

# 第壹章 前言

## 第一節、研究動機

近年來隨著社會變遷，單身女性及晚婚的高齡產婦愈來愈多，加上飲食日漸西化脂肪攝取量增多，使得台灣地區女性乳癌發生率有逐年增加的現象。目前婦女乳癌發生率為所有癌症第二位僅次於子宮頸癌，且有年輕化的趨勢，且其死亡率有逐年增高趨勢。依行政院衛生署台灣地區主要癌症死亡原因統計資料顯示，乳癌排為女性主要癌症死亡原因第四位<sup>(1)</sup>。乳癌於許多研究中<sup>(2-3)</sup>顯示，發生原因可能會由本身體質或外在暴露因子造成體內 DNA 突變所引起。

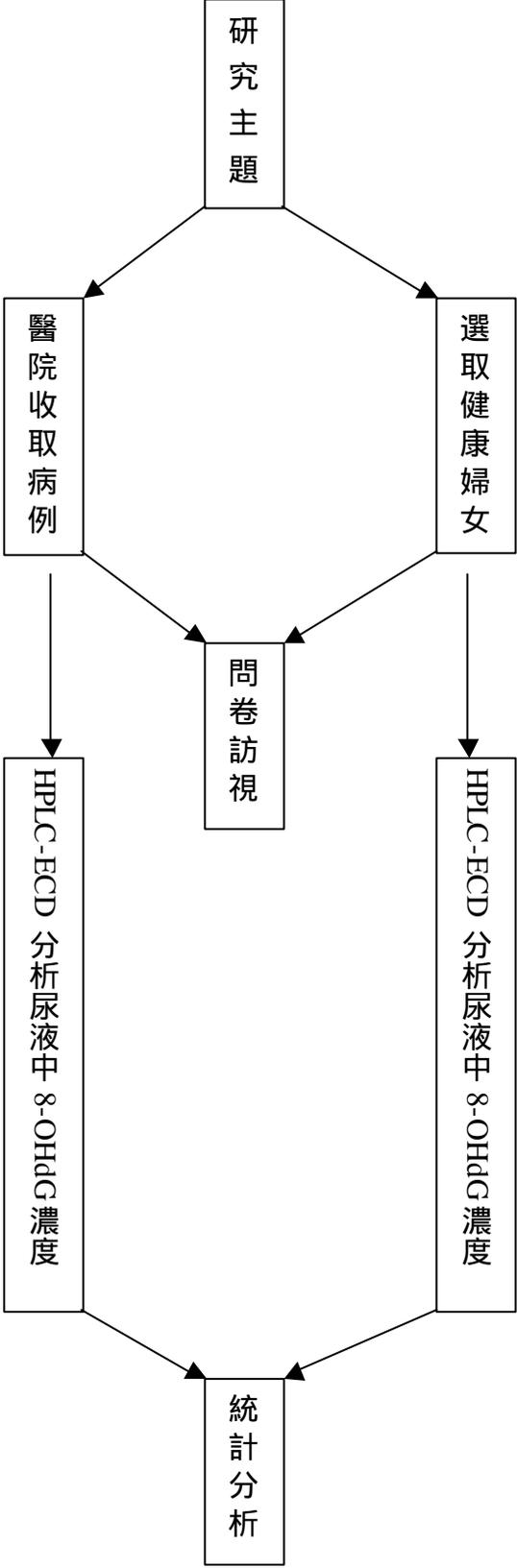
含氧自由基 (Reactive Oxygen Species ; ROS) 是細胞正常代謝時的副產物，同時也可能因外來物質的刺激誘發產生，已知 ROS 與許多疾病或癌症有顯著相關性；8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) 是含氧自由基 (reactive oxygen species ; ROS) 攻擊 DNA 後所形成的產物，8-OHdG 的形成很容易造成 DNA 複製時發生錯誤而造成基因突變，進而可能發生癌症；同時在體內會經由修補酵素修補後從 DNA 鏈上切除而形成。

由於國內對 8-OHdG 之相關研究有限，且多半集中於細胞或組織之分泌量，很少針對癌症患者組織及其尿液中 8-OHdG 濃度之相關性，及其量是否較正常人有顯著性之差異，以進一步探討 8-OHdG 與致癌發生之關係。本研究預期將瞭解乳癌形成之可能機轉是否由於自由基的形成對乳房組織或細胞的影響，同時亦可瞭解 8-OHdG 當作氧化 DNA 傷害的生物指標 (biomarker) 之可行性。

## 第二節、研究目的

- 一、比較惡性乳癌腫瘤、良性乳癌腫瘤患者與正常婦女尿液中 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) 濃度之差異。
- 二、藉由問卷調查其他危險因子及 8-OHdG 濃度在乳癌患者與正常婦女之間的差異。
- 三、建立國內乳癌腫瘤患者及正常婦女尿液中 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) 濃度之資料。
- 四、嘗試以 8-OHdG 當作乳癌患者中 DNA 氧化傷害的生物指標。

### 第三節、研究架構



## 第貳章、文獻探討

### 第一節、乳癌現況

近年來台灣地區社會經濟的發展，單身女性及晚婚的女性愈來愈多，以及西化脂肪的食物攝取量增多，使得國內女性乳癌發生率逐年增加，此癌症發生率是所有罹患癌症的第二位僅次於子宮頸癌，且有逐年年輕化的趨勢，且乳癌死亡率亦有日益增高的趨勢。依行政院衛生署台灣地區在主要癌症發生統計，乳癌發生率每十萬人口於民國 83 年為 20.59、民國 84 年為 24.37 及民國 85 年為 28.35，為女性主要癌症發生率的第二位，且有逐年升高現象；在主要癌症死亡原因統計資料顯示，乳癌死亡率為每十萬人口於民國 87 年為 9.36、民國 88 年為 10.08 及民國 89 年為 10.61，排為女性主要癌症死亡原因第四位，相較於民國 83 年每十萬人口死亡率為 7.72 均有明顯增加趨勢<sup>(1)</sup>。

### 第二節、乳癌發生之可能因素探討

乳癌發生的致癌機轉，多數研究中一般認為是多因素及多階段 (multistage) 所形成的。首先有一起啟因子 (Initiation factor) 引起乳房細胞癌化，接著有促進因子 (Promotion factor) 使它成為乳癌<sup>(2-4)</sup>。

發生乳癌的可能因素可分：

#### 1、種族及地區因素<sup>(5)</sup>：

根據美國 Doll 等人的研究指出，地區性的生活習俗與發生乳癌的關係，遠比種族因素為大，在加利福尼亞的黑人得乳癌的機會為在南非及奈及利亞黑人的 3 倍。另外，Buell 更做深入的研究，發現早期移居美國的日本人，其第一代子孫得乳癌的機會增加，到第二代則增加更鉅，而其發生率與當地美國人無異，可見地區性之生活習慣影響乳癌的發生較大。

## 2、女性荷爾蒙因素：

Staszewski( 1971 )<sup>(6)</sup> 研究中顯示初經來得早的女性罹患乳癌比晚來的女性來的高。 Lilienfeld ( 1956 )<sup>(7)</sup> 研究得知，停經年齡超過 55 歲者較易得乳癌，相對地，如果在正常停經年齡前，尤其 40 歲前，使用人工停經如卵巢切除、卵巢放射性照射等，可減少罹患乳癌的機會。Brinton( 1981 )<sup>(8)</sup> 結果中顯示，在人工停經後若有服用女性荷爾蒙藥物，則不會減少發生乳癌的機會。此外，西化的飲食習慣，包括營養的改善所造成婦女初經年齡的提前、停經年齡的延後、停經後肥胖人口的增加，均會使得現代婦女相較於從前有更多的機會暴露在荷爾蒙的影響下，進一步增加乳癌發生的危險性<sup>(44)</sup>。而且，另一方面包括初次生育年齡的延後、生育次數的減少，也對乳癌發生的增加，有某些程度的作用（因為懷孕過程本身會終止動情激素的刺激，使乳房細胞往分化而非分裂的方向進行。）<sup>(44)</sup>。

## 3、飲食習慣因素

Carroll( 1979 )<sup>(9)</sup> 研究中根據動物實驗，食物中的高卡路里、高蛋白尤其是高脂肪成分和乳癌形成有關。

## 4、遺傳因素：

Anderson( 1985 )<sup>(10)</sup> 在第一等親中有乳癌病例，本身罹患乳癌機會增加兩倍；若該病例為停經前乳癌，則本身罹患率增加三倍；若該病例為兩側性乳癌，則本身罹患率增加為五倍。Jenny ( 2000 )<sup>(11)</sup> 研究中顯示，一等親中有乳癌病例者，發生乳癌危險性為無病史的 2.6 倍。

### 第三節、乳癌臨床上之分期

目前有三種臨床分期系統，分別為 Manchester System、Columbia System、TNM System。常見研究中是以 TNM System 做為臨床分期標準。

#### 一、TNM 系統 (TNM System)<sup>(12)</sup>：

##### 1、T 代表原發腫瘤 (Primary Tumors)

- (a) TIS：癌瘤發病前期 (原位癌)。
- (b) T<sub>0</sub>：乳房不具明確腫瘤。
- (c) T<sub>1</sub>：腫瘤最大不超過 2 cm，皮膚未受侵犯。
- (d) T<sub>2</sub>：腫瘤在 2~5 cm 間，皮膚有凹陷。
- (e) T<sub>3</sub>：腫瘤最大超過 5 cm 皮膚凹陷，乳頭內縮。
- (h) T<sub>4</sub>：任何大小的腫瘤直接擴展至胸壁或皮膚上。

##### 2、N 代表局部淋巴結 (Regional Lymph Nodes)

- (a) N<sub>0</sub>：同側液部摸不到淋巴結。
- (b) N<sub>1</sub>：同側液部可摸到移動的淋巴結。
- (c) N<sub>2</sub>：同側液部淋巴結含有腫瘤，且相互固定或固定其他構造上。
- (d) N<sub>3</sub>：同側鎖骨上或鎖骨下淋巴結含有腫瘤或手臂水腫。

##### 3、M 代表遠處轉移 (Distant Metastases)

- (a) M<sub>0</sub>：沒有明確遠處轉移。
- (b) M<sub>1</sub>：有明確的遠處轉移。

## 二、乳癌的臨床分期

第 期： $T_1N_0M_0$

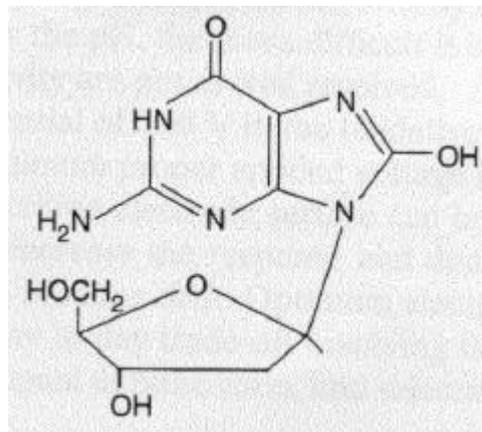
第 期： $T_2N_1M_0$

第 期： $T_3N_2M_0$ 、 $T_4N_3M_0$

第 期： $T N$  各期- $M_1$

## 第四節、8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) 與致癌性之關係

8-OHdG 分子量為 283.2，是含氧自由基( reactive oxygen species ; ROS ) 之氫氧自由基 ( hydroxyl radical; OH ) 攻擊 DNA 鹼基 guanine 的第 8 個位置後，經由酵素修補後從 DNA 鏈上切除而形成，為水溶性會經由尿液排出體外。化學結構如下：



造成核酸氧化性傷害而形成 8-OHdG 的含氧自由基主要為氫氧自由基 ( OH ) 及單線態氧 ( singlet oxygen )<sup>(13-14)</sup>，此外另有一氧化氮自由基( NO )及超氧自由基(  $O_2^-$  )亦可能造成 8-OHdG 的形成<sup>(15)</sup>。

Roy 等人( 1991 )<sup>(16)</sup> 研究中指出當細胞受到致癌物的攻擊或是受

到 - 放射線的照射<sup>(17)</sup>，其可能會產生某些含氧自由基，進而含氧自由基造成核酸的氧化性傷害；當這些受到含氧自由基攻擊後造成核酸氧化性傷害的產物超過數十多種，而其中以 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) 最具代表性 (附圖一)<sup>(18)</sup>；且因 8-OHdG 會在 DNA 複製時造成去氧核糖置入的錯誤，而發生 G → T 的轉換<sup>(19)</sup>，Dizdaroglu 等人 (1992)<sup>(20)</sup> 研究有發現，8-OHdG 可當做與突變形成或癌症形成有關的生物指標。

近幾年來，國外研究利用 HPLC-ECD (high-performance liquid chromatography with electrochemical detector) 已常被使用來偵測組織、尿液中 8-OHdG 含量，如 Germadnil 等人 (1997)<sup>(21)</sup> 已可以偵測出尿液中微量 8-OHdG 含量。由於 HPLC-ECD 的高度敏感性，使得可以分析 DNA 受到氧化性傷害的工具。

## 第五節、8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) 相關疾病之研究

Shinya 等人 (1997)<sup>(22)</sup> 研究肺癌病人 (19 位男性及 11 位女性) 組織 8-OHdG 與抽菸之相關性中發現，抽菸者 8-OHdG 值比非抽菸者高 1.43 倍且達統計上顯著差異 ( $p < 0.05$ )，而 8-OHdG 之量與抽菸 (年數) 呈現正相關 ( $r = 0.525$ ,  $p < 0.05$ )，作者推測長期抽菸下造成體內肺組織中含氧自由基的增加而造成核酸的氧化性傷害。Tsuboi 等人 (1998)<sup>(23)</sup> 研究各 17 名過敏性皮膚炎與健康人尿液中 8-OHdG 濃度之比較，結果顯示患有過敏性皮膚炎尿液中 8-OHdG 值比健康人高且有顯著性差異 ( $p < 0.0001$ )，因此可利用尿液中 8-OHdG 值作為過敏性皮膚炎 DNA 氧化傷害的生物指標。

Shimoda 等人 (1994)<sup>(24)</sup> 於研究慢性肝炎患者組織中 8-OHdG 之含量，發現罹患慢性肝炎病人其組織 8-OHdG 值較周圍正常人組織

為高 ( $p < 0.05$ ), 推斷罹患慢性肝炎患者長期下可能會使組織含氧自由基增加, 而造成人體 DNA 氧化性的損害, 並增加基因的突變機率進而導致產生肝癌發生。Christer (1996)<sup>(25)</sup> 對 343 名玻璃製造業勞工探討尿液中 8-OHdG 的濃度與職業暴露之相關性中, 結果顯示 8-OHdG 之含量暴露組比非暴露組為高, 但並無統計上的顯著性相關, 推測人體新陳代謝及其修復能力情形均可能會影響到 8-OHdG 的值。

Nagashima 等人 (1995)<sup>(26)</sup> 於研究乳癌患者組織及周圍正常組織中 8-OHdG 之含量, 發現患有乳癌組織其 8-OHdG 值較周圍正常的組織為低, 但並無統計上的顯著性相關, 推測與體內 DNA 的修復機能有相關聯。在 Matsui 等人 (2000)<sup>(40)</sup> 研究乳癌分期病人組織結果中顯示, 第一期病人其組織 8-OHdG 值 ( $2.56 \pm 0.93 / 10^5 \text{dG}$ ) 高於第二期 ( $2.09 \pm 1.03 / 10^5 \text{dG}$ ) 及第三期 ( $1.75 \pm 0.65 / 10^5 \text{dG}$ ) 8-OHdG 值, 作者推測 oxygen radicals 可能在早期癌化過程中參與有關, 作者引述 Okamoto 等人報告, 在腎臟細胞癌中修補酵素 hMTH1 會在初期中大量產生, 所以推測修補酵素會在乳癌初期大量產生, 此外 DNA 鍵結物會在疾病初期藉由 DNA 複製而被稀釋, 因此在惡性腫瘤分期中, 其第一期患者組織中 8-OHdG 濃度會高於第二期、第三期患者。

於 Musarrat (1996)<sup>(41)</sup> 研究結果中, 惡性乳癌患者其組織 8-OHdG 值 ( $2.44 \pm 0.49 \text{ pmol} / \mu \text{g DNA}$ ) 高於良性腫瘤 ( $0.98 \pm 0.17 \text{ pmol} / \mu \text{g DNA}$ ) 與健康人 ( $0.25 \pm 0.03 \text{ pmol} / \mu \text{g DNA}$ ) 的 8-OHdG 值, 且達顯著性差異 ( $p < 0.05$ )。

## 第六節、影響 8-OHdG 之因子

### 一、生物種類的影響

Loft 等人 (1992)<sup>(27)</sup> 研究中顯示不同物種間會因其基礎代謝率的

差異，使其氧化代謝率不同，造成各物種8-OHdG 的代謝有明顯的差異。體型較小的齧齒性動物因粒線體內呼吸作用較高，使其含氧自由基產生較多，而間接代謝至尿液中8-OHdG 的濃度增加。另外此結果8-OHdG 的濃度大小依序為7週大的老鼠>15週大的老鼠>8週大的豬>2歲的狗>40-64歲的人。

## 二、年齡的影響

Loft等人(1992)<sup>(27)</sup> 研究中得知，在較小的年齡範圍內，無法判斷8-OHdG 濃度與年齡之相關性。在動物實驗方面 Fraga 等人(1990)<sup>(28)</sup> 報告老鼠隨年齡增加其尿中8-OHdG 值會減少，但在肝、腎、小腸組織中8-OHdG值卻會隨年齡增加而增加，可能與體內各組織DNA修補能力有關。Sai等人(1992)<sup>(29)</sup> 研究雄鼠及雌鼠在肝及腎中之8-OHdG 值會隨著年齡而增加，但在腦、肺臟及脾臟則否。

Hayakawa等人(1991)<sup>(30)</sup> 研究人類橫膈膜中8-OHdG 濃度，其年齡愈高則其8-OHdG 濃度亦愈高，推測可能是因為年齡愈高細胞複製速率變慢，進而間接造成過多8-OHdG的累積的緣故。Zeeland(1999)<sup>(31)</sup> 研究102名健康人的生活習慣(抽菸、喝酒、喝咖啡等)對8-OHdG 值的影響，結果顯示在對年齡分層之後發現8-OHdG 值與年齡並未達到統計上的相關性。而後在 Lodovici(2000)<sup>(32)</sup> 研究56名健康人在抽菸對8-OHdG值影響，結果顯示抽菸對8-OHdG有顯著性之影響，且在非抽菸組中8-OHdG 值與年齡呈現正相關( $r = 0.337, p < 0.05$ )。

## 三、性別的影響

Loft等人(1992)<sup>(33)</sup> 在研究抽菸及身體質量指數(BMI)對8-OHdG 值之影響，結果顯示在尿液中8-OHdG 值於性別上男性比女性高，推測可能與性別對DNA修補能力的差異有關。Zeeland(1999)<sup>(31)</sup> 研究結果顯示在性別上的差異並不會有明顯造成8-OHdG值的差異。

#### 四、抽菸習慣的影響

Kiyosawa 等人 (1990)<sup>(34)</sup>於研究抽菸前後比較周邊血液白血球中8-OHdG濃度的變化，結果顯示抽菸後白血球中8-OHdG濃度較抽菸前高且達到統計上的顯著差異，可知抽菸於短時間內會使人體白血球中8-OHdG濃度增加。在Lodovici(2000)<sup>(32)</sup>研究56名健康人在抽菸與非抽菸對8-OHdG值影響中顯示，抽菸者8-OHdG值比非抽菸或已戒菸者為高，且有明顯的差異( $p < 0.05$ )，且抽菸者的抽菸量與8-OHdG之相關性，其中每天抽超過10支以上比每天抽不超過10支的8-OHdG值來的高，且達到統計上的顯著差異( $p < 0.01$ )。

#### 五、酒精攝取習慣的影響

Nakajima 等人(1996)<sup>(35)</sup>研究則發現人體之酒精攝取會增加白血球中8-OHdG濃度。Zeeland (1999)<sup>(31)</sup>研究102名健康人的生活習慣(包括抽菸、喝酒、喝咖啡等)對8-OHdG值之影響，結果顯示喝酒者與不喝酒者在8-OHdG濃度並未達到統計上的顯著差異；在Lodovici(2000)<sup>(32)</sup>研究不抽菸的健康人中，喝酒者與不喝酒者其8-OHdG濃度之差異，結果顯示也未達到統計上的顯著差異。

#### 六、體重的影響

Loft 等人 (1992)<sup>(33)</sup>研究人類體重對8-OHdG濃度的影響，結果顯示當人體每增加一個BMI( $\text{Kg}/\text{m}^2$ )則其尿中可減少約4%的8-OHdG分泌量。且在Zeeland (1999)<sup>(31)</sup>研究健康男性其BMI與8-OHdG濃度之相關性，結果顯示當對BMI分層(<21、21-22.9、23-24.9、25+)後，其8-OHdG濃度會隨著BMI增加而有減少趨勢，且達到統計上的顯著差異( $p < 0.002$ )。

#### 七、運動的影響

Inoue 等人 (1993)<sup>(36)</sup>研究運動對淋巴球中8-OHdG濃度的影響，結果當人體游泳後其淋巴球中8-OHdG濃度則有顯著性地降低，而經

長跑後其淋巴球中8-OHdG濃度也有降低現象，但未達到統計上顯著性差異。Pilger 等人（1997）<sup>(37)</sup> 研究習慣性長跑者其尿中8-OHdG濃度，結果顯示運動者與對照組兩者尿中8-OHdG濃度並沒有顯著性之差異。

#### 八、健康食品的影響

Lee 等人（1998）<sup>(46)</sup> 研究服用抗氧化物與體內 DNA 氧化情形的結果顯示，抽煙者於服用抗氧化物（維他命 E、 $\beta$ -carotene、維他命 C、人參）四週之後，其 8-OHdG 濃度降低情形以服用維他命 E 及人參分別降低 33.8% 及 31.7% 降低比例為最多，且達顯著性之差異（ $p < 0.05$ ）；而在服用  $\beta$ -carotene 及維他命 C 分別降低 19.8% 及 18.1%，由結果中作者推測服用抗氧化物（維他命 E 及人參）能減少體內 DNA 氧化傷害的情形。

## 第參章、材料與方法

### 第一節、研究對象

乳癌患者為來自本校附設醫院，接受乳房外科切除經簽同意書後，參與本計畫之執行。由本校附設醫院外科收集 60 位經診斷後為惡性乳癌作為對象，並收集其尿液進行分析 8-OHdG 濃度，同時收集相同年齡層且過去未曾罹患婦科疾病或接受治療者之 60 位正常婦女尿液為對照組，同時也收集良性腫瘤對象之尿液，分析尿中 8-OHdG 濃度；比較惡性乳癌患者、良性纖維瘤患者與正常婦女尿液中 8-OHdG 濃度之差異。

### 第二節、研究方法

#### 一、問卷資料<sup>(附件一)</sup>

所有研究參與本研究之對象由訪視員訪問的方式進行一系列問卷，其內容包括個人基本資料（年齡、身高、體重、婚姻狀態、子女數、職業別、教育程度等），疾病史（個人疾病、家族史等），哺乳史、初經年齡、避孕藥服用、飲食習慣、個人嗜好（包括喝茶、喝咖啡、抽煙、喝酒、吃檳榔等），工作環境危險因子之暴露等。

#### 二、尿液樣本之收集

乳癌患者尿液樣本之收集為手術前利用導尿方式取得，正常婦女尿液收集為自然排尿方式取得，收集後之尿液樣本儲存於-80 冰箱中。

### 第三節、以HPLC-ECD分析8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine之濃度

#### 一、尿液中8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine之分析

(一) 藥品試劑

- 1、8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine 標準品：5mg (Sigma,美國)
- 2、去離子水：Milli-Q ultra-pure water system , 電阻值18以上
- 3、鹽酸：Hydrochloride , 12N (Merck)
- 4、甲醇：Methanol (Merck)
- 5、氰甲烷：Acetonitrile (Merck)
- 6、磷酸：Phosphoric acid , 85 % (Merck)
- 7、磷酸二氫鉀：Potassium dihydrogen phosphate (Merck)
- 8、氯化鉀：Potassium chloride (Merck)
- 9、氫氧化鈉：Sodium hydroxide (Merck)
- 10、固相萃取管柱：C18/OH , 500 mg , 3 ml , Varian

(二) 儀器設備

1、高效液相層析儀

HP-1100高效液相層析儀

層析管柱：25cm × 4.6mm ID Supelcosil LC18 5µm

HP-1049電化學偵測器

電化學偵測器：Working electrode: glassy carbon

Reference electrode: solid state

2、真空固相萃取裝置

3、真空濃縮裝置：Speed Vac (Labconco , SASKIA , Germany)

4、天秤：HP-200

(三) 器皿

1、微量吸管 (pipette)：100、1000 µl

2、定量瓶：100、500、1000 ml

3、離心管：15 ml

4、燒杯：Pyrex、100、250、500、1000 ml

5、分析小瓶 ( vial )：1.8 ml

6、塑膠滴管：3 ml

#### (四) 溶液配製

##### 1、8-OHdG 標準品溶液

秤取 5 mg 之 8-OHdG 標準品置入 100 ml 定量瓶中，加入 HPLC 級水定量至 100ml，攪拌溶解成 176  $\mu$ M 之 8- OHdG 標準品溶液。

##### 2、固相萃取緩衝溶液

50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  , pH 7.5 , 100ml ( buffer A )

取 0.68g 之  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  溶於 90 ml 去離子水中，攪拌溶解，以 1M NaOH 調 pH 值至 7.5，用水定量至 100ml，攪拌均勻。

5 % MeOH in buffer A

取 0.68g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  溶於 85 ml 去離子水中，攪拌溶解，加 5ml 甲醇，攪拌均勻，以 1M NaOH 調 pH 值 7.5，用水定量至 100ml，攪拌均勻。

15 % MeOH in buffer A

取 0.68g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  溶於 75 ml 去離子水中，攪拌溶解，加 15ml 甲醇，攪拌均勻，以 1M NaOH 調 pH 值 7.5，用水定量至 100 ml，攪拌均勻。

20 % MeOH in buffer A

取 0.68g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  溶於 70 ml 去離子水中，攪拌溶解，加 20ml 甲醇，攪拌均勻，以 1M NaOH 調 pH 值 7.5，用水定量至 100 ml，攪拌均勻。

### 3、儀器分析緩衝溶液

solution A : 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  , 2mM KCl , 2.5 % Acetonitrile ,  
1 % MeOH , pH3.5 , 1000ml。

取 6.8g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  及 0.15g KCl 溶於 900 ml 去離子水中，攪拌溶解，加 10ml 甲醇，加 25 ml Acetonitrile，以  $\text{H}_3\text{PO}_4$  調 pH 值至 3.5，用水定量至 1000ml，攪拌均勻。

solution B : 50mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  , 25 % Acetonitrile , 25 % MeOH ,  
500ml。

取 3.4g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  溶於 250 ml 去離子水中，攪拌溶解，加入 125ml 甲醇及 125ml Acetonitrile，攪拌均勻。

### (五) 尿液樣本前處理步驟

取尿液經 2N HCl調 pH值至4.5

↓

取5 ml尿液至15 ml離心管

↓

離心1500 rpm × 5 min High speed

↓

取2 ml上清液

↓

加入第一支萃取管

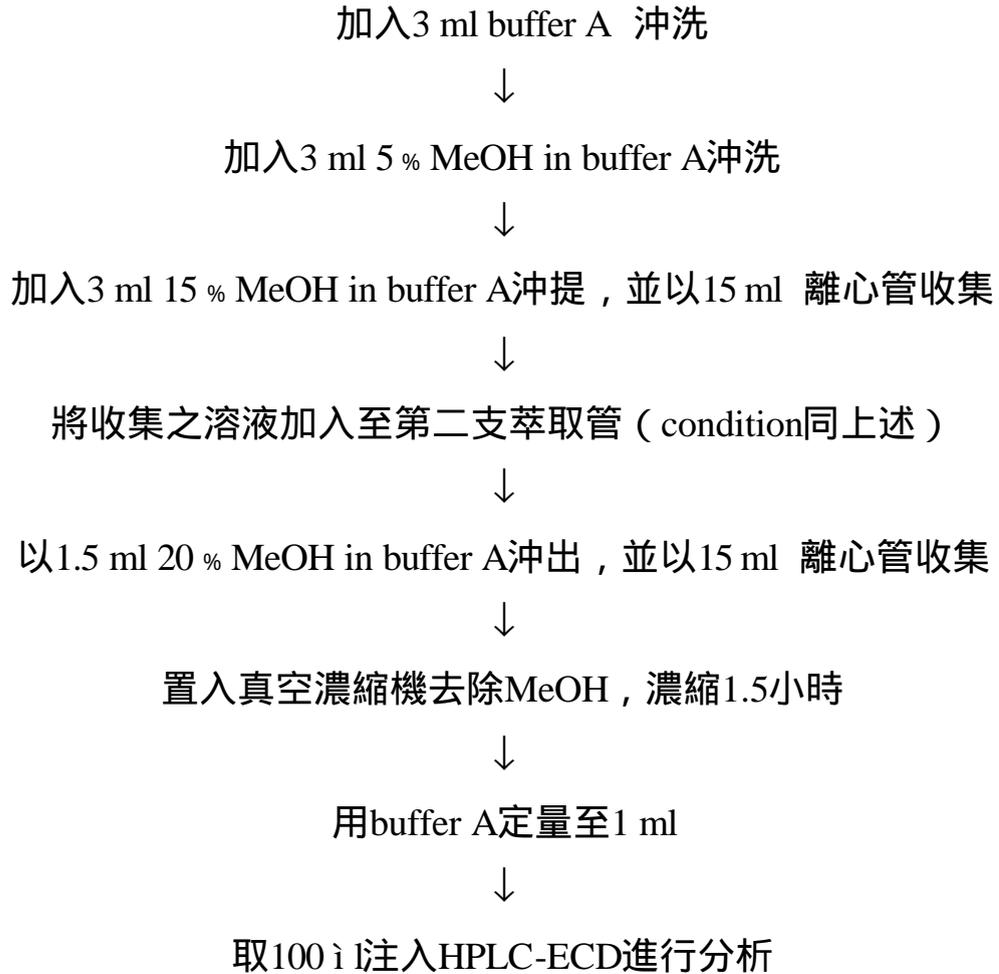
萃取管 condition :

加 10 ml MeOH

加 5 ml Water

加 10 ml buffer A

↓



(六) 儀器分析條件

1、高效液相層析儀（HP-1100）

Flow rate：0.5ml/min

Pressure：37 bar

Column temperature：40

Mobile phase 設定：

1~25 min 100 % solution A

26~35min 100-50 % solution A，0-50 % solution B

36~40min 50 % solution A，50 % solution B

41~50min 50-100 % solution A，50-0 % solution B

51~55min 100 % solution A

## 2、電化學偵測器 ( HP-1049 ):

Ampermetry mode

Pretreat mode : + 0.6V、 + 1.5V、 - 1.0V循環60次/分

ECD full scale range : 50 nA

ECD potential : 0.6 V

## (七) 品質管制

### 1、檢量線

分析時配製 8-OHdG 標準品檢量線，濃度分別為 27.5nM、55 nM、110nM、220nM、330nM、440nM、880nM、1760nM 共 8 個濃度點。配製完成後分別取 100ul 注入高效液相層析儀，以直線迴歸法求其線性關係  $y = 0.1391x + 0.0526$ ，其線性相關係數為  $R^2$  接近 1 ( 附圖二 )。

### 2、尿液檢量線

分析時配製 8-OHdG 尿中檢量線，濃度分別為 27.5nM、55 nM、110nM、220nM、330nM、440nM、880nM、1760nM 共 8 個濃度點，分別加入尿中經尿液萃取方法處理後分別取 100ul 注入高效液相層析儀，以直線迴歸法求其線性關係  $y = 0.1422x - 1.877$ ，線性相關係數為  $R^2 = 0.9997$  ( 附圖三 )。

### 3、偵測極限

本研究尿中 8-OHdG 濃度的偵測極限是以檢量線的最低點濃度 27.5 nM 重複分析七次，可得七次積分高度，求其平均值及標準差，取 3 倍標準差除以平均值再乘以最低濃度，即可求得尿中 8-OHdG 濃度之偵測極限為 2.94nM ( 附表一 )。

### 4、儀器再現性

分別配製 55 nM 及 440nM 之 8-OHdG 標準品濃度，重複分析

七次，可得七次的滯留時間及面積高度，求其平均值及標準差，並以標準差除以平均值求得變異係數（CV %），且變異係數小於 2 %，以顯示儀器分析時的穩定性（附表二）。

#### 5、尿液樣本之添加回收率

取尿液 2 ml 分別添加 110 nM 及 330 nM 濃度之 8-OHdG 標準品 0.5ml，經尿液萃取步驟之後，分析尿液中標準品濃度添加回收率，每一添加濃度均重覆 3 次，以求其添加回收率，由附表三得知兩者回收率分別為 92.2 % 及 93.6 %。

#### 6、儲存穩定性

隨機選取尿液樣本，其中所含尿液中之 8-OHdG 濃度在尿液檢量線範圍內。所有尿液樣品均保存於 -80 冷凍庫並於第 0、2、7、14 及 21 天各取三個樣本進行分析，並以第 0 天為基準濃度，計算出分別在第 2、7、14 及 21 天之回收率，由附表四得知至 21 天其平均值仍可達 98.0 %。

### 第四節、資料之整理與統計分析

將所有資料鍵入電腦以 Excel 軟體建檔，並以 SAS/PC+ 6.12 版進行統計分析。統計方法包括：頻率分析、卡方檢定、變異數分析（ANOVA）、t-test 及多變數迴歸分析。

## 第肆章 結果

### 第一節、研究對象的基本資料特性

表一是研究對象基本資料之比較，總共選取 120 位之研究對象，其中 60 位為惡性乳癌患者、60 位健康婦女，事先並經年齡進行配對；研究對象中惡性乳癌患者與健康婦女平均年齡分別為 49.0 及 49.62 歲。在職業別中惡性乳癌患者以工人佔 11.7%、商人佔 15.0%、家管佔 65.0% 為主，健康婦女則以公務員佔 13.3%、家管佔 65.0% 為主。惡性乳癌患者在教育程度方面以國中以上佔 60% 為最高，健康婦女國中以上佔 48.3%。婚姻狀況已婚者在惡性乳癌及健康婦女中分別佔 95.0% 及 93.3%。惡性乳癌患者及健康婦女具有家族史者各佔 40.0% 及 20.0%，且達統計上顯著之差異 ( $p < 0.05$ )。在籍貫方面惡性乳癌患者以閩南人居多 (90.0%)，健康婦女則以閩南人及客家人各佔 53.3% 及 43.3% 較多，兩組在籍貫分佈上達統計上差異 ( $p < 0.01$ )。

表二為惡性乳癌患者及健康婦女嗜好及生活習慣之比較，兩組除在喝茶及喝咖啡習慣有統計上差異外 ( $p < 0.05$ )，在抽菸、喝酒習慣上並無統計上之差異。在喝茶習慣方面，惡性乳癌患者喝茶者佔 61.7% 較健康婦女 43.3% 為高。在喝咖啡習慣方面，惡性乳癌患者及健康婦女喝咖啡比例各佔 83.3% 及 63.3%，病例組較對照組有顯著性較高比例有喝咖啡習慣 ( $p = 0.013$ )。在本研究對象中均無吃檳榔習慣。

表三為惡性乳癌患者及健康婦女生育哺乳狀況之比較，在初經年齡中惡性乳癌患者平均為 14.2 歲較健康婦女 14.5 歲來的早，且達統計上差異 ( $p < 0.01$ )。惡性乳癌患者及健康婦女在有懷孕過之比例、目前是否停經、懷孕胎數、生育胎數、人工流產次數、及身體質量指數 (BMI) 指標上均未達統計上之差異。但過去是否有哺乳過之比例，健康婦女有哺乳佔 76.7% 比惡性乳癌患者 53.3% 來的高，且達統計上

差異 ( $p < 0.01$ ) ; 在哺乳胎次上健康婦女哺乳 3 胎者以上佔 55.0 % 比惡性乳癌患者 26.7 % 高 , 且達統計上差異 ( $p < 0.01$ ) 。

## 第二節、惡性、良性腫瘤患者及健康婦女尿液中之生物指標比較

表四為惡性乳癌腫瘤患者及健康婦女尿液中 8-OHdG 濃度及經肌酸酐與體重校正之比較。兩組在 8-OHdG 濃度各變項比較中均達統計上之差異 ( $p < 0.01$ ) 。惡性乳癌腫瘤患者尿液中 8-OHdG 平均值濃度為  $81.81 \pm 74.4 \text{ nmol}$  較健康婦女  $33.14 \pm 18.1 \text{ nmol}$  為高 ( $p < 0.01$ ) , 若經尿中肌酸酐校正後 , 惡性乳癌腫瘤患者尿液中 8-OHdG / crea. 平均值濃度為  $16.39 \pm 17.3 \text{ umol / mol crea.}$  仍較健康婦女  $4.70 \pm 7.1 \text{ umol / mol crea.}$  高 ( $p < 0.01$ ) 。若個人體重排尿量校正後 , 惡性乳癌腫瘤患者尿液中 8-OHdG/ kg 平均值為  $676.82 \pm 608.0 \text{ pmol / kg}$  亦較健康婦女  $286.37 \pm 160.7 \text{ pmol / kg}$  為高 ( $p < 0.01$ ) 。兩者在尿中肌酸酐之濃度差異 , 惡性乳癌腫瘤患者平均值為  $68.9 \pm 35.4 \text{ mg/dl}$  較健康婦女  $116.77 \pm 56.9 \text{ mg/dl}$  為低 , 有顯著性之差異 ( $p < 0.01$ ) 。

表五為惡性及良性腫瘤患者尿液中 8-OHdG 濃度及經肌酸酐與體重校正之比較。惡性乳癌腫瘤患者尿液中 8-OHdG 平均值濃度為  $81.81 \pm 74.4 \text{ nmol}$  較良性腫瘤患者  $29.29 \pm 8.1 \text{ nmol}$  為高 , 在取 log 之後尿液中 8-OHdG 平均值濃度分別為  $1.74 \pm 0.4 \text{ nmol}$  及  $1.45 \pm 0.1 \text{ nmol}$  ( $p = 0.048$ ) 。在經尿中肌酸酐校正後 , 惡性乳癌腫瘤患者尿液中 8-OHdG / crea. 平均值濃度為  $16.39 \pm 17.3 \text{ umol / mol crea.}$  仍較良性腫瘤患者  $8.36 \pm 4.5 \text{ umol / mol crea.}$  高 , 取 log 之後尿液中 8-OHdG 平均值濃度分別為  $1.01 \pm 0.4 \text{ nmol}$  及  $0.86 \pm 0.3 \text{ nmol}$  ( $p = 0.325$ ) 。經個人體重排尿量校正後 , 惡性乳癌腫瘤患者尿液中 8-OHdG/kg 平均值為  $676.82 \pm 608.0 \text{ pmol / kg}$  亦較良性腫瘤患者  $274.99 \pm 78.4 \text{ pmol / kg}$  為高 , 在取

log 之後尿液中 8-OHdG 平均值濃度分別為  $2.67 \pm 0.4 \text{ nmol}$  及  $2.42 \pm 0.1 \text{ nmol}$  ( $p = 0.078$ )。在尿中肌酸酐比較上，惡性乳癌腫瘤患者平均值為  $68.9 \pm 35.4 \text{ mg/dl}$  較良性腫瘤患者  $52.98 \pm 32.6 \text{ mg/dl}$  為高，各變項之比較除在尿液 8-OHdG 濃度取 log 之後有統計上差異外，其餘均未達統計上之差異。

表六為良性腫瘤患者與健康婦女尿液中 8-OHdG 濃度及經肌酸酐與體重校正之比較。良性腫瘤患者尿液中 8-OHdG 平均值濃度  $29.29 \pm 8.1 \text{ nmol}$  較健康婦女  $33.14 \pm 18.1 \text{ nmol}$  為低，在取 log 之後尿液中 8-OHdG 平均值濃度分別為  $1.45 \pm 0.1 \text{ nmol}$  及  $1.47 \pm 0.2 \text{ nmol}$  ( $p = 0.768$ )。在經尿中肌酸酐校正後，良性腫瘤患者尿液中 8-OHdG / crea. 平均值濃度為  $8.36 \pm 4.5 \text{ umol / mol crea.}$  較健康婦女  $4.70 \pm 7.1 \text{ umol / mol crea.}$  為高，在取 log 之後尿液中 8-OHdG 平均值濃度分別為  $0.86 \pm 0.3 \text{ nmol}$  及  $0.52 \pm 0.3 \text{ nmol}$  ( $p = 0.005$ )。經個人體重排尿量校正後，良性腫瘤患者尿液中 8-OHdG/kg 平均值為  $274.99 \pm 78.4 \text{ pmol / kg}$  較健康婦女  $286.37 \pm 160.7 \text{ pmol / kg}$  為低，在取 log 之後尿液中 8-OHdG 平均值濃度分別為  $2.42 \pm 0.1 \text{ nmol}$  及  $2.41 \pm 0.2 \text{ nmol}$  ( $p = 0.801$ )。在尿中肌酸酐比較上，良性腫瘤患者平均值為  $52.98 \pm 32.6 \text{ mg/dl}$  較健康婦女  $116.77 \pm 56.9 \text{ mg/dl}$  為低。各變項之比較除在尿液 8-OHdG 含量經肌肝酸校正取 log 之後有統計上差異外，其餘均未達統計上之顯著性差異。

表七為惡性乳癌腫瘤患者分期後尿液中 8-OHdG 濃度及肌酸酐與體重校正後之比較。在惡性乳癌腫瘤患者第一期、第二期及第三期尿液中 8-OHdG 平均值濃度分別為  $105.57 \pm 87.8 \text{ nmol}$ 、 $72.11 \pm 62.7 \text{ nmol}$  及  $27.97 \pm 9.0 \text{ nmol}$ ，在統計上並未有差異 ( $p = 0.06$ )。經尿中肌酸酐校正後，尿液中 8-OHdG / crea. 平均值濃度有隨癌症期數增加其值有遞減趨勢，分別為  $21.38 \pm 17.0$ 、 $14.18 \pm 17.9$  及  $6.14 \pm 4.2 \text{ umol / mol crea.}$ ，

不過三組並未達統計上差異。若經個人體重排尿量校正後，尿液中 8-OHdG/kg 平均值分別為  $860.86 \pm 727.7$ 、 $603.7 \pm 506.6$  及  $246.69 \pm 82.0$  pmol/ kg，與前兩者有相同趨勢，其統計檢定在邊緣 ( $p = 0.07$ )。在三組尿中肌酸酐之比較，平均值分別為  $63.7 \pm 29.2$ 、 $71.96 \pm 37.9$  及  $74.88 \pm 51.9$  mg/dl，均未達統計上之差異。

### 第三節、影響尿液中 8-OHdG 之單變項及多變項分析

表八為影響健康婦女尿液中 8-OHdG 之單變項分析，尿液中 8-OHdG 值在經肌肝酸及體重分別校正後，在年齡、哺乳胎次、初經年齡、停經、吃避孕藥習慣、家族史、喝酒、喝茶及喝咖啡等變項中均未達統計上之顯著性差異。在抽菸變項中有暴露二手煙者顯著性高於沒有二手煙暴露者，不過本研究健康婦女只有一位為二手煙暴露者。

表九為影響惡性乳癌腫瘤患者尿液中 8-OHdG 之單變項分析，尿液中 8-OHdG 在經肌肝酸及體重分別校正後，在年齡、哺乳胎次、初經年齡、停經、吃避孕藥習慣、家族史、喝茶等變項中均未達統計上之顯著性差異。在喝咖啡變項中，只有喝者尿液中 8-OHdG / crea. 平均值濃度為  $28.38 \pm 27.6$  較未喝者  $13.99 \pm 13.6$  高，且有達統計上之顯著性差異 ( $p < 0.05$ )，不過 8-OHdG 經體重校正則未有統計上之差異。

表十為影響尿中 8-OHdG 之多變項分析，尿液中 8-OHdG 在經肌肝酸校正後，在初經年齡、停經、吃避孕藥習慣、抽煙等變項中均未達統計上之顯著性差異。在病例組與對照組變項中，於肌肝酸校正前後均有顯著性之差異 ( $p < 0.001$ )。在喝咖啡變項中，在經肌肝酸校正後，尿中 8-OHdG 濃度與喝咖啡呈現正相關，且達統計上之差異 ( $p < 0.01$ )。

#### 第四節、影響乳癌之羅吉斯迴歸分析

表十一為影響乳癌之羅吉斯迴歸分析，8-OHdG 的值愈高發生乳癌危險性愈高 (OR=1.14)。在哺乳胎次方面，哺乳胎次增加發生乳癌危險性降低。初經年齡較早發生者其乳癌發生危險性愈高 (OR=2.97)，但並未達統計上的顯著性差異。在有吃避孕藥方面，有吃者其發生乳癌危險性較未吃者高 (OR=11.09)。而有家族史亦較未有家族史其發生乳癌危險性亦較高 (OR=3.89)。

#### 第五節、尿中 8-OHdG 濃度之 ROC 曲線

附圖七為惡性乳癌患者與健康婦女尿中 8-OHdG 濃度 ROC 曲線，當尿中 8-OHdG 濃度選擇 45nM 為篩檢的濃度切點時，則敏感度為 69%、精確度為 75%，PPV 為 73%，NPV 為 71%；當尿中 8-OHdG 濃度選擇 40nM 為切點時，則敏感度可達 71%、精確度為 65%，PPV 為 67%，NPV 為 69%。附圖八為惡性與良性腫瘤尿中 8-OHdG 濃度 ROC 曲線，當尿中 8-OHdG 濃度選擇 35nM 為切點時，則敏感度為 73%、精確度 76%，PPV 為 96%，NPV 為 27%；當尿中 8-OHdG 濃度選擇 36nM 為篩檢的濃度切點時，則敏感度為 73%、精確度 80%，PPV 為 96%，NPV 為 28%。附圖九為惡性乳癌腫瘤第一期與第二期患者尿中 8-OHdG 濃度 ROC 曲線，當尿中 8-OHdG 濃度選擇 90nM 為切點時，則敏感度為 57%、精確度 61%，PPV 為 53%，NPV 為 35%；當尿中 8-OHdG 濃度選擇 95nM 為切點，則敏感度為 54%、精確度 64%，PPV 為 54%，NPV 為 64%。附圖十為惡性乳癌腫瘤第一期與第三期尿中 8-OHdG 濃度 ROC 曲線，當尿中 8-OHdG 濃度選擇 36nM 為篩檢的濃度切點時，則敏感度為 79%、精確度 81%，PPV 為 95%，NPV 為 45%；當尿中 8-OHdG 濃度選擇 40nM 為切點，則敏感度為 77%、精確度 90%，PPV 為 97%，NPV 為 45%。

## 第五章、討 論

### 第一節、分析方法之探討

在國外研究中仍以 HPLC-ECD 為主要研究方法，在一些研究中有以 GC-MS、LC-MS or LC-MS-MS 來分析，雖然價格較 HPLC-ECD 為貴，但若能精準的定量出 8-OHdG 濃度，又為一般實驗成本所接受，似乎 HPLC-ECD 是一個適宜可行測定 8-OHdG 的方法。

本研究主要是針對人體尿液中 8-OHdG 濃度進行測定，分析方法主要是引用張氏 (1998)<sup>(38)</sup>，利用兩段固相萃方法萃取尿液中 8-OHdG，再經高效液相層析儀附電化學偵測器以進行分析。在儀器穩定度方面，當酸鹼檢測器 (pH meter) 斜率為 98 % 以上時所調緩衝溶液 A (pH3.5)，則 8-OHdG 滯留時間會在 19 分鐘左右，當斜率在 97 % 以下時所調緩衝溶液 solution A (pH3.5) 則會使 8-OHdG 滯留時間提前至在 18 分鐘左右，實驗中為了保持儀器滯留時間穩定性，故要經常更換校正液以維持酸鹼檢測器 (pH meter) 斜率。此外當高效液相層析儀之過濾器 (Frit) 使用次數超過 50 個尿液樣本時，會因尿液樣本過多雜質造成過濾器阻塞，而會使 8-OHdG 滯留時間延至 20 分鐘左右，因此需定時更換過濾器以維持儀器滯留時間再現性。此外，為了解 8-OHdG 經淨化管萃取後在真空乾燥 (45<sup>0</sup>C) 下的過程中是否會影響 8-OHdG 之濃度，因此將 8-OHdG 標準品配製後經同樣樣本萃取處理後分別在真空乾燥 1 及 1.5 小時 (45<sup>0</sup>C) 下進行，結果顯示真空乾燥的時間中並不會減少樣品中 8-OHdG 之濃度。

本研究中在當電化學偵測器 Full scale range 設定為 500nA 時，對於濃度較高之樣本偵測上，會因其偵測感度問題而將雜質一同與樣本計算，而造成高估 8-OHdG 之值情形，故在本研究中將 Full scale range 設定為 50nA，以避免造成高估現象。而在 Germadnik 等人 (1997)<sup>(22)</sup>

研究結果中顯示在電化學偵測器之 Full scale range 設定為 50nA 時，其方法之偵測極限為 0.9 nM，在本研究中則配合樣本濃度範圍所得偵測極限為 2.94nM 較其略高。在尿液 8-OHdG 萃取回收率方面，本研究中回收率平均約為 92.8 % 則較 Germadnik 等人( 1997 )<sup>(14)</sup>回收率 45.8 % 為高。於本研究儀器穩定測試方面，分別以二種不同濃度 55nM 及 440nM 之 8-OHdG 標準溶液進行測試，在附表二結果顯示上無論在面積高度或滯留時間上之變異係數 ( CV % ) 均在 7 % 範圍內。在尿液樣本儲存穩定性方面，尿液樣本分別於第 0、2、7、14 及 21 天不同時間進行分析，於附表四中結果顯示尿液樣本儲存在-60 時，於 21 天內分析可達 98 % ，並不會影響尿液中 8-OHdG 之濃度，所以尿液樣本可儲存於-60 下至少約一個月等待其分析，而不會影響尿液中 8-OHdG 之濃度。

## 第二節、影響 8-OHdG 之相關因素

影響尿液中 8-OHdG 的因素很多，除了外來的化學物質 (benzene,benzo[a]pyrene)、物理性刺激(輻射線)等還包括性別、年齡、抽菸、喝酒、飲食、體重等均會影響尿中 8-OHdG 之分泌。在本研究中以單變項交叉統計比較得知，在健康婦女中年齡與尿液中 8-OHdG 濃度並無相關，而在年齡分層後其尿液中 8-OHdG 濃度則隨著年齡增加略有增加趨勢，不過仍未達統計上顯著性差異，在 Lodovici( 2000 )<sup>(32)</sup> 研究中其 8-OHdG 濃度會隨年齡增高而增加 (  $r=0.337$ ,  $p<0.05$  )，結果相比較上略有相同，作者藉由其結果以及 Degan ( 1995 )<sup>(45)</sup> 和 Hayakawa ( 1992 )<sup>(30)</sup> 文獻中證實氧化傷害會隨著年齡增高而增加趨勢。

在健康婦女抽菸對 8-OHdG 濃度影響方面，由於本研究中只有一人有暴露於二手煙的環境下，其他人皆為無抽菸，故造成暴露於二手菸者其尿液中 8-OHdG 濃度比無抽菸來的高，且達顯著性差異

( $p < 0.05$ ), 此與 Zeeland (1999)<sup>(31)</sup> 研究中抽菸者比不抽菸者高的結果相同, 不過本研究由於樣本數過少, 尚需更多樣本來佐證。在喝咖啡方面, 健康婦女有喝咖啡尿液中 8-OHdG 濃度比無喝者略高, 但並未達統計上差異, 與 Zeeland (1999)<sup>(31)</sup> 研究中的結果略同 (每天喝 4 杯咖啡以上其 8-OHdG 濃度高於不喝者, 但在每天喝 1 杯、1-2 杯、3-4 杯結果上卻是呈現逆相關), 不過由於作者於研究中未將抽煙及非抽煙進行分層, 故推測此可能與抽煙或者體內 DNA 修復功能有關; 但在本研究中 8-OHdG/crea. 的值, 惡性乳癌腫瘤患者中喝咖啡者與無喝者卻達統計上差異 ( $p < 0.05$ ), 若經多變項迴歸分析仍顯示喝咖啡有達統計上差異。本研究中惡性乳癌腫瘤患者與健康婦女皆為不抽煙、不喝酒, 控制了可能的影響因子, 故推測喝咖啡可能造成體內產生過多的含氧自由基 (ROS), 進而造成 DNA 的氧化性損害, 此外咖啡因的成分以及沖泡種類 (沖泡式、研磨式) 亦可能造成 8-OHdG 含量上的差異存在, 所以此因素應需再進一步探討此差異性的真實性。

### 第三節、尿液中 8-OHdG 之分析

本研究在惡性乳癌腫瘤患者與健康婦女尿液中 8-OHdG 濃度比較上, 惡性乳癌腫瘤患者尿液中 8-OHdG 濃度為 81.81nM 顯著性比健康婦女 33.14 nM 來的高, 有統計上之差異 ( $p < 0.001$ ); 而在經肌肝酸及體重校正後亦是相同結果。在國外相關文獻方面, 尚未有針對乳癌患者與健康婦女尿液中 8-OHdG 的相關性研究, 不過在乳癌組織方面有相關性之研究, Nagashima (1995)<sup>(26)</sup> 在研究乳癌組織及周圍健康組織中, 結果顯示癌症組織及周圍健康組織並無統計上之差異, 推測可能是因為 DNA 在癌細胞中仍具有修復功能之故。

在其他疾病方面像 Tsuboi 等人 (1998)<sup>(23)</sup> 研究過敏性皮膚炎與健康人尿液中 8-OHdG 之比較, 結果顯示患有過敏性皮膚炎尿液中 8-OHdG 值比健康人高 ( $p < 0.0001$ ), 推測過敏性皮膚炎會造成過多

ROS 而加速 DNA 氧化性損害，因而產生大量 8-OHdG 排入尿液中；另外在 Honda(2000)<sup>(39)</sup> 研究血液疾病與健康人尿液中 8-OHdG 之比較中，白血病患者尿液中 8-OHdG 濃度 (25.3±12.9 ng/mg) 比健康人尿液中 8-OHdG 濃度 (11.9±7.3 ng/mg) 為高，且達到統計上之差異 ( $p<0.05$ )。

在惡性乳癌腫瘤患者與良性腫瘤患者兩組尿液中 8-OHdG 濃度之比較，結果顯示惡性腫瘤患者尿液中 8-OHdG 濃度也較良性腫瘤患者來的高，但未達統計上差異 ( $p=0.052$ )，而在經取 log 後則達統計上之顯著性差異 ( $p=0.048$ )，其差異可能原因與良性腫瘤患者樣本數過少 ( $n=8$ ) 有關。而在健康婦女與良性腫瘤患者尿液中 8-OHdG 濃度比較方面，8-OHdG (nM) 濃度上健康婦女 (33.14±18.1) 比良性腫瘤患者 (29.29±8.1) 略高，不過未達統計上的差異；經肌肝酸校正兩組仍未達統計上之差異；不過 8-OHdG 經取 log 後在經肌肝酸校正後，健康婦女 8-OHdG 的值比良性腫瘤患者為低，且達統計上之差異 ( $p<0.05$ )；此結果可能與良性腫瘤患者在手術時其攝食狀況及運動較健康婦女有明顯之差異，且在收集尿液時以導尿方式收集，其尿量偏低原因所致。

在對惡性乳癌腫瘤患者分期後尿液中 8-OHdG 濃度比較方面，本研究結果上顯示不論在經肌肝酸或體重校正後，第一期惡性腫瘤患者尿液中 8-OHdG 濃度高於第二期與第三期患者，而第二期惡性腫瘤患者尿液中 8-OHdG 濃度亦高於第三期患者，雖然皆未達統計上顯著差異，此結果與 Matsu(2000)<sup>(40)</sup> 研究結果相似，作者推測 oxygen radicals 可能在早期癌化過程中參與有關，作者引述 Okamoto 等人報告，在腎臟細胞癌中修補酵素 hMTH1 會在初期中大量產生，所以推測修補酵素會在乳癌初期大量產生，此外 DNA 鍵結物會在疾病初期藉由 DNA 複製而被稀釋，因此在惡性腫瘤分期中，其第一期患者尿液中 8-OHdG

濃度會高於第二期、第三期患者。

因此由本研究結果中推測惡性乳癌腫瘤第一期及第二期患者體內 DNA 受到氧化損害情形較健康婦女來的嚴重，因此尿中代謝出的 8-OHdG 濃度較健康婦女高，而第三期患者尿中代謝出的 8-OHdG 濃度與健康婦女相差不多可能是由於第三期患者體內修補及代謝能力降低原因，因此第三期患者尿中代謝出的 8-OHdG 濃度與健康婦女相差不多之原因。

由本研究 ROC 曲線結果中，當以尿中 8-OHdG 濃度 45nM 作為篩檢本研究樣本惡性乳癌患者與健康婦女時，其篩檢敏感度可達 69 %，精確度為 75 %，PPV 為 73 %。而目前研究中結果中在乳房 X 光攝影敏感度為 86.1 %，特異性為 77.3 %，PPV 為 67.4 %；超音波乳房檢查敏感度為 92.6 %，精確度為 93.2 %；細針抽取細胞檢查精確度為 88.1 % 而 PPV 為 98.4 %。當欲以此篩檢方法推行至全國篩檢時，應再進一步考量其成本、精確性以及實用性。

## 第陸章、結論與建議

### 結論

- 1、本研究參考國外之相關研究，建立國內惡性乳癌及健康婦女尿液中 8-OHdG 之適宜分析。
- 2、由本研究結果中惡性乳癌患者與尿液中 8-OHdG 有統計之相關性。因此可利用尿中 8-OHdG 濃度可表示乳癌所產生之 DNA 損害，對人體早期危害提供良好的生物指標。
- 3、個人嗜好（喝咖啡）有可能使體內產生過多含氧自由基（ROS），進而造成 DNA 損害性增加，而使尿液中 8-OHdG 含量增加，此外咖啡因的成分以及沖泡種類（沖泡式、研磨式）亦可能造成 8-OHdG 含量上的差異存在，所以應需再進一步探討此差異性的存在。
- 4、影響乳癌發生危險性上，當 8-OHdG 的值愈高發生乳癌危險性亦隨之增高（OR = 1.14）。婦女哺乳胎次增加時發生乳癌危險性則降。初經年齡較早發生者其乳癌發生危險性會增高。在吃避孕藥方面，有吃避孕藥者其發生乳癌危險性較未吃者為高，而有家族史亦較未有家族史其發生乳癌危險性亦較高。

## 建議

- 1、應收集更多乳癌患者樣本數，以減少統計 power 不足所造成的偏差。進而嘗試以 8-OHdG 當作臨床診斷及療效評估之生物指標可行性。
- 2、若能同時收集乳房組織與尿液中 8-OHdG 之相關性，更能進一步了解乳癌作用機轉，提供預防乳癌發生危險性。
- 3、在分析 8-OHdG 之分析方法應以其他更靈敏之分析方法與 HPLC-ECD 來比較，如 LC-MS or LC-MS-MS，以確定 HPLC-ECD 分析之準確性。
- 4、探討尿中 8-OHdG 量是否會因個人基因多形性 ( GSTP1、COMT ) 有關，尚待進一步評估。

## 參考文獻

- 1.行政院衛生署網站 , [www.doh.gov.tw](http://www.doh.gov.tw)
- 2.郭俊逸 , 癌症的現代觀。合記圖書出版社 1996。
- 3.黃思誠 , 婦科腫瘤學。華香園出版社 1998。
- 4.陳啟明、雷永耀、彭芳谷 , 乳房疾病。九州圖書文物公司 1991。
- 5.張金堅 , 乳房醫學。健康世界雜誌社 1999。
6. Staszewski J. Age at menarche and breast cancer .J Natl Cancer Inst 1971; 47: 935.
7. Lilienfeld A.The relationship of cancer of the female breast to artificial menopause and marital status. Cancer 1956; 9: 927.
8. Brinton LA, Hoover RN, Szklo M. Menopausal estrogen use and risk of breast cancer. Cancer 1981; 47: 2517.
9. Carroll KK, Hopkins GJ. Dietary polyunsaturated fat versus saturated fat in relation to mammary carcinogenesis. Lipids 1979; 14: 155.
- 10.Anderson DE, Badaioch MD. Risk of familial breast cancer. Cancer 1985; 56: 383.
- 11.Jenny Chang-Claude, Nancy Eby, Mation Kiechle, Gunter Bastert, Heiko Becher. Breastfeeding and breast cancer risk bu age 50 among women in Germany. Cancer Causes and Control 2000; 11: 687-695.
- 12.黃經 , 實用內外科婦理 , 華杏出版社。 1996。

13. Devasagayam TPA, Steenken S, Obendorf MSW, Schulz WA, Sies H. Formation of 8-hydroxy ( deoxy ) guanine and generation of strand breaks at guanine residues in DNA by singlet oxygen. *Biochemistry* 1991;30: 6283-6289.
14. Floyed RA, West MS, Eneff KL, Hogestt WE, Tingey DT. Hydroxyl free radical mediated formation of 8-hydroxyguanine in isolated DNA. *Arch Biochem Biophys* 1988; 262: 266-272.
15. Sumiko I, Shosuke K. Oxidative DNA damage induced by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide. *FEBS Lett* 1995; 371: 86-88.
16. Roy D, Floyd RA, Liehr JG. Elevated 8-hydroxydeoxyguanosine levels in DNA of diethylstilbestrol-treated Syrian hamster: covalent DNA damage by free radicals generated by redox cycling of diethylstilbestrol. *Cancer Res* 1991; 51: 3882-3885.
17. Dizdaroglu M. Formation of an 8-hydroxyguanine moiety in deoxyribonucleic acid on  $\alpha$ -irradiation in aqueous solution. *Biochemistry* 1985; 24: 4476-4481.
18. Barry Halliwell, John M.C. Gutteridge. *Free Radicals in Biology and Medicine* 1999.
19. Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, Nishimura S, Loeb LA. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, cause G T and A C substitution. *J Biol Chem* 1992; 267: 166-172.
20. Dizdaroglu M. Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutat Res* 1992; 275: 331-342.
21. D Germadnil, A. Pilger, H.W. Rudiger. Assay for the determination of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatography B* 1997; 689: 399-403.

22. Shinya Asami, Hideo Manabe, Jun Miyake, Yosuke Tsurudome, Takeshi Hirano, Raizo Yamaguchi, Hideaki Itoh, Hiroshi Kasai. Cigarette smoking induces an increase in oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in a central site of the human lung. *Carcinogenesis* 1997; 18: 1763-1766.
23. H. Tsuboi, K. Kouda, H. Takenchi, M. Takigawa, Y. Masamoto, M. Takeuchi, H. Ochi. 8-Hydroxydeoxyguanosine in urine as an index of oxidative damage to DNA in the evaluation of atopic dermatitis. *British Journal of Dermatology* 1998. 138: 1033-1035.
24. Ryuya Shimoda, Makoto Nagashima, Michiie Sakamoto, Naohito Yamaguchi, Setsuo Hirohashi, Jun Yokota, Hiroshi Kasai. Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in human livers with chronic hepatitis. *Cancer Research* 1994; 54: 3171-3172.
25. Christer Tagesson, Magnus Kallberg, Gun Wingren. Urinary malondialdehyde and 8-hydroxydeoxyguanosine as potential markers of oxidative stress in industrial art glass workers. *Int Arch Occup Environ Health* 1996; 69: 5-13.
26. Makoto Nagashima, Hitoshi Tsuda, Seiichi Takenoshita, Yukio Nagamachi, Setsuo Hirohashi, Jun Yokota, Hiroshi Kasai. 8-Hydroxydeoxyguanosine levels in DNA of human breast cancers are not significantly different from those of non-cancerous breast tissues by the HPLC-ECD method. *Cancer letters* 1995; 90: 157-162.
27. Loft S., Fischer-Nielsen A., Jeding I.B., Vistisen K. and Poulsen H.E. 8-Hydroxydeoxyguanosine As Urinary Biomarker of Oxidative DNA Damage. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 1993; 40: 391-404.
28. Fraga C.G., Shigenaga M.K., Park J.W., Degan P. and Ames B.N. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 4533-4537.

29. Sai K., Takagi A., Umemura T., Hasegawa R. and Kurokawa Y. Changes of 8-hydroxydeoxyguanosine levels in rat organ DNA during the aging process. *Journal of Environmental Pathology and Oncology* 1992; 11: 139-143.
30. Hayakawa M., Torii K., Sugiyama S., Tanaka M. and Ozawa T. Age-associated accumulation of 8-hydroxydeoxyguanosine in mitochondrial DNA of human diaphragm. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1991; 179: 1023-1029.
31. Albert A. van Zeeland, Anton J.L. de Groot, Janet Hall, Francesco Donato. 8-Hydroxydeoxyguanosine in DNA from leukocytes of healthy adults: relationship with cigarette smoking, environmental tobacco smoke, alcohol and coffee consumption. *Mutation Research* 1999; 439: 249-257.
32. Maura Lodovici, Chiara Casalini, Roberta Cariaggi, Lucia Michelucci, Piero Dolara. Levels of 8-hydroxydeoxyguanosine as a marker of DNA damage in human leukocytes. *Free Radical Biology and Medicine* 2000; 28: 13-17.
33. Loft S., Vistisen K., Ewertz M., Overvad K. and Poulsen H.E., Oxidative DNA damage estimated by 8-hydroxydeoxyguanosine excretion in humans: influence of smoking, gender and body mass index. *Carcinogenesis* 1992; 13: 2241-2247.
34. Kiyosawa H., Suko M., Okudaira H., Murata K., Miyamoto T., Chung M.H., Kasai H and Nishimura S. Cigarette smoking induces formation of 8-hydroxydeoxyguanosine, one of the oxidative DNA damage in human peripheral leukocyte. *Free Radical Research Communications* 1990; 11: 23-27.
35. Nakajima M. Takeuchi T., Takeshita T. and Morimoto K. 8-hydroxydeoxyguanosine in human leukocyte DNA and daily health practice factors: effects of individual alcohol sensitivity. *Environmental Health Perspectives* 1996; 104: 1336-1338.

36. Inoue T., Mu Z., Sumikawa K., Adachi K and Okochi T. Effect of physical exercise on the content of 8-hydroxydeoxyguanosine in nuclear DNA repared from human lymphocytes. *Japanese Journal of Cancer Research* 1993; 84: 720-725.
37. Pilger A.,Germadnik D., Formanek D., Zwick H., Winkler N.and Rudiger H.W. Habitual long-distance running dose not enhance urinary excretion of 8hydroxydeoxyguanosine. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology* 1997; 75: 467-469.
- 38.張淑芬，銻電鍍工廠勞工尿液中 8-Hydroxy-2' -deoxyguanosine 之研究。中國醫藥學院碩士論文 1999。
- 39.Miyuki Honda, Yasuaki Yamada, Masao Tomonaga, Hiroshi Ichinose, Shimeru Kamihira. Correlation of urinary 8-hydroxy-2' -Deoxyguanosine(8-OHdG), a biomarker of oxidative DNA damage, and clinical features of hematological disorders: a pilot study. *Leukemia Research* 2000; 24: 461-468.
- 40.Akira Matsui, Tadashi Ikeda, Kohji Enomoto, Kanae Hosoda, Hiroshi Nahashima, Kazuyuki Omae, Mamoru Watanabe, Toshifumi Hibi, Masaki Kitajima. Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2' -deoxyguanosine, in human breast cancer tissue and its relationship to GSTP1 and COMT genotypes. *Cancer Letters* 2000; 151: 87-95.
- 41.J. Musarrat, J. Arezina-Wilson, and A.A Wani. Prognostic and Aetiological Relevance of 8-Hydroxyguanosine in Human Breast Carcinogenesis. *European Journal of Cancer* 1996; 32: 1209-1214.
- 42.Hiroshi Kasai. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2' -deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutation Research* 1997; 387: 147-163.

- 43.A. Floyd. The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1990; 11: 1447-1450.
- 44.沈志陽，台灣乳癌的研究。科學發展月刊 2000；第 28 卷第 9 期：  
675-678。
- 45.Degan P. Bonassi S. De Caterina M. Korkina G.L. Pinto L. Scopacasa F. Zatterle A. Calzone R. Pagano G. In vivo accumulation of reaction of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA correlates with release of reactive oxygen species in Fanconi's anaemia families. *Carcinogenesis* 1995; 16 : 735-742.
- 46.Byung Mu Lee, Seung Ki Lee, Hyung Ski Kim. Inhibition of oxidative DNA damage, 8-OHdG, and carbonyl contents in smokers treated with antioxidants(vitamin E, vitamin C,  $\beta$ -carotene and red ginseng). *Cancer Letters* 1998 ; 132 : 219-227.

表一、惡性乳癌腫瘤患者與對照組基本資料之比較

變項	惡性腫瘤(n=60) n (%)	對照組(n=60) n (%)	p值
年齡	49.0±10.1	49.6±10.9	0.748
籍貫			<0.01*
	閩南人	32 (53.3)	
	客家人	26 (43.3)	
	外省人	2 (3.3)	
職業			0.029
	公	8 (13.3)	
	教	2 (3.3)	
	農業	5 (8.3)	
	工	4 (6.7)	
	商	2 (3.3)	
	自由業	1 (1.7)	
	家管	37 (61.7)	
	其他	1 (1.7)	
教育程度			0.371
	國小以下	31 (51.7)	
	國中	8 (13.3)	
	高中	13 (21.7)	
	大學以上	8 (13.3)	
婚姻狀況			0.261
	未婚	0 (0)	
	已婚	56 (93.3)	
	其他	4 (6.7)	
家族史			0.017*
	無	48 (80.0)	
	有	12 (20.0)	

X<sup>2</sup>- test

\* : p < 0.05

表二、惡性乳癌腫瘤患者與對照組嗜好及生活習慣之比較

變項	惡性腫瘤(n=60) n (%)	對照組(n=60) n (%)	p值*
抽菸習慣	0 (0)	1 (1.7)	0.315
喝酒習慣	0 (0)	3 (5.0)	0.215
喝茶習慣	23 (38.3)	34 (56.7)	0.044*
咖啡習慣	10 (16.7)	22 (36.7)	0.013*

\*:  $p < 0.05$

表三、惡性乳癌腫瘤患者與對照組生育之比較

變項	惡性腫瘤(n=60) n (%)	對照組(n=60) n (%)	p值
初經年齡	14.2±1.4	14.5±1.4	0.006*
吃避孕藥	13 (21.7)	2 (3.3)	0.002*
懷孕	56 (93.3)	54 (90.0)	0.509
哺乳	32 (53.3)	46 (76.7)	0.007*
停經	25 (41.7)	20 (33.3)	0.346
懷孕胎數			0.062
0~2	25 (38.9)	13 (21.7)	
3~4	27 (48.1)	36 (60.0)	
5以上	8 (13)	11 (18.3)	
生育胎數			0.158
0~2	29 (48.3)	19 (31.7)	
3~4	26 (43.3)	36 (60.0)	
5以上	5 (8.3)	5 (8.3)	
人工流產次數			0.432
0	45 (80.4)	37 (69.8)	
1	6 (10.7)	10 (18.9)	
2以上	5 (8.9)	6 (11.3)	
哺乳胎數			0.004*
0	28 (46.7)	14 (23.3)	
1~2	16 (26.7)	13 (21.7)	
3以上	16 (26.7)	33 (55.0)	
身體質量指數 (BMI kg/m <sup>2</sup> )	24.16±3.4	24.12±3.2	0.943

\*: p < 0.05

表四、惡性乳癌腫瘤患者與對照組尿液中生物指標之比較

變項	惡性腫瘤(n=60) 平均值 ± 標準差 ( range )	對照組(n=60) 平均值 ± 標準差 ( range )	p值
8-OHdG(nmol)	81.81±74.4 (15.45~354.27)	33.14±18.1 ( 16.86~101.81 )	<0.001*
8-OHdG/crea.( μ mol/mol)	16.39±17.3 (1.64~90.01)	4.70±7.1 (0.94~53.22)	<0.001*
8-OHdG(pmol/kg)	676.82±608.0 (131.09~3163.11)	286.37±160.7 (127.62~808.53)	<0.001*
creatinine(mg/dl)	68.9±35.4 (18.20~158.60)	116.77±56.9 (18.20~306.8)	<0.001*

\* : p<0.001

表五、惡性乳癌腫瘤患者與良性腫瘤尿液中生物指標之比較

變項	惡性腫瘤(n=60) 平均值 ± 標準差 ( range )	良性腫瘤(n=8) 平均值 ± 標準差 ( range )	p值
8-OHdG(nmol)			
未取對數	81.81±74.4 (15.45~354.27)	29.29±8.1 ( 21.64~46.95 )	0.052
取對數	1.74±0.4 ( 1.19~2.55 )	1.45±0.1 ( 1.34~1.67 )	0.048*
8-OHdG/crea.( μ mol/mol)			
未取對數	16.39±17.3 (1.64~90.01)	8.36±4.5 (3.32~15.63)	0.198
取對數	1.01±0.4 ( 0.22±1.95 )	0.83±0.3 ( 0.52±1.19 )	0.325
8-OHdG(pmol/kg)			
未取對數	676.82±608.0 (131.09~3163.11)	274.99±78.4 (180.32~419.24)	0.068
取對數	2.67±0.4 ( 2.12±3.50 )	2.42±0.1 ( 2.26±2.62 )	0.078
creatinine(mg/dl)	68.9±35.4 (18.20~158.60)	52.98±32.6 (18.20~114.40)	0.235

\* : p<0.05

表六、良性腫瘤與對照組尿液中生物指標之比較

變項	良性腫瘤(n=8) 平均值 ± 標準差 ( range )	對照組(n=60) 平均值 ± 標準差 ( range )	p值
8-OHdG(nmol)			
未取對數	29.29±8.1 ( 21.64~46.95 )	33.14±18.1 ( 16.86~101.81 )	0.556
取對數	1.45±0.1 ( 1.34~1.67 )	1.47±0.2 ( 1.23±2.01 )	0.768
8-OHdG/crea.( μ mol/mol)			
未取對數	8.36±4.5 ( 3.32~15.63 )	4.70±7.1 ( 0.94~53.22 )	0.160
取對數	0.83±0.3 ( 0.52±1.19 )	0.52±0.3 ( 0.03±1.73 )	0.005*
8-OHdG(pmol/kg)			
未取對數	274.99±78.4 ( 180.32~419.24 )	286.37±160.7 ( 127.62~808.53 )	0.845
取對數	2.42±0.1 ( 2.26±2.62 )	2.41±0.2 ( 2.11±2.91 )	0.801
creatinine(mg/dl)			
	52.98±32.6 ( 18.20~114.40 )	116.77±56.9 ( 18.20~306.8 )	0.003*

\* : p<0.05

表七、惡性乳癌腫瘤患者分期之尿液中生物指標之比較

變項	第一期(n=24) 平均值 ± 標準差 ( range )	第二期(n=31) 平均值 ± 標準差 ( range )	第三期(n=5) 平均值 ± 標準差 ( range )	p值
8-OHdG (nmol)	105.57±87.8 (16.36~354.27)	72.11±62.7 ( 15.45~216.43 )	27.97±9.0 ( 19.39~42.03 )	0.059
8-OHdG/crea. ( μ mol/mol)	21.38±17.0 (1.87~56.55)	14.18±17.9 (1.64~90.01)	6.14±4.2 (2.33~13.11)	0.118
8-OHdG (pmol/kg)	860.86±727.7 (138.68~3163.11)	603.7±506.6 (131.09~1939.54)	246.69±82.0 (191.79~389.19)	0.074
Creatinine (mg/dl)	63.7±29.2 (28.60~124.80)	71.96±37.9 (23.40~158.60)	74.88±51.9 (18.20~132.60)	0.651

表八、影響健康婦女尿中 8-OHdG 之單變項分析

變項	n	8-OHdG/crea (umol/mol)	p 值	8-OHdG (pmol/kg)	p 值
年齡			0.971		0.946
<40	11	4.22 ± 2.3 <sup>a</sup>		275.47 ± 118.2	
40-60	39	4.80 ± 8.3		291.48 ± 165.8	
>60	10	4.83 ± 5.4		278.44 ± 193.6	
哺乳胎次			0.780		0.940
0	14	4.62 ± 2.2		276.35 ± 114.2	
1-2	13	3.54 ± 3.0		298.48 ± 172.3	
>2	33	5.19 ± 9.3		285.85 ± 176.3	
初經年齡			0.441		0.558
<14	11	7.17 ± 7.1		231.51 ± 84.4	
14-16	41	4.21 ± 3.4		298.82 ± 165.7	
>16	8	3.80 ± 1.8		279.85 ± 185.7	
停經			0.882		0.441
無	40	4.80 ± 8.1		297.78 ± 158.1	
有	20	4.50 ± 4.3		263.54 ± 167.7	
吃避孕藥習慣			0.701		0.692
無	58	4.76 ± 7.2		287.91 ± 163.3	
有	2	2.79 ± 0.3		241.63 ± 12.7	
家族史			0.601		0.365
無	48	4.94 ± 7.8		295.86 ± 173.6	
有	12	3.73 ± 2.4		248.42 ± 88.4	

a : 平均值 ± 標準差

表八、影響健康婦女尿中 8-OHdG 之單變項分析 (續)

變項	n	8-OHdG/crea (umol/mol)	p 值	8-OHdG (pmol/kg)	p 值
抽菸			0.031 *		0.001 *
無	59	4.44 ± 6.8 <sup>a</sup>		277.52 ± 146.6	
二手煙	1	19.70		808.53	
喝酒			0.858		0.659
無	57	4.79 ± 7.2		287.20 ± 159.8	
已戒	1	4.86		151.14	
有	2	1.94 ± 1.0		330.23 ± 268.3	
喝茶			0.146		0.226
無	26	3.16 ± 1.6		257.43 ± 107.9	
有	34	5.87 ± 9.2		308.5 ± 190.3	
喝咖啡			0.173		0.842
無	38	3.75 ± 3.3		289.55 ± 162.1	
有	22	6.34 ± 10.8		280.88 ± 162.0	

a : 平均值 ± 標準差

\* : p < 0.05

表九、影響惡性乳癌腫瘤患者尿中 8-OHdG 之單變項分析

變項	n	8-OHdG/crea (umol/mol)	p 值	8-OHdG (pmol/kg)	p 值
年齡			0.510		0.672
<40	9	18.78 ± 17.6 <sup>a</sup>		678.81 ± 585.1	
40-60	43	14.83 ± 17.2		643.25 ± 618.5	
>60	8	22.05 ± 18.2		855.02 ± 621.5	
哺乳胎次			0.158		0.529
0	28	18.17 ± 20.1		728.75 ± 714.0	
1-2	16	9.41 ± 7.0		528.26 ± 473.6	
>2	16	20.25 ± 18.0		734.49 ± 529.1	
初經年齡			0.508		0.999
<14	20	16.62 ± 13.7		677.96 ± 482.5	
14-16	36	15.21 ± 15.3		677.86 ± 658.8	
>16	4	25.92 ± 42.78		661.73 ± 855.4	
停經			0.654		0.920
無	35	15.53 ± 18.4		670.08 ± 676.9	
有	25	17.59 ± 15.8		686.24 ± 509.5	
吃避孕藥習慣			0.560		0.372
無	47	17.08 ± 17.7		714.05 ± 619.3	
有	13	13.89 ± 16.2		542.21 ± 567.6	
家族史			0.109		0.418
無	36	19.31 ± 19.2		729.28 ± 649.7	
有	24	12.0 ± 13.1		598.12 ± 543.3	
喝茶			0.450		0.152
無	37	17.73 ± 18.9		765.86 ± 645.7	
有	23	14.23 ± 14.5		533.57 ± 505.3	
喝咖啡			0.015 <sup>*</sup>		0.255
無	50	13.99 ± 13.6		636.56 ± 585.7	
有	10	28.38 ± 27.6		878.11 ± 708.4	

a : 平均值 ± 標準差

\* : p < 0.05

表十、影響尿液中 8-OHdG 之多變項迴歸分析

變項	8-OHdG(mol) â(SE)	p 值	8-OHdG/crea (umol/mol) â(SE)	p 值
組別(病例對照)	54.4 ( 11.0 )	<0.001	14.1(2.6)	<0.001
初經年齡				
>17 (<14 歲=0)	-4.86 ( 19.0 )	0.798	1.4(4.5)	0.755
14-16(<14 歲=0)	1.39 ( 11.9 )	0.908	-2.8(2.8)	0.320
停經(有\無)	5.9 ( 10.8 )	0.587	2.5(2.6)	0.328
吃避孕藥(有\無)	-17.4 ( 15.9 )	0.278	-4.3(3.7)	0.250
抽菸 ( 有\無 )	57.1 ( 55.8 )	0.309	17.6 ( 13.1 )	0.182
喝咖啡 ( 有\無 )	11.7 ( 12.0 )	0.333	8.4 ( 2.8 )	0.004 <sup>*</sup>
R-square	0.195		0.248	

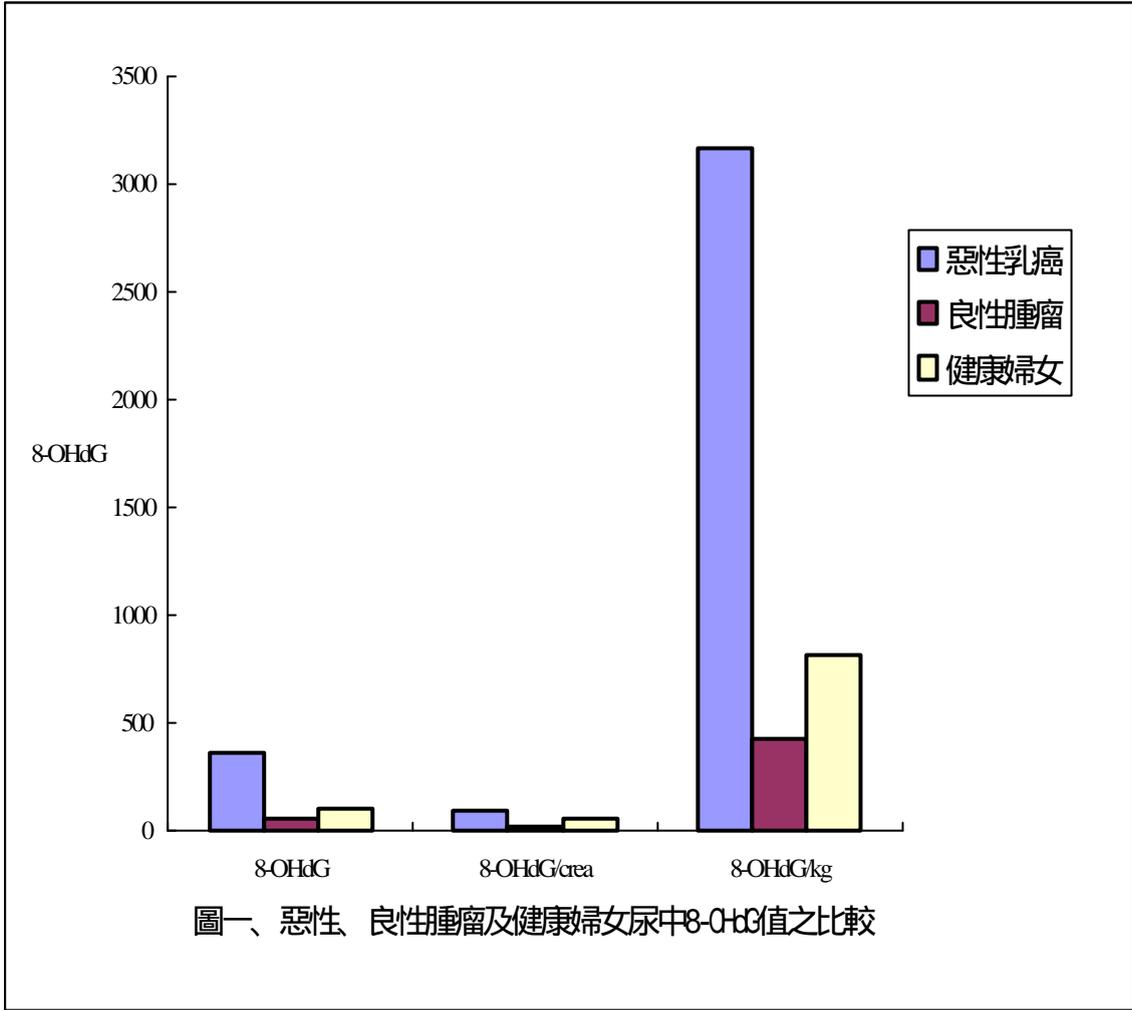
\* : p<0.05

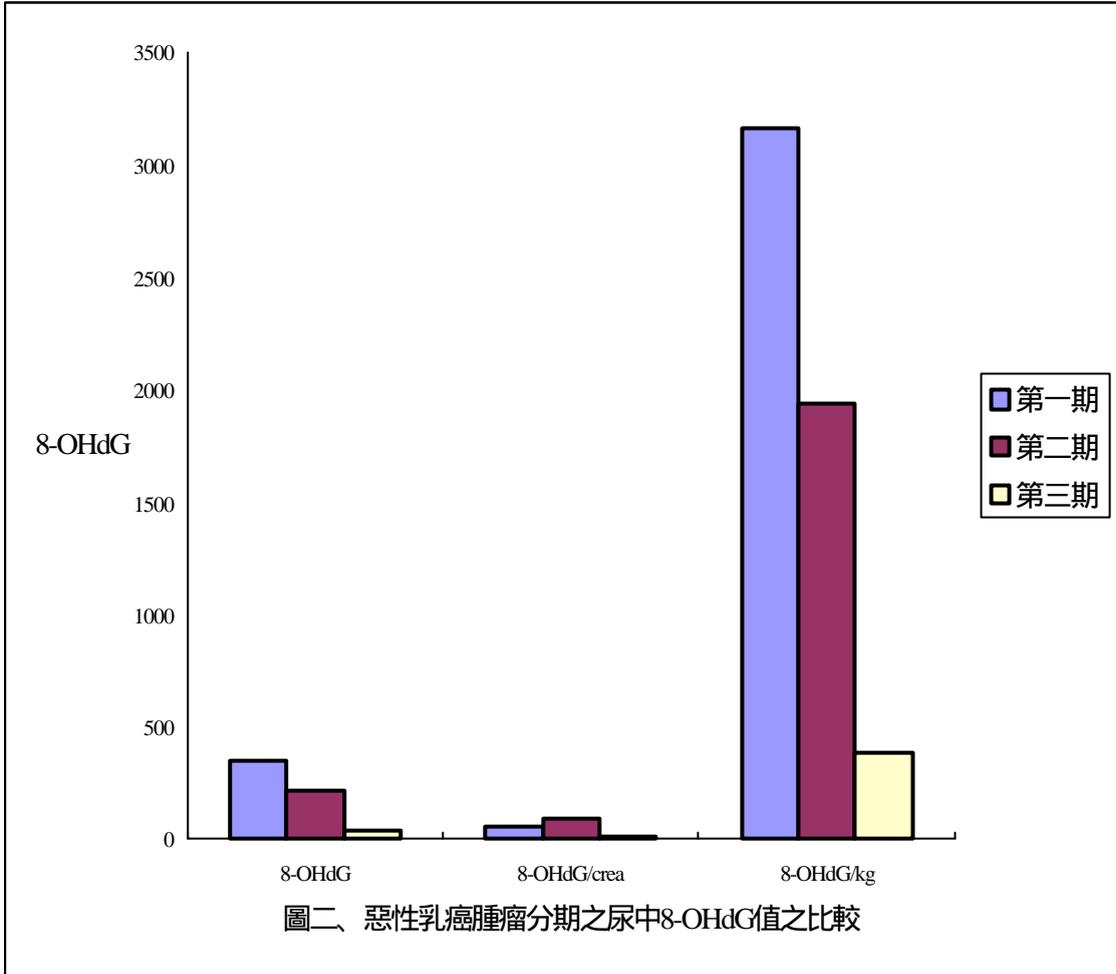
表十一、影響乳癌之羅吉斯迴歸分析

變項	迴歸係數 (SE)	OR 值	95%CI
8-OHdG/cret (umol/mol)	0.13(0.04)	1.14 <sup>**</sup>	1.05-1.24
哺乳胎次			
0 (>3 胎=0)	1.76(0.62)	5.83 <sup>**</sup>	1.72-19.72
1-2 (>3 胎=0)	1.44(0.64)	4.23 <sup>*</sup>	1.21-14.78
初經年齡			
14 -16 (>17 歲=0)	0.32(0.92)	1.98	0.23-8.29
<14 (>17 歲=0)	1.09(0.99)	2.97	0.42-20.83
停經(有無)	1.11(0.58)	3.04	0.98-9.50
吃避孕藥(有無)	2.41(0.88)	11.09 <sup>**</sup>	1.97-62.51
疾病家族史(有無)	1.36(0.57)	3.89 <sup>*</sup>	1.27-11.98

\* : p<0.05

\*\* : p<0.01





附表一、分析 8-OHdG 尿液之檢量線

	檢量線	r	偵測極限(nmol)
8-OHdG	$y = 0.1422x - 1.877$	0.9997	2.94

濃度：27.5~1760 nM

附表二、分析 8-OHdG 之儀器再現性

濃度(nmol)	55		440	
N	滯留時間	面積高度	滯留時間	面積高度
1	19.579	7.8	19.608	63.2
2	19.587	7.8	19.616	63.2
3	19.588	7.8	19.628	63
4	19.597	7.8	19.632	63
5	19.605	7.6	19.64	63
6	19.609	7.6	19.656	62.8
7	19.612	7.8	19.661	62.6
平均值	19.59671	7.742857	19.6344286	62.97143
標準差	0.0125	0.09759	0.01952654	0.213809
CV(%)	0.06	1.26	0.09	0.34

附表三、尿液樣本之添加回收率

添加濃度 ( nmol )	回收率 ( % )			平均值 ± 標準差
110	93.1	91.2	92.5	92.2 ± 1.0
330	94.9	93.1	92.7	93.6 ± 1.2

n=3

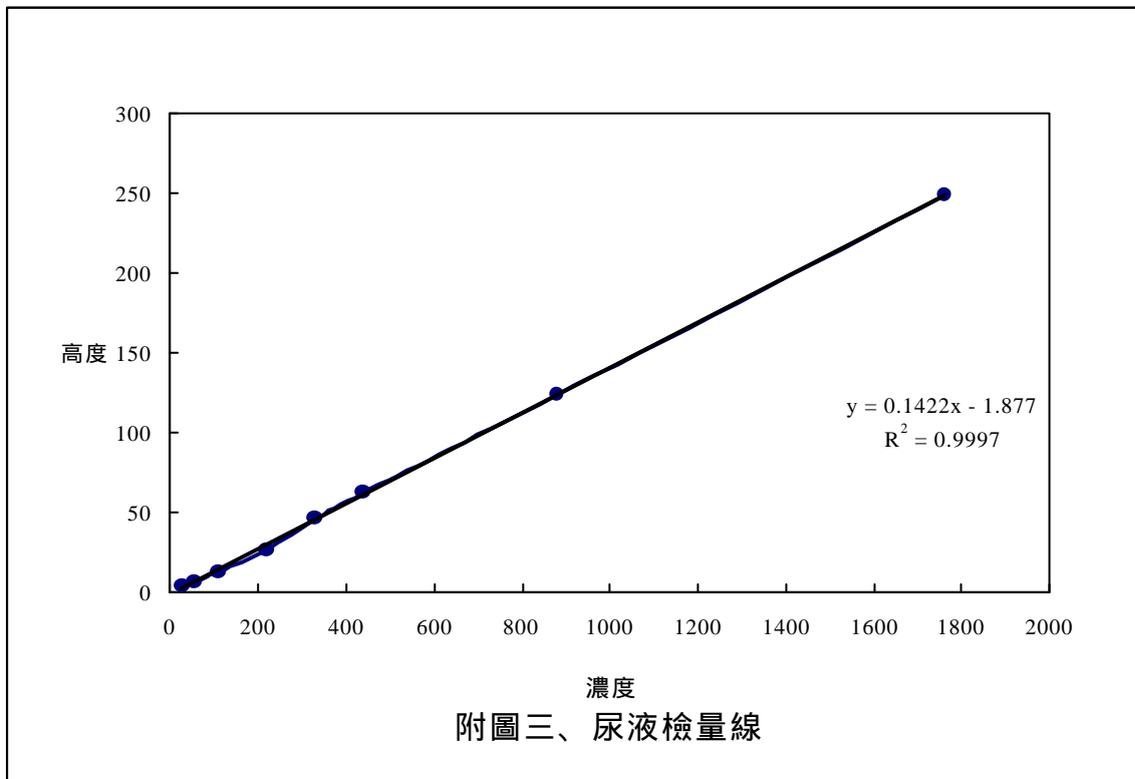
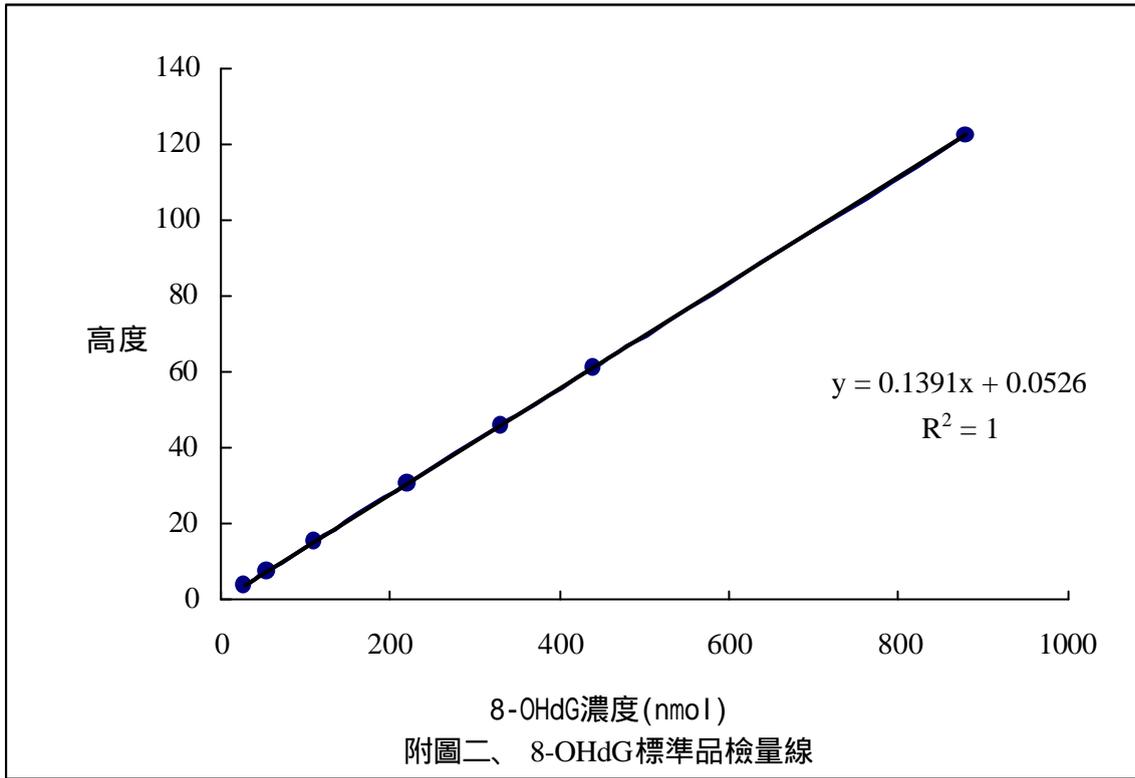
附表四、尿液樣本儲存穩定性(%)

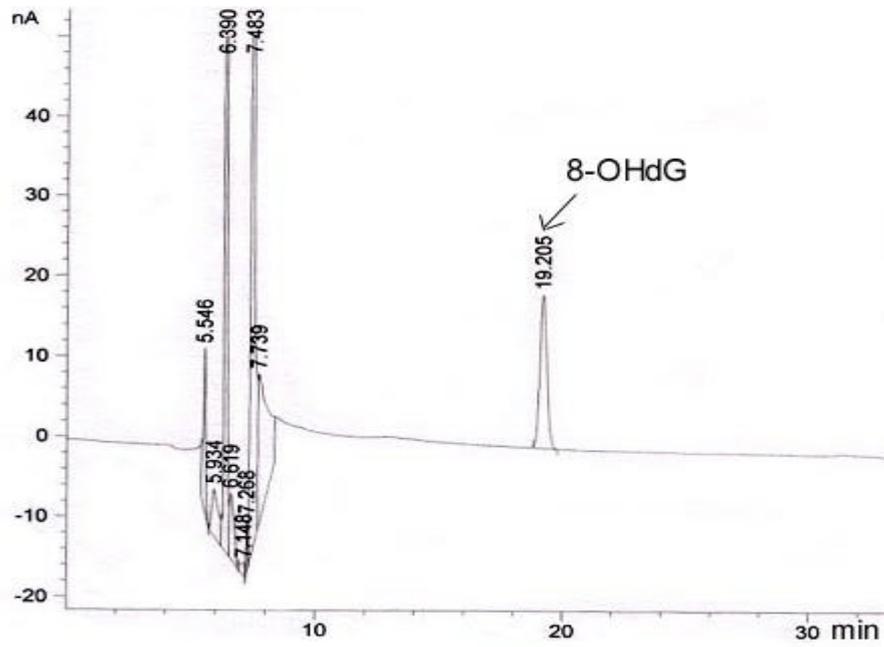
間隔天數(天)	平均值 ± 標準差 ( % )
0	100.0 ± 0.6
2	100.2 ± 0.1
7	100.6 ± 1.9
14	101.3 ± 2.7
21	98.0 ± 1.8

n=3

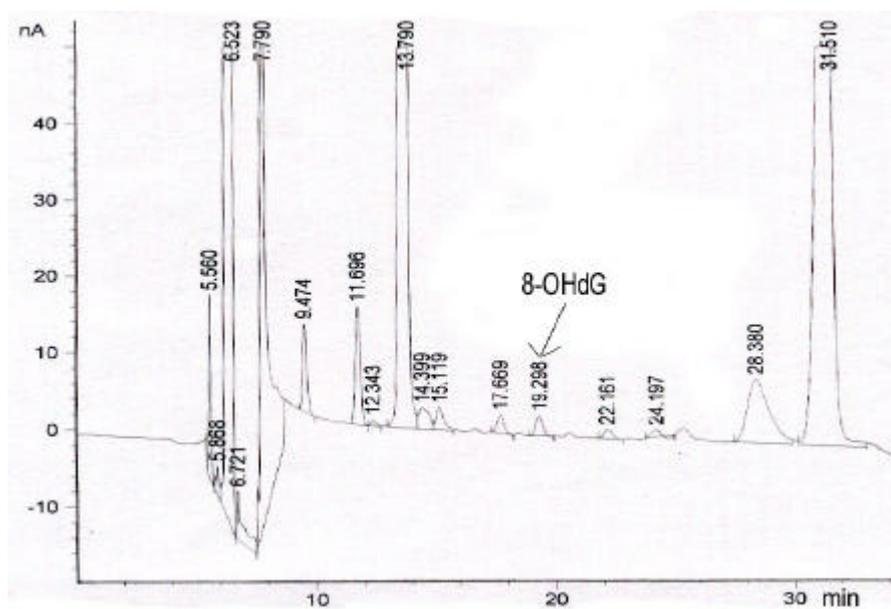
溫度：-60°C



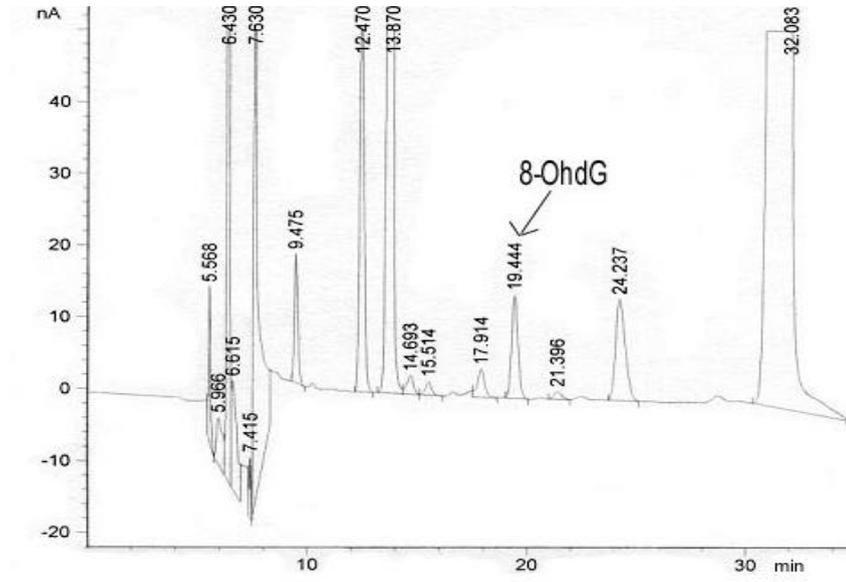




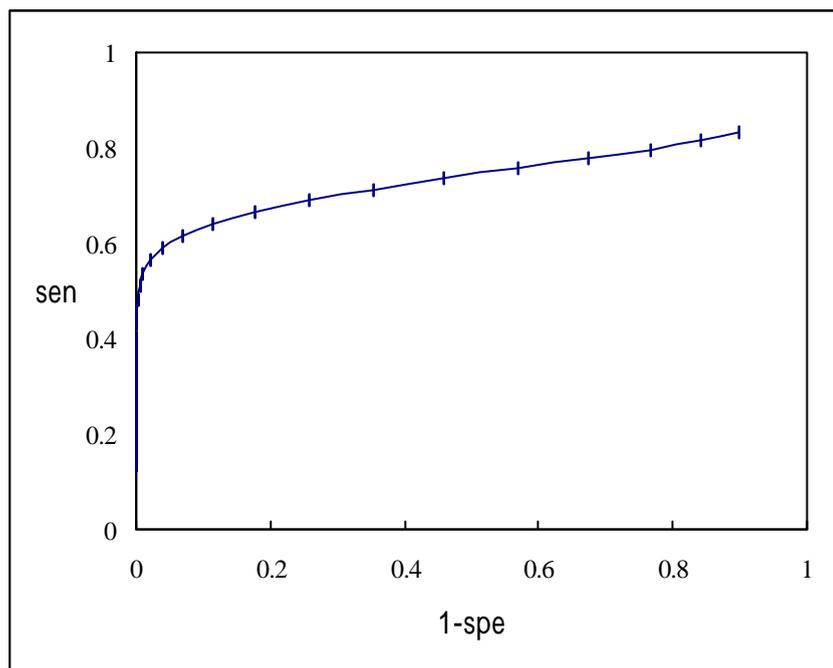
附圖四、以 HPLC-ECD 分析 8-OHdG 標準品之圖譜  
濃度：330nM (50 $\mu$ l)



附圖五、以 HPLC-ECD 分析正常人尿中 8-OHdG 之圖譜



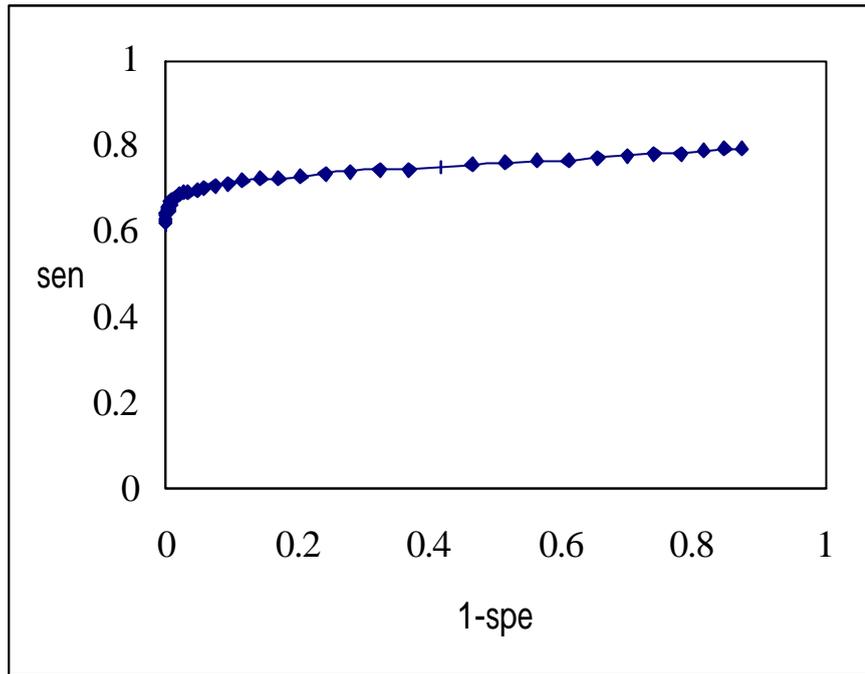
附圖六、以 HPLC-ECD 分析尿中添加 8-OHdG 標準品之圖譜  
濃度：110nM (100:1)



附圖七、惡性乳癌腫瘤與健康婦女尿中 8-OHdG 濃度 ROC 曲線

當尿中 8-OHdG 濃度選擇 45nM 為切點，則 sen 69 % ， spe 75 %

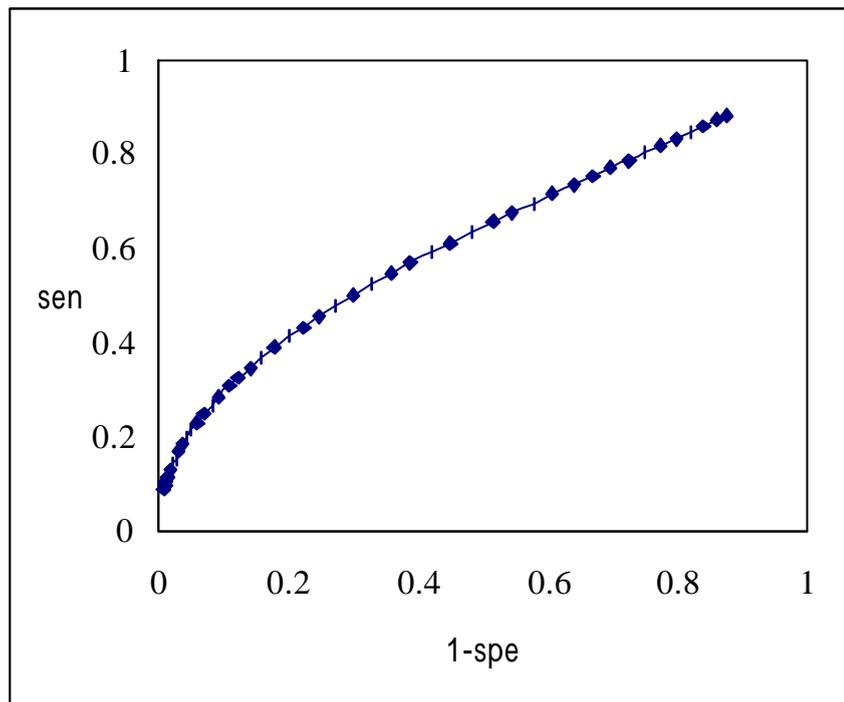
當尿中 8-OHdG 濃度選擇 40nM 為切點，則 sen 71 % ， spe 65 %



附圖八、惡性乳癌腫瘤與良性腫瘤尿中 8-OHdG 濃度 ROC 曲線

當尿中 8-OHdG 濃度選擇 35nM 為切點，則 sen 73 % ， spe 76 %

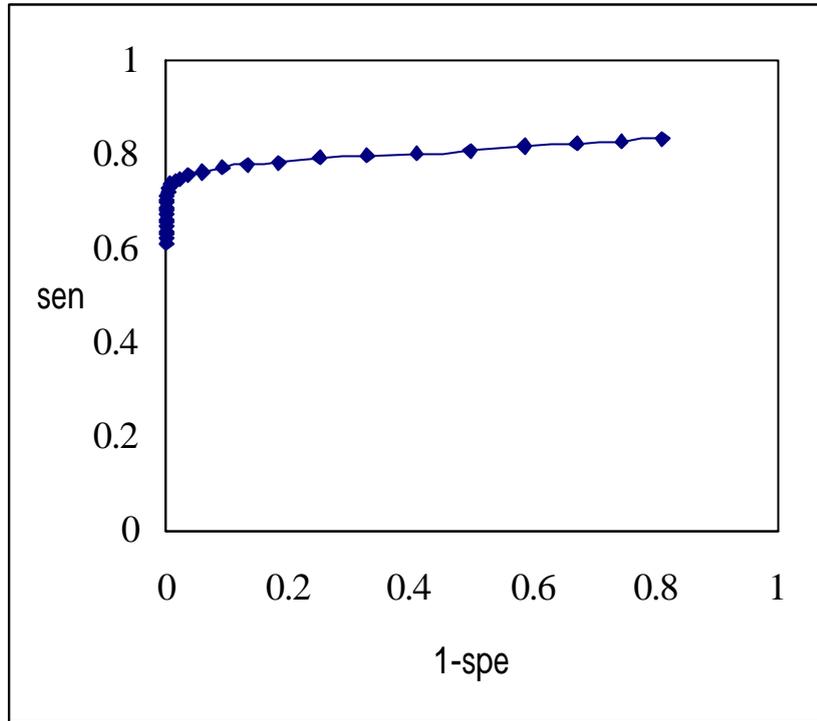
當尿中 8-OHdG 濃度選擇 36nM 為切點，則 sen 73 % ， spe 80 %



附圖九、惡性乳癌腫瘤第一期與第二期尿中 8-OHdG 濃度 ROC 曲線

當尿中 8-OHdG 濃度選擇 90nM 為切點，則 sen 57 % ， spe 61 %

當尿中 8-OHdG 濃度選擇 95nM 為切點，則 sen 54 % ， spe 64 %



附圖十、惡性乳癌腫瘤第一期與第三期尿中 8-OHdG 濃度 ROC 曲線

當尿中 8-OHdG 濃度選擇 36nM 為切點，則 sen 79 % ， spe 81 %

當尿中 8-OHdG 濃度選擇 40nM 為切點，則 sen 77 % ， spe 90 %

## 問卷 (乳房腫瘤病患)

### 一、基本資料

- 1、病例號碼：\_\_\_\_\_ 聯絡電話：(\_\_\_\_)\_\_\_\_\_
- 2、診斷結果：\_\_\_\_\_
- 3、姓名：\_\_\_\_\_ 目前住址：\_\_\_\_\_
- 4、出生年月日：民國\_\_\_\_\_年\_\_\_\_\_月\_\_\_\_\_日
- 5、籍貫：(1) 閩南 (2) 外省 (3) 客家 (4) 原住民 (5) 其他
- 6、職業：(1) 軍 (2) 公 (3) 教 (4) 農業 (5) 工  
(6) 商 (7) 自由業 (8) 家管 (9) 學生  
(10) 其他\_\_\_\_\_
- 7、教育程度：(1) 不識字 (2) 國小 (3) 國中  
(4) 高中(職) (5) 專科 (6) 大學  
(7) 研究所以上
- 8、結婚狀況：(1) 未婚 (2) 已婚 (3) 離婚 (4) 喪偶  
(5) 分居
- 9、是否有懷孕：(答“無”者，跳答第 10 題)  
(1) 無  
(2) 有，第一胎的年齡：\_\_\_\_\_歲；懷孕次數：\_\_\_\_\_次；  
生育次數：\_\_\_\_\_次；人工流產：\_\_\_\_\_次
- 10、是否有哺育母乳：(1) 有，共幾胎\_\_\_\_\_胎 (2) 無
- 11、初經年齡(幾歲)：\_\_\_\_\_歲
- 12、停經：(1) 否 (2) 是，幾歲\_\_\_\_\_歲
- 13、身高：\_\_\_\_\_公分；體重：\_\_\_\_\_公斤

### 二、生活習慣

#### (一) 抽菸習慣

- 1、(1) 不抽 (2) 不抽，但經常吸二手菸  
(3) 以前抽，現已戒菸 (4) 每週 1-3 次  
(5) 每週 4-5 次每天抽  
【選擇“不抽”者，跳答第(二)】
- 2、您抽菸已抽幾年了？(戒菸者，依過去情況回答)  
(1) 未滿一年 (2) 一年至三年  
(3) 三年至五年 (4) 五年至十年  
(5) 十年以上
- 3、若答戒菸者，您戒菸幾年了？  
(1) 未滿一年 (2) 一年至三年  
(3) 三年至五年 (4) 五年至十年  
(5) 十年以上
- 4、您平均每天抽多少菸？(戒菸者，依過去情況回答)  
(1) 五支以內 (2) 五之至十支(半包)  
(3) 半包至一包 (4) 一包以上

#### (二) 喝酒習慣

- 1、您喝酒嗎？  
(1) 不喝或每週少於一次 (2) 以前喝，現已戒酒

- (3) 每週 1-2 次                      (4) 每週 3-4 次  
(5) 每天喝

【選擇“不喝或每週少於一次”者，跳答第(三)】

2、您喝酒已喝幾年了？(戒酒者，依過去情況回答)

- (1) 未滿一年                      (2) 一年至三年  
(3) 三年至五年                      (4) 五年至十年  
(5) 十年以上

3、若答戒酒者，您戒酒幾年了？

- (1) 未滿一年                      (2) 一年至三年  
(3) 三年至五年                      (4) 五年至十年  
(5) 十年以上

4、您每次的喝酒習慣為何？(戒酒者，依過去情況回答)

(1 杯相當於 150c.c.或 1 紙杯量)

- (1) 淺嚐(少於半杯)                      (2) 小酌(半杯到一杯)  
(3) 二杯到三杯                      (4) 四杯或以上

(三) 喝茶與咖啡的習慣

1、您有喝茶的習慣嗎？(每週至少有一次以上)

- (1) 沒有  
(2) 偶爾(每週 1-3 次), 喝幾年: \_\_\_\_\_ 平均每次喝多少: \_\_\_\_\_  
(3) 有(每週 3 次以上), 喝幾年: \_\_\_\_\_ 平均每次喝多少: \_\_\_\_\_

2、您有喝咖啡的習慣嗎？(每週至少有一次以上)

- (1) 沒有  
(2) 偶爾(每週 1-3 次), 喝幾年: \_\_\_\_\_ 平均每次喝多少: \_\_\_\_\_  
(3) 有(每週 3 次以上), 喝幾年: \_\_\_\_\_ 平均每次喝多少: \_\_\_\_\_

(四) 最近一年是否有經常服用營養品或健康食品習慣？

(1) 有(每週至少有三次以上)

- (a) 維他命 A                      (b) 維他命 C                      (c) 維他命 E  
(d) 綜合維他命                      (e) 人參  
(f) 中藥: 八寶散 牛黃散 救寶散 驚風散 其他 \_\_\_\_\_  
(g) 其他 \_\_\_\_\_

(2) 沒有

(五) 您是否吃檳榔的習慣？

- (1) 不吃                      (2) 以前吃現已戒                      (3) 每週 1-3 次  
(4) 每週 4-5 次                      (5) 每天吃

(六) 飲食習慣

無: 不吃或每週少於一次                      很少: 每週 1-3 次                      偶而: 每週 4-6 次

經常: 每天 1 次                      總是: 每天吃 2 次或以上

無                      很少                      偶而                      經常                      總是

肉類食品(豬、牛、羊等)

海鮮食品(魚類等)

內臟食品(豬肝、雞心等)

脂肪類食物

蔬菜食品

水果類食品

### 三、工作史

#### 1、目前是否有在外工作？

- (1) 有，從事何種工作？\_\_\_\_\_共幾年\_\_\_\_年  
在此工作之前有無從事其他工作？  
(a) 有，最長的是哪一個工作？\_\_\_\_\_共幾年\_\_\_\_年  
(b) 無
- (2) 已辭去工作；辭去之前從事哪些工作？\_\_\_\_\_前一個最長的工作？\_\_\_\_\_共幾年\_\_\_\_年

(3) 沒有

#### 2、工作場所中是否有暴露於有害物質，影響您的健康？

- (1) 有，暴露於何種有害物質？\_\_\_\_\_
- (2) 沒有

### 四、疾病史

#### 1、現在病史

- (1) 目前是否還有服用藥物：  
(a) 沒有  
(b) 有，何種？\_\_\_\_\_

- (2) 目前是否有服用女性賀爾蒙藥物：  
(a) 沒有  
(b) 有，服用多久？\_\_\_\_年\_\_\_\_月

- (3) 目前是否有服用避孕藥的習慣：  
(a) 沒有  
(b) 有，服用多久？\_\_\_\_年\_\_\_\_月

#### 2、您是否曾患有其他疾病（經醫師診斷）

- (1) 有  
(a) 乳癌 (b) 子宮頸癌 (c) 卵巢癌  
(d) 糖尿病 (e) 高血壓 (f) 心臟病 (g) 痛風  
(h) 肝炎 (A、B、C) (i) 其他\_\_\_\_\_時間多久？\_\_\_\_年\_\_\_\_月

(2) 沒有

#### 3、您以前是否曾經接受過乳房 X 光檢查

- (1) 有  
共幾次\_\_\_\_次；分別在幾歲時作的\_\_\_\_\_

(2) 沒有

#### 4、請問您是否接受過卵巢摘除術

- (1) 有  
在\_\_\_\_歲時候進行，摘除了\_\_\_\_(1) 一側 (2) 二側  
之後您有沒有接受賀爾蒙治療？ 有，治療\_\_\_\_年； 沒有

(2) 沒有

#### 5、請問您是否接受過子宮摘除術

- (1) 有  
在\_\_\_\_歲時候進行

是什麼原因進行摘除術？\_\_\_ (1) 子宮頸癌 (2) 子宮內肌癌 (3) 子宮肌瘤 (4) 其他

(2) 沒有

6、請問您是否做過乳房組織針刺 (切片) 檢查

(1) 有

請問您做過\_\_\_次，分別在\_\_\_歲 (及\_\_\_歲) 時做的

做的結果是\_\_\_ (1) 囊腫 (2) 發炎 (3) 正常 (4) 良性瘤 (5) 惡性瘤

(2) 沒有

7、是否有家人罹患下列疾病？

(1) 有

(a) 乳癌 與您的關係？\_\_\_\_\_

(b) 子宮頸癌 與您的關係？\_\_\_\_\_

(c) 卵巢癌 與您的關係？\_\_\_\_\_

(d) 糖尿病 與您的關係？\_\_\_\_\_

(e) 高血壓 與您的關係？\_\_\_\_\_

(f) 心臟病 與您的關係？\_\_\_\_\_

(g) 痛風 與您的關係？\_\_\_\_\_

(h) 肝炎 與您的關係？\_\_\_\_\_

(2) 沒有