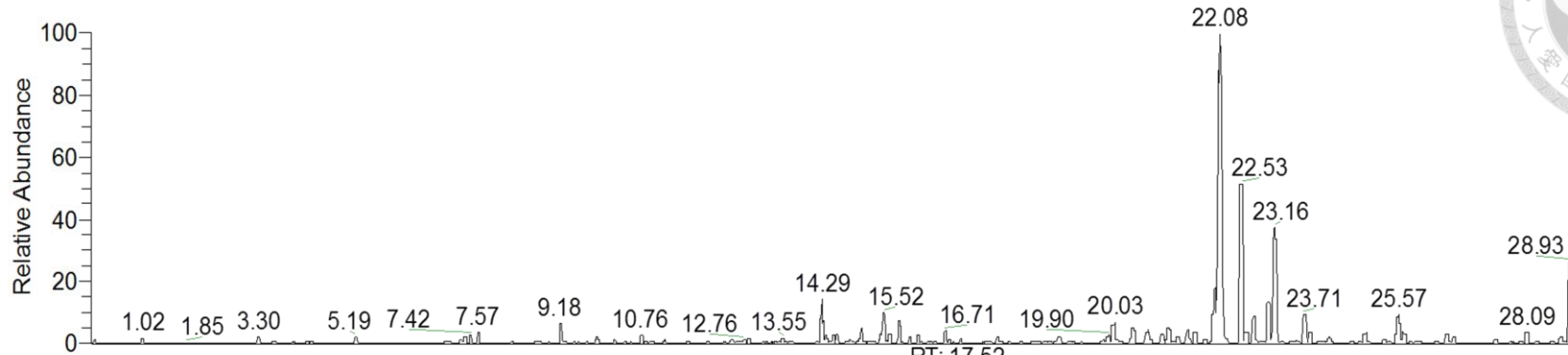
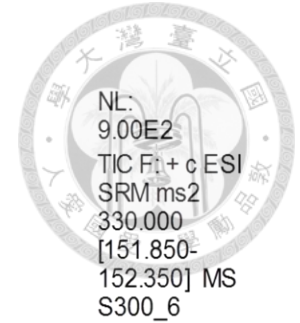


圖 十六、CD-1小鼠肝臟DNA分析之黃樟素150 mg/kg/day 暴露組

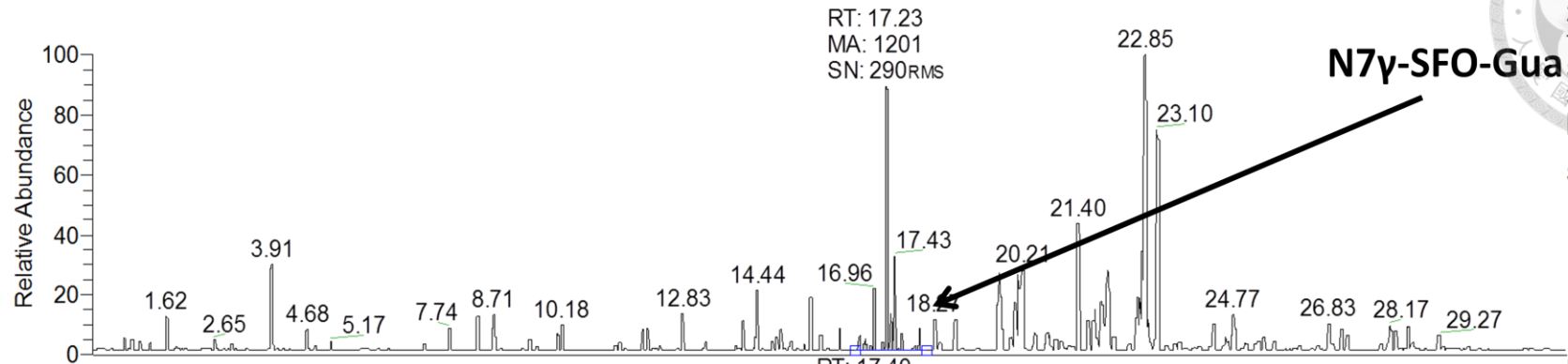
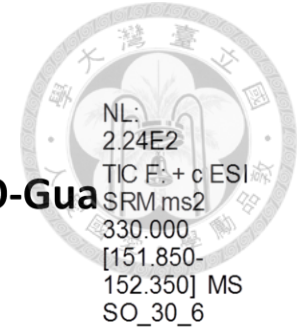
RT: 0.00 - 28.99 SM: 7B



NL: 1.75E5  
TIC F: + c ESI  
SRM ms2 335.000  
[156.850-157.350] MS  
S300\_6

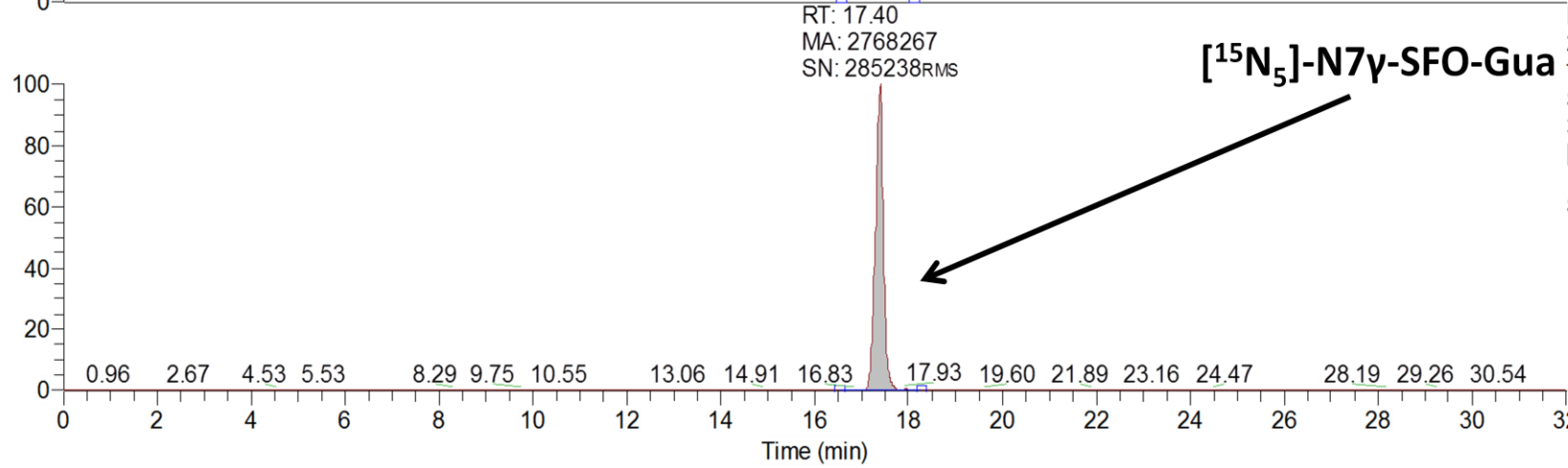
圖 十七、CD-1 小鼠肝臟 DNA 分析之黃樟素 300 mg/kg/day 暴露組

RT: 0.00 - 32.00 SM: 7B



**N7 $\gamma$ -SFO-Gua**

NL:  
2.24E2  
TIC F: + c ESI  
SRM.ms2  
330.000  
[151.850-  
152.350] MS  
SO\_30\_6



**[<sup>15</sup>N<sub>5</sub>]-N7 $\gamma$ -SFO-Gua**

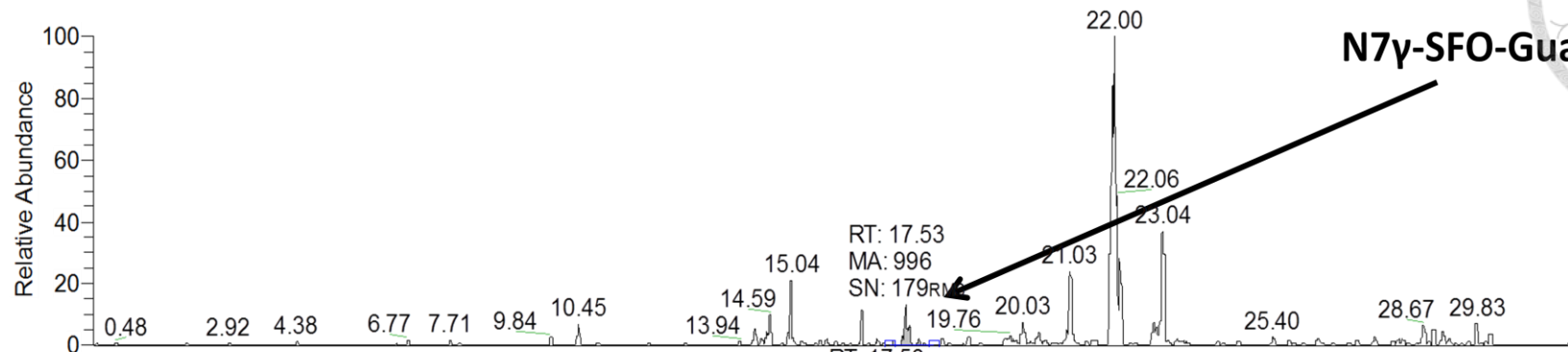
NL:  
2.32E5  
TIC F: + c ESI  
SRM.ms2  
335.000  
[156.850-  
157.350] MS  
SO\_30\_6

圖 十八、CD-1 小鼠肝臟 DNA 分析之環氧黃樟素 30 mg/kg/day 暴露組

RT: 0.00 - 32.00 SM: 7B



NL:  
1.16E3  
TIC F: + c ESI  
SRM ms2  
330.000  
[151.850-  
152.350] MS  
SO\_60\_2



NL:  
2.10E5  
TIC F: + c ESI  
SRM ms2  
335.000  
[156.850-  
157.350] MS  
SO\_60\_2

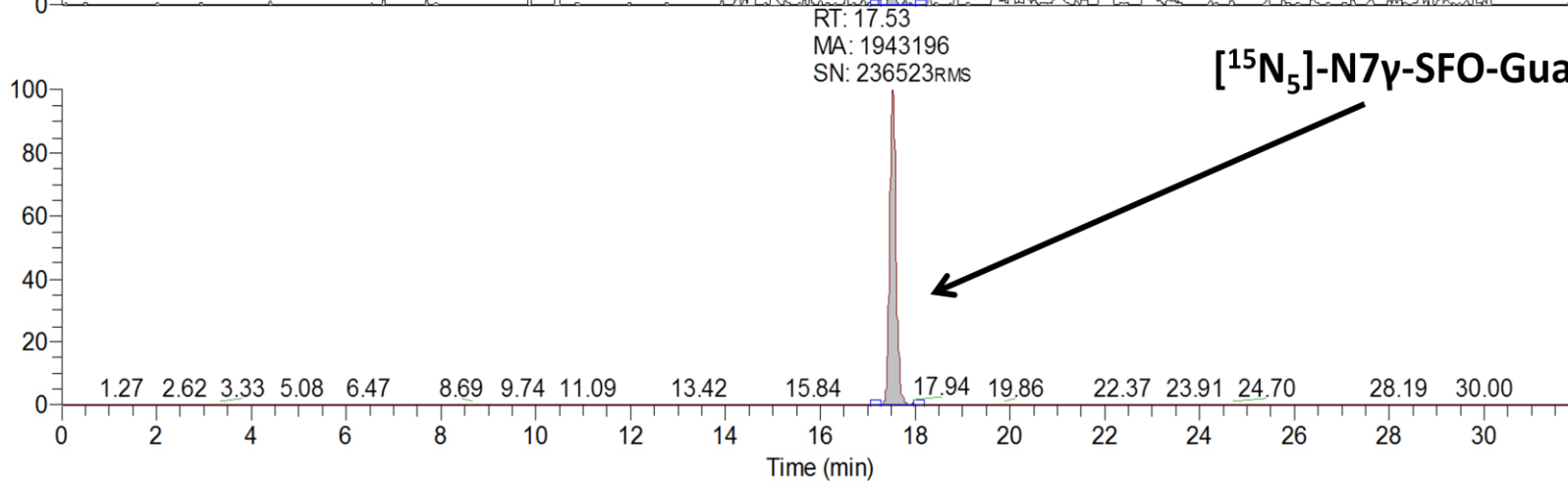


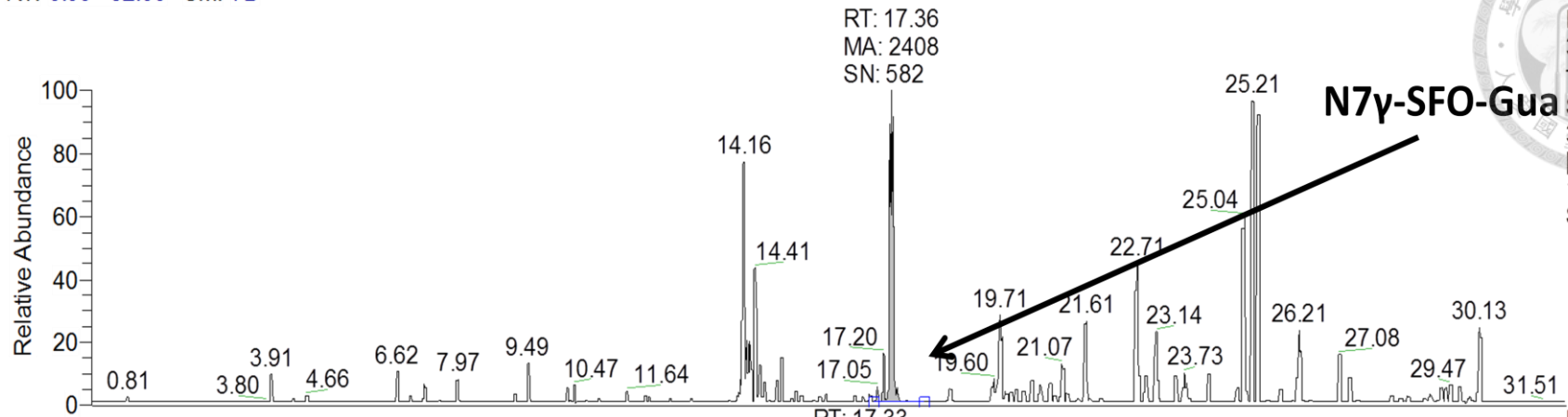
圖 十九、CD-1小鼠肝臟DNA分析之環氧黃樟素60 mg/kg/day 暴露組



RT: 0.00 - 32.00 SM: 7B



NL: 3.82E2  
TIC F: + c ESI  
SRM ms2  
330.000  
[151.850-  
152.350] MS  
SO\_90\_3



RT: 17.36  
MA: 2408  
SN: 582

**N7γ-SFO-Gua**

RT: 17.33  
MA: 2142809  
SN: 291342RMS

**[<sup>15</sup>N<sub>5</sub>]-N7γ-SFO-Gua**

NL: 1.98E5  
TIC F: + c ESI  
SRM ms2  
335.000  
[156.850-  
157.350] MS  
SO\_90\_3

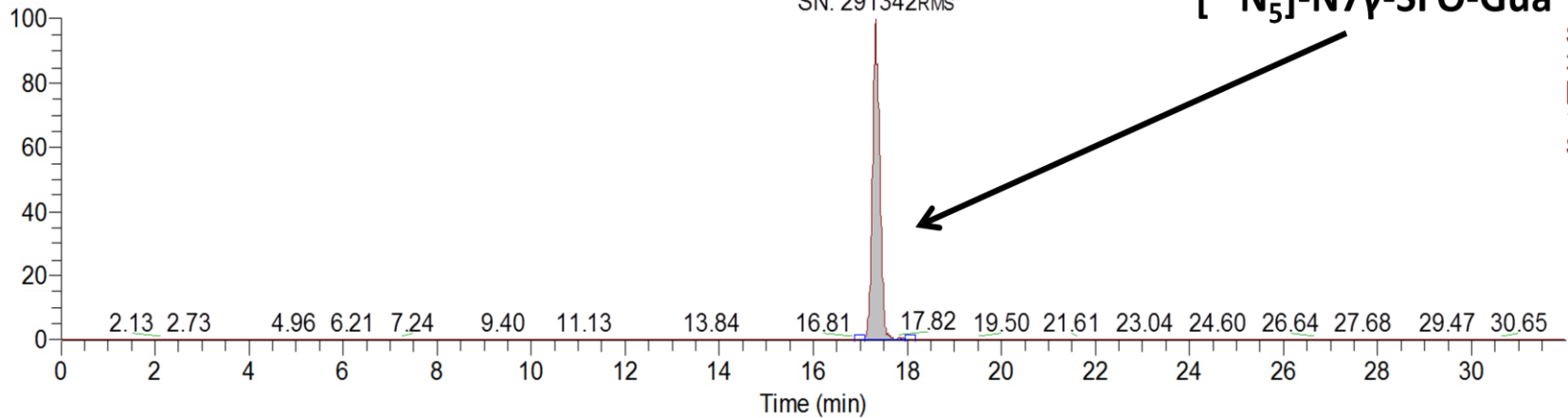
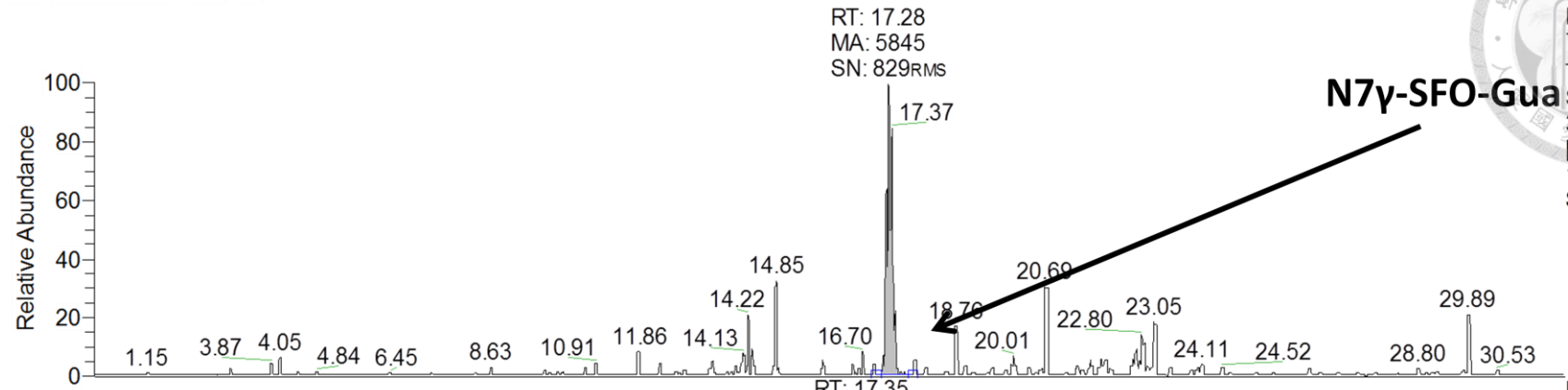


圖 二十、CD-1 小鼠肝臟 DNA 分析之環氧黃樟素 90 mg/kg/day 暴露組

RT: 0.00 - 32.00 SM: 7B

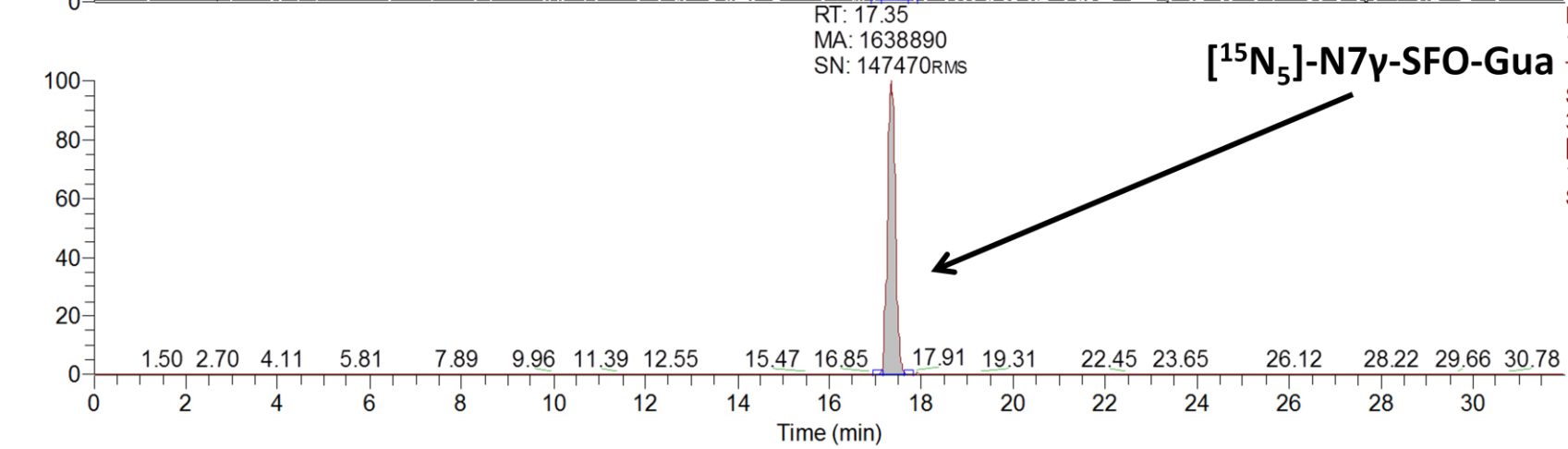


NL:  
7.12E2  
TIC F: + c ESI  
SRM ms2  
330.000  
[151.850-  
152.350] MS  
SO\_120\_3



RT: 17.28  
MA: 5845  
SN: 829RMS

**N7γ-SFO-Gua**



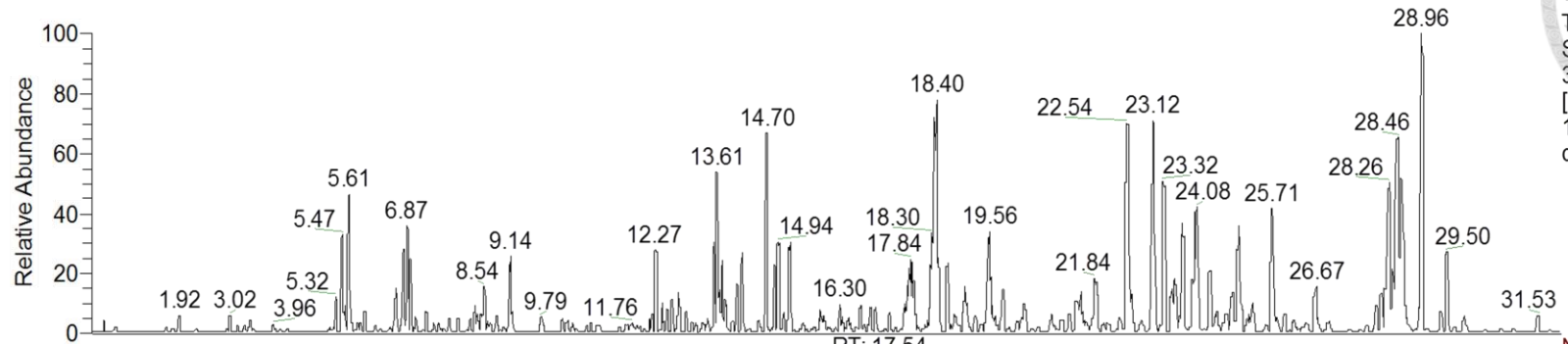
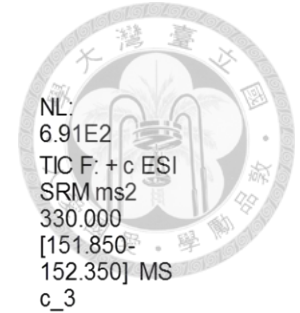
RT: 17.35  
MA: 1638890  
SN: 147470RMS

**[<sup>15</sup>N<sub>5</sub>]-N7γ-SFO-Gua**

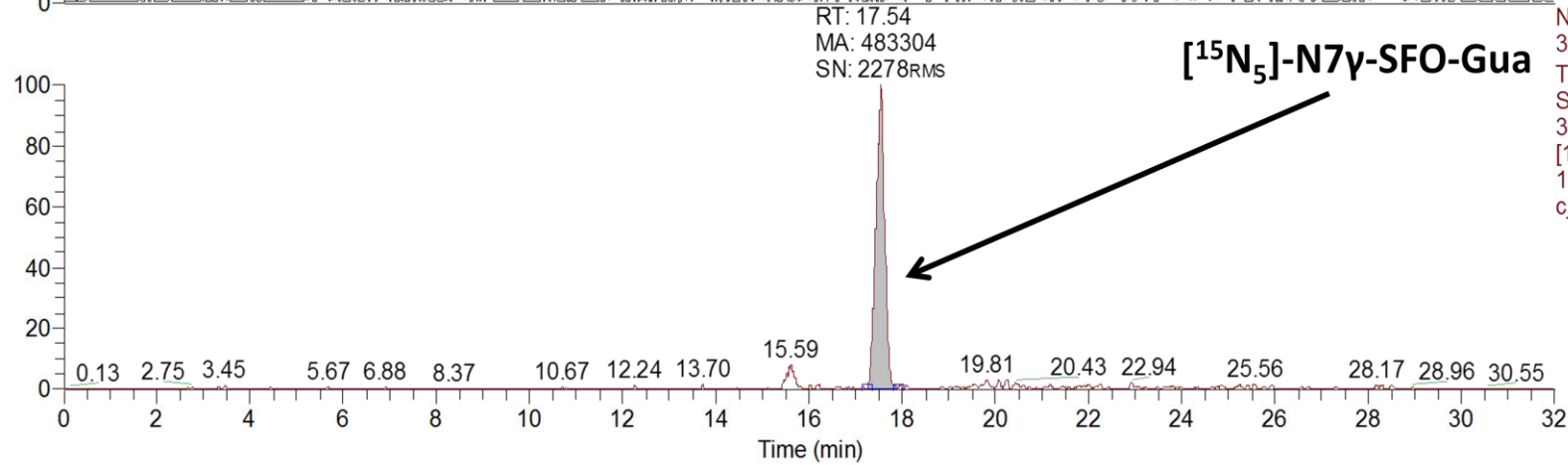
NL:  
1.36E5  
TIC F: + c ESI  
SRM ms2  
335.000  
[156.850-  
157.350] MS  
SO\_120\_3

圖 二十一、CD-1小鼠肝臟DNA分析之環氧黃樟素120 mg/kg/day 暴露組

RT: 0.00 - 32.00 SM: 7B



NL:  
6.91E2  
TIC F: +c ESI  
SRM ms2  
330.000  
[151.850-  
152.350] MS  
c\_3



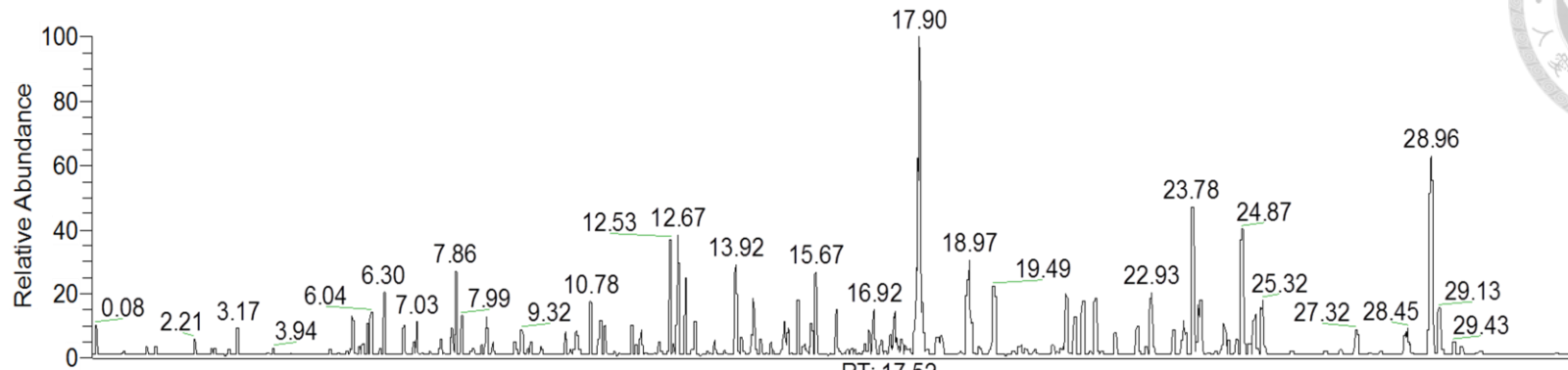
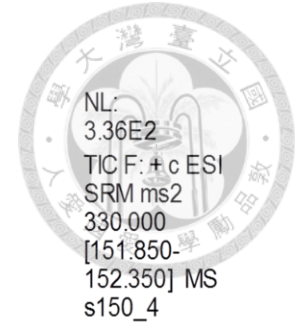
RT: 17.54  
MA: 483304  
SN: 2278RMS

**[<sup>15</sup>N<sub>5</sub>]-N7γ-SFO-Gua**

NL:  
3.75E4  
TIC F: +c ESI  
SRM ms2  
335.000  
[156.850-  
157.350] MS  
c\_3

圖 二十二、CD-1 小鼠尿液分析之控制組

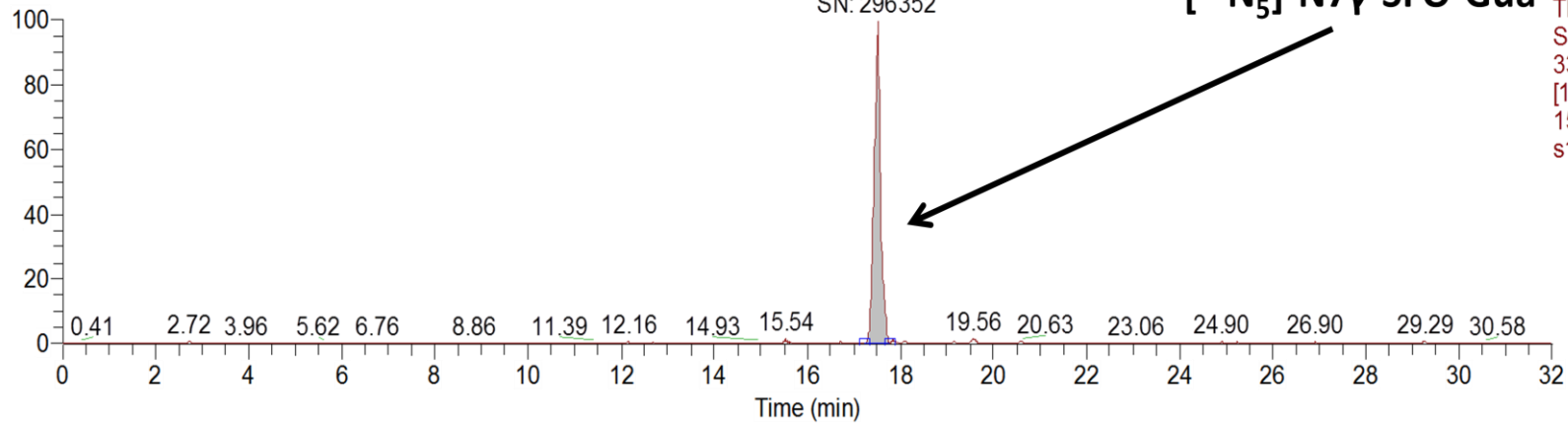
RT: 0.00 - 32.00 SM: 7B



RT: 17.52  
MA: 543504  
SN: 296352

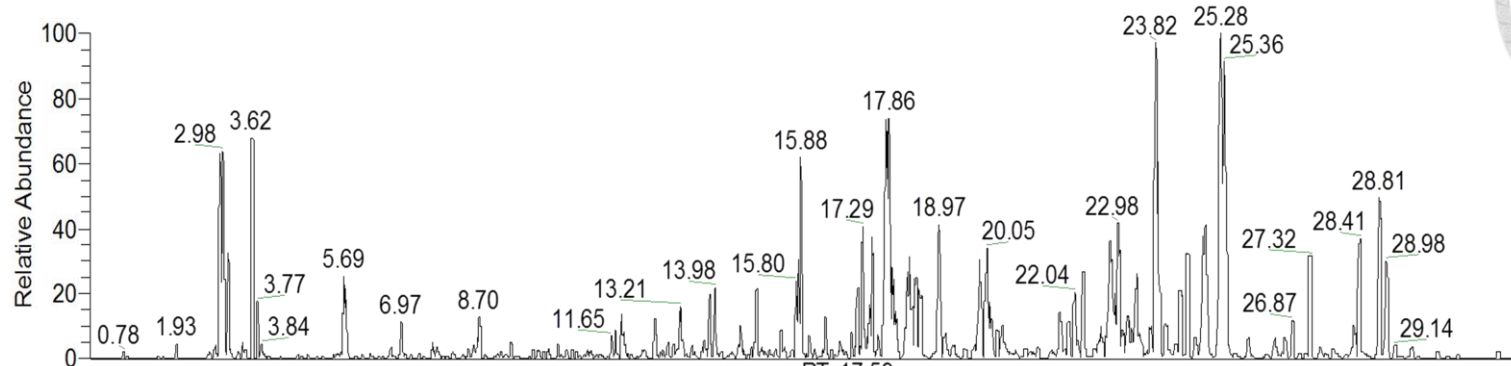
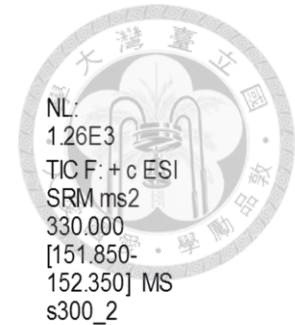
**[<sup>15</sup>N<sub>5</sub>]-N7γ-SFO-Gua**

NL: 5.72E4  
TIC F: + c ESI  
SRM ms2 335.000  
[156.850-157.350] MS  
s150\_4

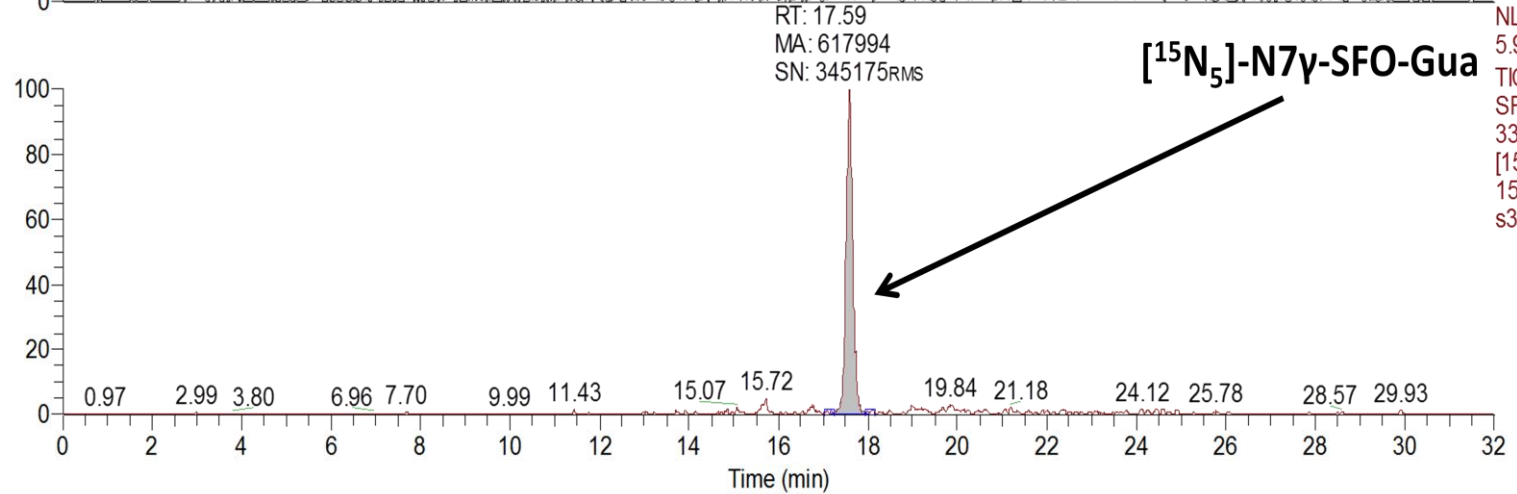


圖二十三、CD-1 小鼠尿液分析之黃樟素 150 mg/kg/day 暴露組

RT: 0.00 - 32.00 SM: 7B



NL:  
1.26E3  
TIC F: + c ESI  
SRM ms2  
330.000  
[151.850-  
152.350] MS  
s300\_2

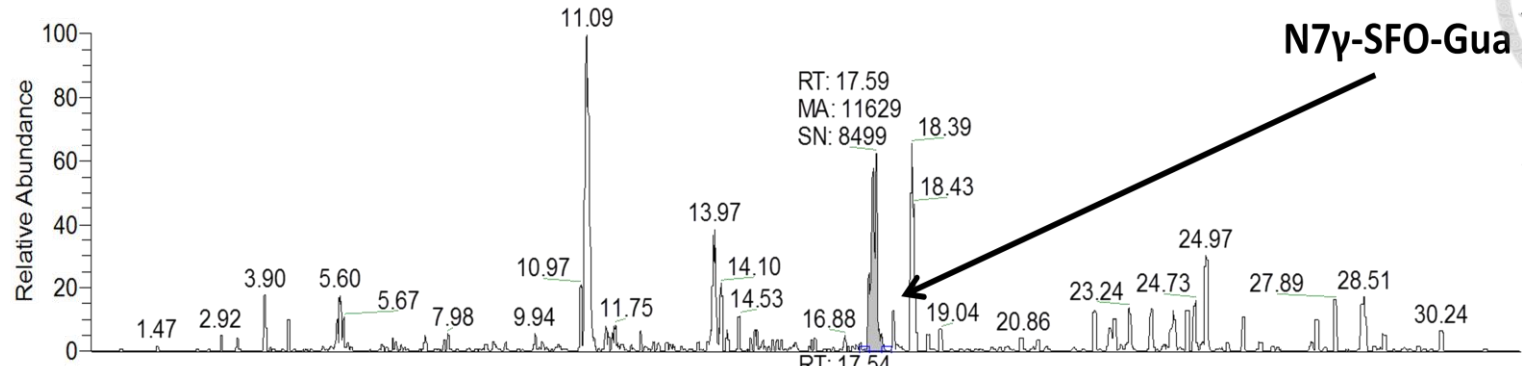


**[<sup>15</sup>N<sub>5</sub>]-N7γ-SFO-Gua**

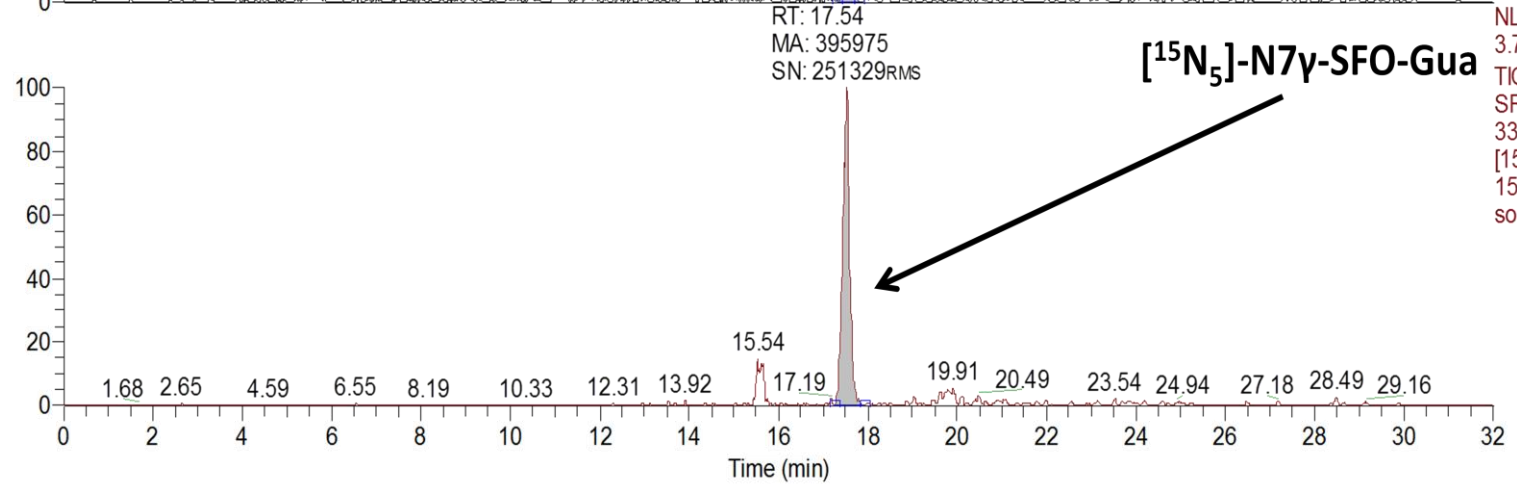
NL:  
5.90E4  
TIC F: + c ESI  
SRM ms2  
335.000  
[156.850-  
157.350] MS  
s300\_2

圖 二十四、CD-1 小鼠尿液分析之黃樟素 300 mg/kg/day 暴露組

RT: 0.00 - 32.01 SM: 7B



NL:  
2.04E3  
TIC F: + c ESI  
SRM ms2  
330.000  
[151.850-  
152.350] MS  
so30\_4



NL:  
3.71E4  
TIC F: + c ESI  
SRM ms2  
335.000  
[156.850-  
157.350] MS  
so30\_4

圖 二十五、CD-1 小鼠尿液分析之環氧黃樟素 30 mg/kg/day 暴露組

(D)

RT: 0.00 - 32.01 SM: 7B

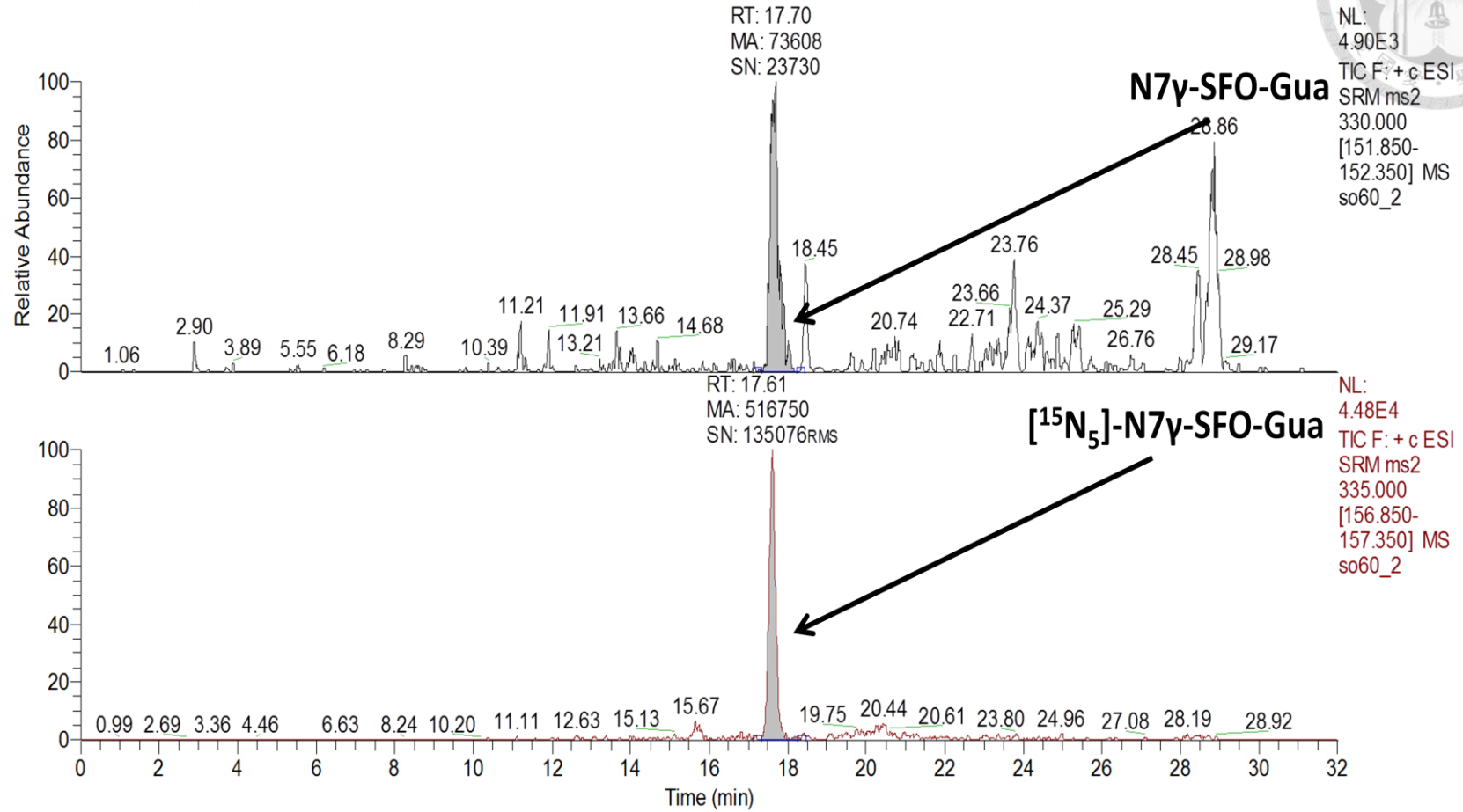


圖 二十六、CD-1 小鼠尿液分析之環氧黃樟素 60 mg/kg/day 暴露組

RT: 0.00 - 32.00 SM: 7B

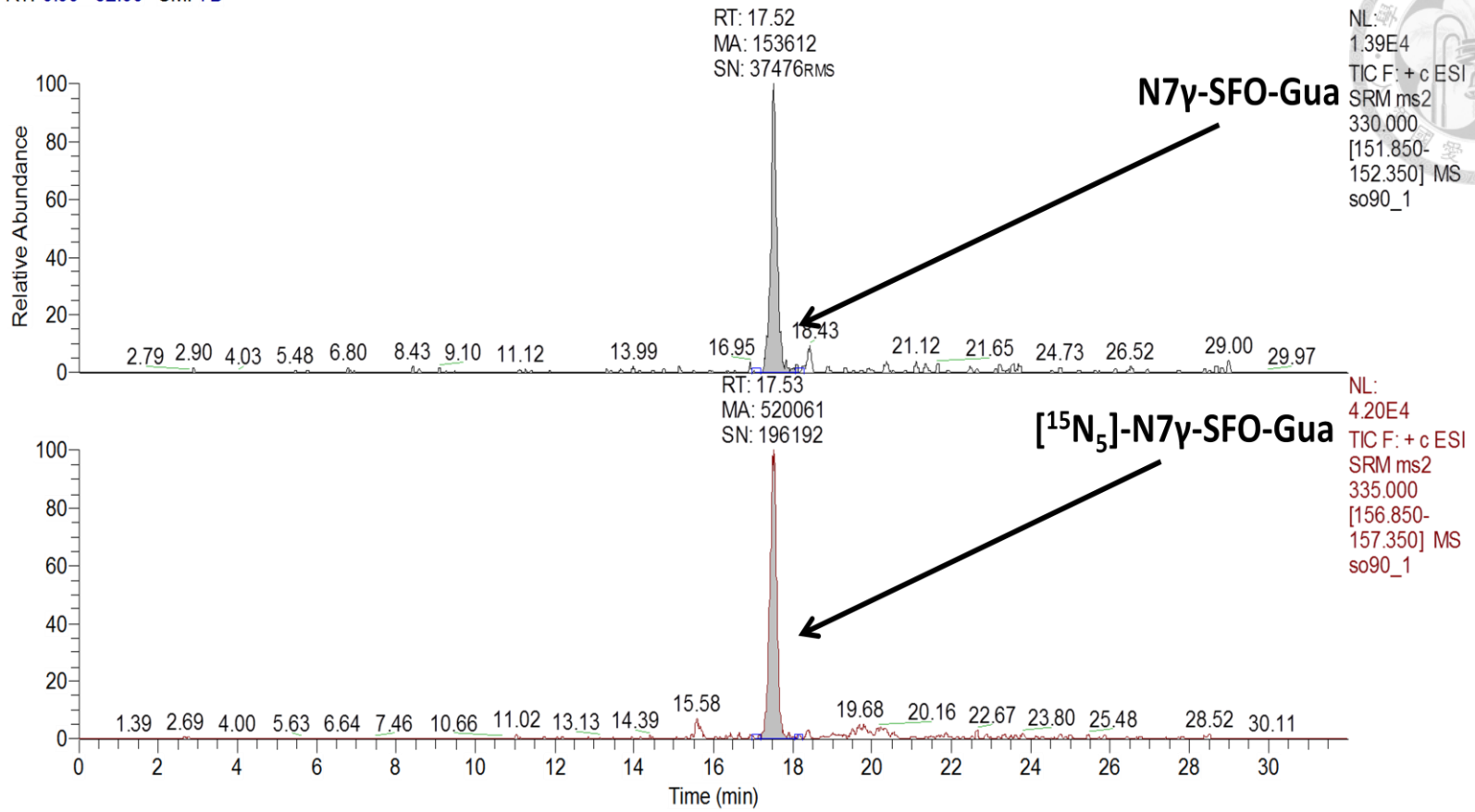


圖 二十七、CD-1 小鼠尿液分析之環氧黃樟素 90 mg/kg/day 暴露組



RT: 0.00 - 32.00 SM: 7B

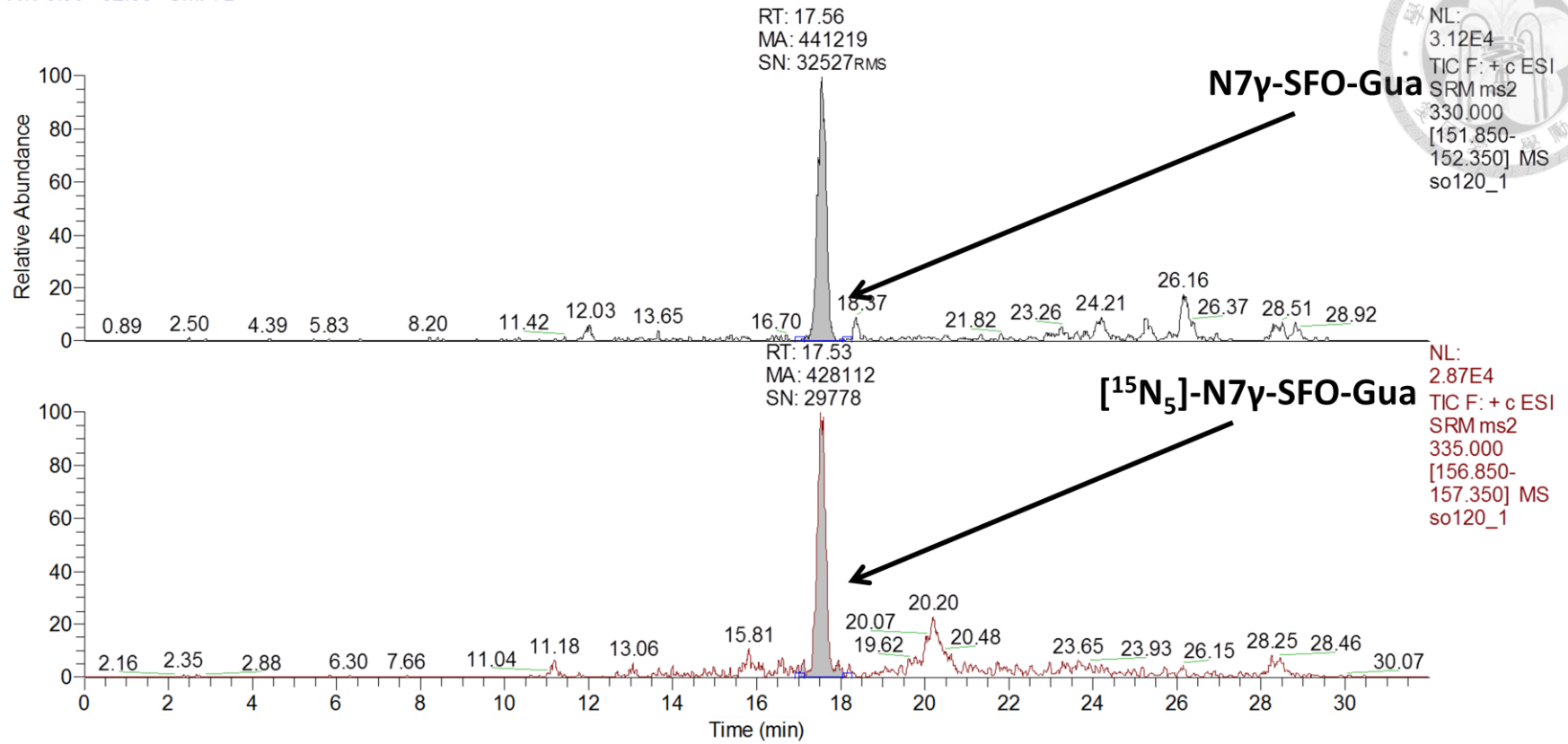


圖 二十八、CD-1 小鼠尿液分析之環氧黃樟素 120 mg/kg/day 暴露組

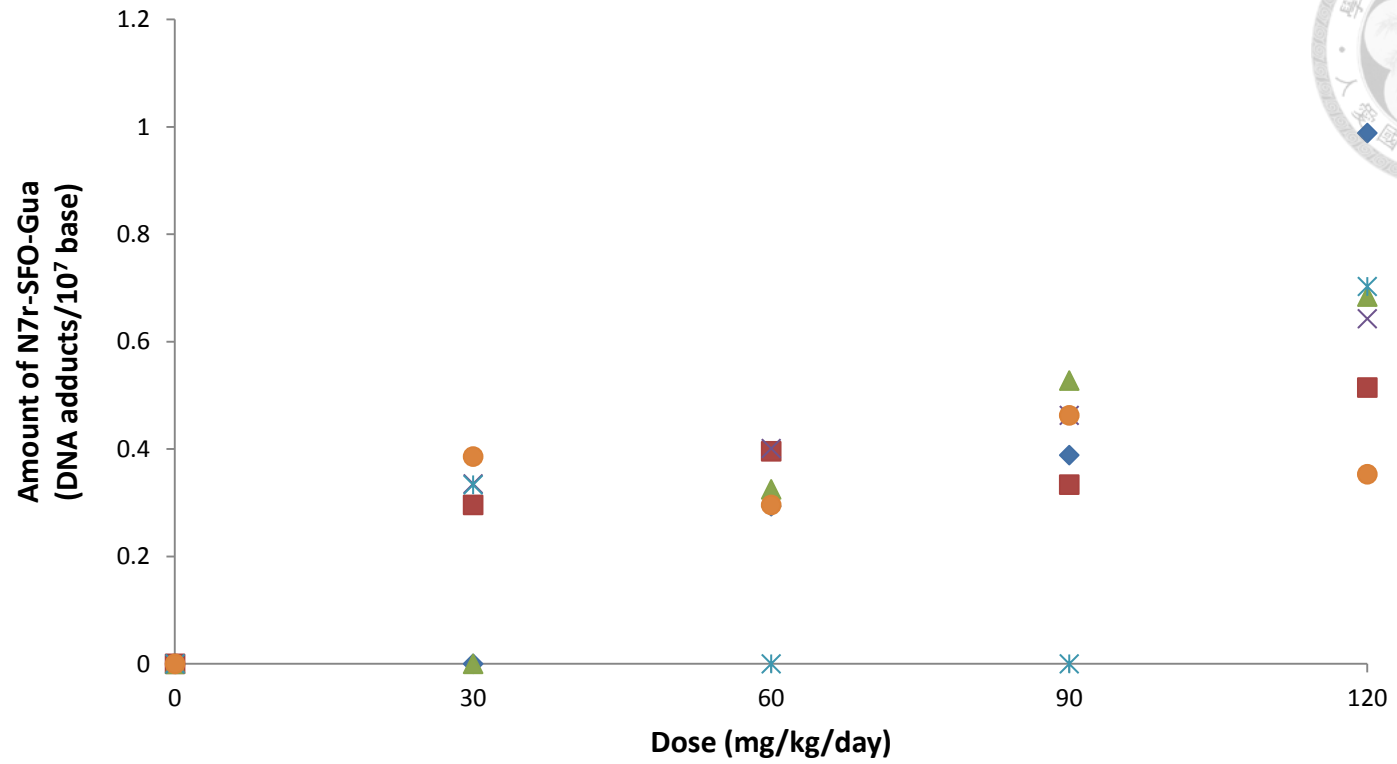


圖 二十九、暴露環氧黃樟素後小鼠肝臟組織 N7 $\gamma$ -SFO-Gua DNA 共價鍵結物濃度

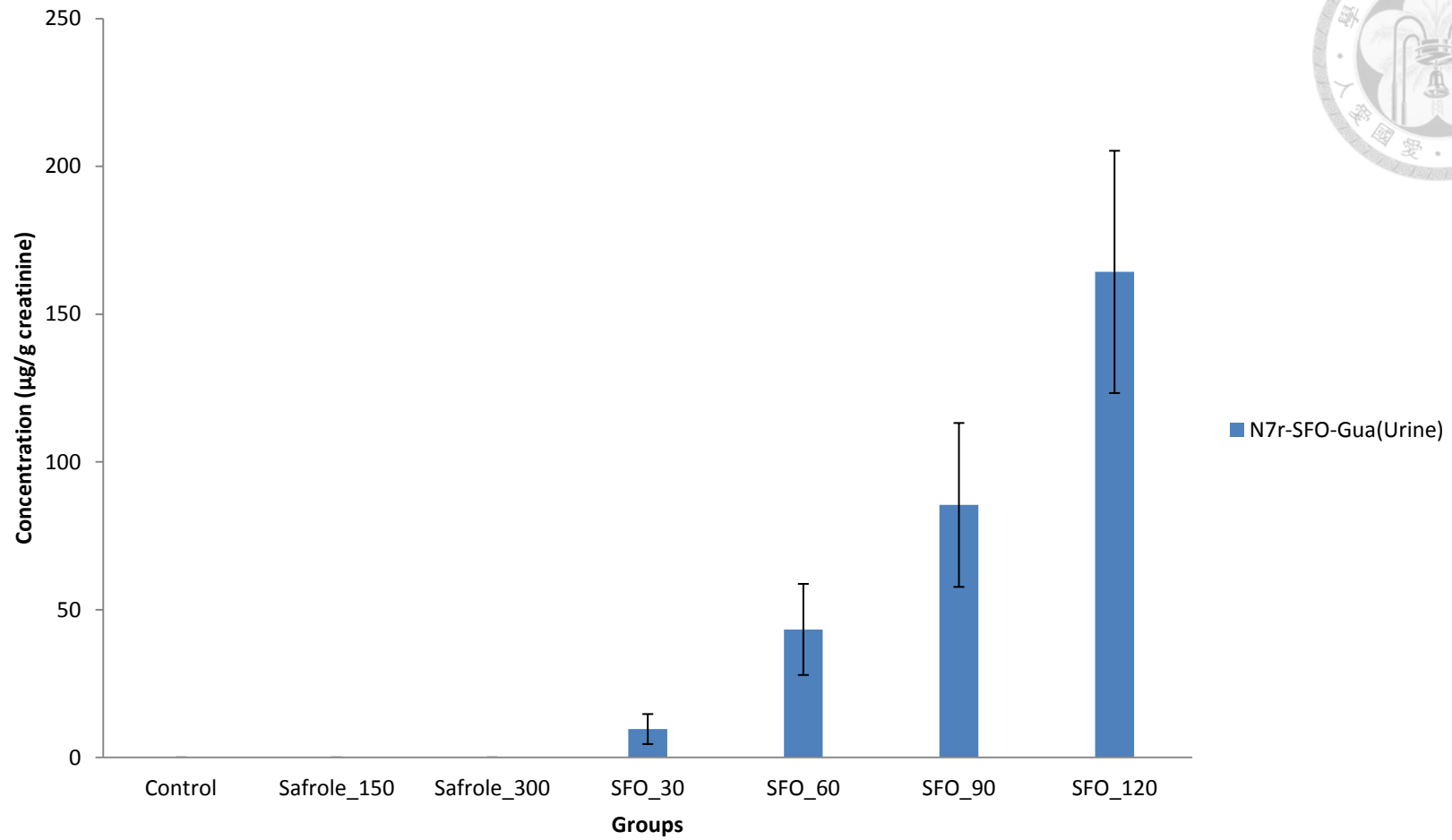


圖 三十、尿液 N7 $\gamma$ -SFO-Gua 分析結果長條圖



表一、DNA 鹼基上不同親核位置之相對反應性

(Boysen, Pachkowski et al. 2009)(沈, 2012)

<b>Chemical carcinogens</b>	<b>N7-Gua</b>	<b>O<sup>6</sup>-Gua</b>	<b>N<sup>2</sup>-Gua</b>	<b>N3-Ade</b>	<b>N1/N<sup>6</sup> Ade</b>	<b>N3-Cyt</b>	<b>N<sup>4</sup>-Cyt</b>
Propylene oxide	100	0.6	-	4.4/10	3.5	2	-
Ethylene oxide	100	-	-	10	10	1	-
Butadiene oxide	100	-	-	15	25	1.5	2
Styrene oxide	100	-	4.5	10	16	5	-
Safrole oxide	100	-	-	24.7	81.3	-	-



表 二、DNA 共價鍵結物定量方法之比較

(Brown 2012)

Method	Maximum sensitivity (adducts/nucleotide)	DNA required ( $\mu\text{g}$ )	Advantages	Limitation
<b>HPLC-ECD/fluorescence</b>	$\sim 1/10^8$	1-100	Simplicity	Only fluorescent/electrochemically active adducts, standards required
<b>Immunoassay</b>	$\sim 1/10^8$	1-200	Specificity, localisation of adducts	Antibodies needed, cross-reactivity
<b><math>^{32}\text{P}</math>-postlabelling</b>	$\sim 1/10^{10}$	1-10	Sensitivity and versatility, screening possible	High levels of radioactivity, no structural information
<b>Mass spectrometry</b>	$\sim 1/10^8$	10-100	Highest specificity, structural information	Adduct standards required

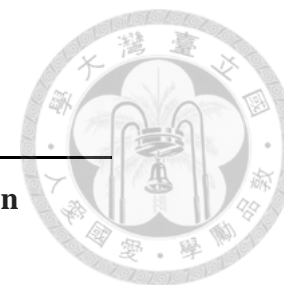


表 三、暴露不同劑量環氧黃樟素與相關化合物之小鼠動物實驗設計

<b>Compound<sup>a</sup></b>	<b>Concentration in olive oil (mg/kg/mL)</b>	<b>Dose (mg/kg/day)</b>	<b>Duration (days)</b>
Safrole	50	150	28
	100	300	28
Safrole oxide	10	30	28
	20	60	28
	30	90	28
	40	120	28
Control	0	0	28

<sup>a</sup> 控制組與黃樟素低劑量組各有 5 隻小鼠，其餘組別各有 6 隻小鼠



表 四、CD-1 小鼠暴露黃樟素後肝、腎、肺臟重量和其相對重量

(N=5 或 6, \*表示 P<0.05; \*\*表示 P<0.01)

Safrole	0 mg/kg/day	150 mg/kg/day	300 mg/kg/day
Liver weight(g)	1.47 ± 0.24	1.30 ± 0.17	*1.92 ± 0.29
Relative liver weight(%)	5.48 ± 0.18	4.77 ± 0.84	**6.96 ± 0.66
Kidney weight(g)	0.39 ± 0.06	0.34 ± 0.04	0.32 ± 0.03
Relative kidney weight(%)	1.46 ± 0.68	*1.24 ± 0.12	**1.18 ± 0.04
Lung weight(g)	0.28 ± 0.16	0.21 ± 0.07	0.19 ± 0.05
Relative lung weight(%)	1.03 ± 0.87	0.76 ± 0.23	0.70 ± 0.15

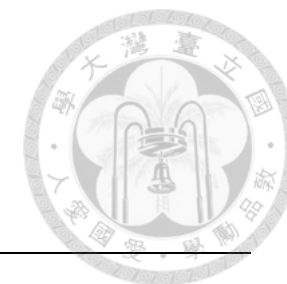


表 五、CD-1 小鼠暴露環氧黃樟素後肝、腎、肺臟重量和其相對重量

(N=5 或 6，\*表示 P<0.05；\*\*表示 P<0.01)

Safrole oxide	0 mg/kg/day	30 mg/kg/day	60 mg/kg/day	90 mg/kg/day	120 mg/kg/day
<b>Liver weight(g)</b>	1.47 ± 0.24	1.18 ± 0.21	**0.99 ± 0.21	*1.22 ± 0.05	**1.07 ± 0.12
<b>Relative liver weight(%)</b>	5.48 ± 0.18	**4.15 ± 0.57	**3.71 ± 0.54	**4.02 ± 0.12	**3.98 ± 0.57
<b>Kidney weight(g)</b>	0.39 ± 0.06	0.37 ± 0.05	0.33 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.33 ± 0.05
<b>Relative kidney weight(%)</b>	1.46 ± 0.68	*1.31 ± 0.08	**1.23 ± 0.09	**1.21 ± 0.10	*1.22 ± 0.17
<b>Lung weight(g)</b>	0.28 ± 0.16	0.25 ± 0.06	0.26 ± 0.05	0.23 ± 0.05	0.20 ± 0.06
<b>Relative lung weight(%)</b>	1.03 ± 0.87	0.87 ± 0.28	0.96 ± 0.25	0.76 ± 0.12	0.74 ± 0.25





表六、暴露不同劑量的環氧黃樟素與黃樟素小鼠肝臟組織之液相層析搭配電噴灑離子化串聯式質譜儀分析結果

Liver (DNA adducts/10 <sup>7</sup> base)		
Dose(mg/kg body wt) <sup>a</sup>	No. of animals	N7γ-SFO-Gua
<b>Control</b>	5	N.D.
<b>Safrole</b>		
150 mg/kg/day	5	N.D.
300 mg/kg/day	6	N.D.
<b>Safrole oxide</b>		
30 mg/kg/day	6	0.338 ± 0.0370
60 mg/kg/day	6	0.342 ± 0.0528
90 mg/kg/day	6	0.435 ± 0.075
120 mg/kg/day	6	0.648 ± 0.212

<sup>a</sup> 28 repeated doses of safrole oxide and relative compounds.

每一共價鍵結物數據以六隻小鼠之平均值±標準差表示



表七、暴露不同劑量的環氧黃樟素與黃樟素小鼠尿液之液相層析搭配電噴灑離子化串聯式質譜儀分析結果

(\*表示 P<0.05；\*\*表示 P<0.01)

Dose(mg/kg body wt) <sup>a</sup>	No. of animals	Urine ( $\mu\text{g/g creatinine}$ )	
		N7 $\gamma$ -SFO-Gua	
<b>Control</b>	5	N.D.	
<b>Safrole</b>			
150 mg/kg/day	5	N.D.	
300 mg/kg/day	6	N.D.	
<b>Safrole oxide</b>			
30 mg/kg/day	6	**9.62 $\pm$ 5.08	
60 mg/kg/day	6	**43.33 $\pm$ 15.42	
90 mg/kg/day	6	**83.46 $\pm$ 27.73	
120 mg/kg/day	6	**164.29 $\pm$ 40.99	

<sup>a</sup> 28 repeated doses of safrole oxide and relative compounds.

每一共價鍵結物數據以小鼠之平均值 $\pm$ 標準差表示