

氧化壓力之臨床指標：Isoprostanes和Neuroprostanes

魏耀揮（國立陽明大學生化暨分子生物研究所特聘教授）

多年來的醫學研究已經證實神經退化疾病（neurodegenerative diseases）、高血壓（hypertension）、粥狀動脈硬化症（atherosclerosis）、高血脂症（hyperlipidemia）以及第二型糖尿病（type 2 diabetes）等疾病，與組織細胞或血液循環中之活性氧分子（reactive oxygen species; ROS）太高所造成的氧化壓力（oxidative stress）有關¹。生物體內常見的ROS包括有超氧陰離子（superoxide anion, $\cdot O_2^-$ ）、過氧化氫（hydrogen peroxide, H_2O_2 ）和氫氧自由基（ $\cdot OH$ ）。ROS是細胞在正常生理情形下，在粒線體（mitochondria）內膜的電子傳遞鏈（electron transport system; ETS）中將氧分子（ O_2 ）轉變成水的還原過程所產生的代謝副產物。ROS具有很廣泛的生化功能，包含訊號傳導、基因表現調控、酵素結構與功能調節及細胞生長和分化的調控等。 $\cdot O_2^-$ 有未配對的電子，經過超氧化物歧化酶（superoxide dismutase; SOD）的作用，可轉變為 H_2O_2 ，但在有金屬離子 Fe^{2+} 或 Cu^+ 存在的環境下， H_2O_2 可透過Fenton反應轉換為高活性及不穩定的 $\cdot OH$ ，在細胞內攻擊DNA、RNA、蛋白質及脂質等生化分子。若組織細胞中ROS的產生與清除不平衡，就會累積過量的ROS而導致氧化壓力，進而對各種生化分子造成各種形式的氧化損傷。神經組織細胞含有豐富的不飽和脂肪酸，非常容易遭受ROS破壞而產生脂質過氧化物，而這也是ROS造成阿茲海默症（Alzheimer's disease）、帕金森氏症（Parkinson's disease）、老化及其他許多人類疾病的主因²。因此，檢測組織細胞中的ROS及氧化損傷的含量，在瞭解與氧化壓力相關疾病的致病機轉，以及診斷與治療此等疾病的追蹤上可提供相當重要的資訊。

長庚大學醫學生物技術研究所及醫學生

物技術暨檢驗學系顏秀娟副教授與謝育萍小姐撰寫的這一篇論文，主要介紹由花生四烯酸（arachidonic acid）及二十二碳六烯酸（docosahexaenoic acids）在氧化壓力環境下，進行脂質過氧化所產生的 F_2 -isoprostanes（ F_2 -IsoPs）和 F_4 -neuroprostanes（ F_4 -NPs）在人體組織細胞、血液、尿液或體液中的分析方法及其含量與一些人類疾病的關係。本文詳細說明 F_2 -IsoPs和 F_4 -NPs及其相關異構物，自1990年被報導以來的研究經過及一些定量分析方法的建立及演化。作者特別介紹美國Vanderbilt University醫學院Jason D. Morrow教授的貢獻；並就這兩種脂質過氧化產物在診斷一些和氧化壓力相關之人類疾病上的臨床應用提出看法和討論。

本文作者首先介紹組織細胞中的磷脂質（phospholipids）所含之兩種多元不飽和脂肪酸（polyunsaturated fatty acids）—花生四烯酸及二十二碳六烯酸，在氧分子及氧自由基的催化下，分別進行一系列化學反應產生 F_2 -IsoPs和 F_4 -NPs的過程，也說明其作為脂質過氧化產物的指標之理論依據和適切性。此外，作者詳細介紹 F_2 -IsoPs和 F_4 -NPs的檢測方法，由於這類的脂質過氧化物在人體組織、血液、腦脊髓液、關節液、淋巴液、尿液或其他體液中的含量很低，必須使用高靈敏度的分析方法定量。目前已被建立且廣為使用的定量分析方法主要分為兩大類，一類是使用質譜技術（mass spectrometry），另一類則是免疫分析法（immunoassay）。質譜儀分析法主要利用氣相層析/負離子化學游離質譜儀（gas chromatography/negative-ion-chemical-ionization mass spectrometer; GC/NICI-MS）、液相層析與質譜儀（liquid chromatography/mass spectrometer; LC/MS）或液相層析及串聯質譜儀

(liquid chromatography/tandem mass spectrometer; LC/MS/MS) 來進行定量分析。免疫分析法以酵素免疫分析法 (enzyme immunoassay) 和放射免疫分析法 (radioimmunoassay) 最常用。運用質譜儀分析 F_2 -IsoPs和 F_4 -NPs, 其準確度與特異性皆高於免疫分析法, 但最大的缺點是必須使用非常昂貴的液相層析系統和質譜儀, 也需要較複雜的檢體處理及高階的化學分析技術。

花生四烯酸在ROS攻擊下可產生許多的過氧化產物, 包括malondialdehyde (MDA)、4-hydroxynonenal (HNE) 及isoprostanes (含 F_2 -IsoPs) 等。MDA可先與硫巴比妥酸 (thiobarbituric acid; TBA) 反應, 再運用高效液態層析法 (high performance liquid chromatography; HPLC) 及光譜儀分析其含量, 也可用酵素連結免疫分析法 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) 定量分析; 但容易受到檢體中其它醛類化合物干擾。HNE的定量以ELISA方法較為準確。雖然MDA和HNE的定量較為容易, 也非常廣泛被使用, 但準確性較差; 而isoprostanes的含量雖然較低, 但運用液相層析及串聯質譜儀分析通常可獲得相當準確的結果。二十二碳六烯酸主要存在於腦神經元的細胞膜上, 又非常容易遭受ROS攻擊造成氧化傷害, 所以 F_4 -NPs目前被認為是偵測腦神經元氧化損傷較可信的高特異性生化指標。本文作者顏秀娟副教授率先在國內建立以氣相層析質譜儀 (GC/MS) 分析 F_2 -IsoPs與 F_4 -NPs的方法, 並與神經外科醫師合作, 收取動脈瘤破裂所引發蜘蛛膜下腔出血 (aneurysmal subarachnoid hemorrhage; aSAH) 病人的腦脊髓液, 分析 F_2 -IsoPs和 F_4 -NPs的含量, 發現aSAH的致病與這兩種脂質過氧化物在腦脊髓液的含量相關, 顯示aSAH的致病和病人體內組織的氧化壓力有關³。然而, F_2 -IsoPs與 F_4 -NPs的定量受限於其複雜的分析技術與昂貴的檢測與分析儀器, 迄今仍未被廣泛使用於疾病的臨床診斷或追蹤治療。但這些生化指標與組織和細胞內的氧化壓力有密切關係, 在生物醫學的研究上有相當重要的地位, 對日後探討與

氧化壓力有關之疾病的預測、診斷及治療也將有很大的幫助。

花生四烯酸和二十二碳六烯酸祇是細胞中一小部分的不飽和脂肪酸, 因此 F_2 -IsoPs和 F_4 -NPs只代表一部分的脂質過氧化物。若要全面評估細胞脂質過氧化, 應該納入MDA和HNE等含量的分析⁴。此外, 因為ROS也會造成細胞內DNA及蛋白質的氧化損傷, 若能將DNA氧化損傷之代表產物8-hydroxy 2'-deoxyguanosine (⁸-OHdG)⁴及蛋白質的氧化損傷產物protein carbonyls納入分析, 最後將兩者的分析結果與脂質过氧化物的分析結果一併整理比較, 應該可以更為完整地評估細胞的氧化損傷程度。在氧化壓力高的病理情況下, 本文所介紹的脂質過氧化物 F_2 -IsoPs 和 F_4 -NPs較容易在腦組織細胞中產生, 其含量在探討神經退化性疾病的致病機轉及治療追蹤深具臨床應用價值, 在ROS處理神經細胞的氧化壓迫反應 (oxidative stress response) 之研究上也可以作為一重要的氧化損傷指標。因此, 建立 F_2 -IsoPs和 F_4 -NPs的分析系統對於自由基生物與醫學之基礎研究及與氧化壓力相關疾病的臨床診斷有長遠的影響及助益。

引用文獻

1. Halliwell B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 2001;18:685-716.
2. Lee HC, Wei YH. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging. *Exp Biol Med* 2007;232:592-606.
3. Lin CL, Hsu YT, Lin TK, Morrow JD, Hsu JC, Hsu YH, Hsieh TC, Tsay PK, Yen HC. Increased levels of F_2 -isoprostanes following aneurysmal subarachnoid hemorrhage in humans. *Free Radic Biol Med* 2006;40:1466-1473.
4. Kao SH, Chao HT, Chen HW, Hwang TI, Liao TL, Wei YH. Increase of oxidative stress in human sperm with lower motility. *Fertil Steril* 2008;89:1183-1190.