

氧化傷害之臨床指標： Isoprostanes 和 Neuroprostanes

謝育萍¹、顏秀娟¹

¹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，桃園，台灣

摘要

體內活性分子 (reactive species; RS) 的增加會造成氧化壓力 (oxidative stress) 上升。過多的RS在體內會去攻擊脂質、蛋白質和DNA，造成氧化傷害 (oxidative damage)。以氣相層析/負離子化學游離質譜技術 (gas chromatography/negative-ion-chemical-ionization mass spectrometry) 分析F₂-isoprostanes (F₂-IsoPs)，為目前評估體內脂質過氧化 (lipid peroxidation) 最可靠的生化指標。F₂-IsoPs為花生四烯酸 (arachidonic acid; AA) 的脂質過氧化產物，具有特殊的生物活性，會引起血管收縮與血小板聚集。不論是人體或是動物實驗中，都證明其含量的多寡和許多與氧化壓力相關的疾病或狀況有關聯。而F₄-neuroprostanes (F₄-NPs) 為二十二碳六烯酸 (docosahexaenoic acids; DHA) 的脂質過氧化產物。因為DHA主要存在於腦神經元的細胞膜上，所以F₄-NPs被視為是偵測腦神經元氧化傷害較好的特異性生化指標。本實驗室取動脈瘤破裂所引發蜘蛛膜下腔出血 (aneurysmal subarachnoid hemorrhage; aSAH) 病人的腦脊髓液來檢測F₂-IsoPs和F₄-NPs的含量，發現aSAH與兩者皆有相關性，代表aSAH的確和體內的氧化傷害程度有關，也反應出病人的腦神經元受到氧化傷害。F₂-IsoPs與F₄-NPs受限於其複雜的分析技術與昂貴的分析儀器，難以被廣泛使用。不過這些生化指標在研究氧化傷害的課題上佔有舉足輕重的地位，對於日後探討與氧化傷害有關之疾病的預測、診斷及治療具有相當大的幫助。(生醫 2009;2(1):53-67)

關鍵字：氧化傷害 (oxidative damage)、脂質過氧化 (lipid peroxidation)、F₂-isoprostanes (F₂-IsoPs)、F₄-neuroprostanes (F₄-NPs)、氣相層析/負離子化學游離質譜技術 (gas chromatography/negative-ion-chemical-ionization mass spectrometry)

前言

體內活性分子 (reactive species; RS) 的大量生成或是抗氧化系統的含量下降，會使得氧化壓力 (oxidative stress) 增加。RS是指一些具氧化能力之活性氧分子 (reactive oxygen species) 和活

性氮分子 (reactive nitrogen species)。這些分子有些是外層電子軌域含不成對電子的自由基 (free radicals)，有些則否。當DNA、蛋白質或脂質因RS的攻擊而造成傷害，稱為氧化傷害 (oxidative damage)，其可能會導致疾病產生或是造成毒、藥物之毒性。氧化壓力在疾病病理機制或

通訊作者：顏秀娟副教授

電話：886-3-2118800 ext 5207

傳真：886-3-2118692

地址：333桃園縣龜山鄉文化一路259號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

電子郵件信箱：yen@mail.cgu.edu.tw

毒、藥物毒性機制所扮演的角色，於Halliwell和Gutteridge合著之書中有詳細論述¹。因為大多RS的半衰期很短或易與其他分子反應且易於體外再產生變化，所以要由生物檢體評估體內RS的含量來表示氧化壓力的程度並不可靠，且不能代表氧化傷害之程度。而偵測體內抗氧化物的含量或抗氧化酶的活性同樣無法代表氧化傷害的發生。反之，若能測得氧化傷害產物的增加，必然代表先有氧化壓力的上升。因此，偵測穩定的氧化傷害產物作為生化指標才能代表活體中氧化傷害之發生，且可能與病理變化或疾病狀態更有關聯性。這些生化指標必須十分穩定地存在體內，不會受到飲食的干擾，而且可在血液、尿液等易取得的檢體中偵測得到，才能應用到人體之氧化壓力評估¹。更重要地，在臨床研究或檢驗上，需能使用具專一性之指標、精確和高敏感度之分析方法、及能從體液中反應周邊組織之指標，方能確切解釋氧化壓力與疾病的關係，或作為某種疾病狀態會造成氧化傷害的最佳佐證。

由Halliwell和Gutteridge合著之書中有介紹各式DNA、蛋白質與脂質的氧化傷害指標與其分析之優缺點¹。其中有些指標在活體內 (*in vivo*) 無法穩定存在，有些在正常體液中測定不到，有些在活體內並非專一性指標，或是常用之檢測方法不具專一性，亦或因用於偵測之檢體無法解釋組織的變化，而使得許多氧化傷害之指標的使用在臨床研究上受到質疑，或較難和疾病之致病機制作一合理的聯結。例如Halliwell和Gutteridge指出8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8OHdG) 為常見用來分析DNA氧化傷害的指標。雖其為一可靠之專一性產物，但並非DNA受到RS攻擊後主要的產物。在分析細胞中8OHdG前，要先將檢體中的DNA萃取出來，這步驟常會使得未受RS攻擊的DNA氧化，造成8OHdG生成¹。另外，因為不易取得組織，所以許多臨床研究常是取血液中的白血球來偵測8OHdG的含量，但是我們很難去證明白血球中的8OHdG含量可以代表組織中氧化傷害的狀況。而偵測尿液中的8OHdG雖可代表全身

的氧化壓力狀態，但8OHdG的含量上升不一定就等於是DNA氧化傷害的增加，也可能是DNA的修復能力增強所致¹。有許多證據也顯示尿液中的8OHdG含量會受飲食所影響，以上這些因素讓我們很難去解釋8OHdG與疾病的關係¹。另外，蛋白羰基分析 (protein carbonyls assay) 和酪氨酸 (tyrosine) 之氧化產物 (如3-nitrotyrosine) 的分析等常被用作是偵測蛋白質受到氧化傷害的指標。用於偵測的檢體多半是白血球或血漿，由這些檢體而來之結果並不能代表組織中的氧化傷害程度。且蛋白質的氧化傷害產物在體內容易被分解，加上這些指標的含量會受飲食之影響，因此降低了蛋白質氧化傷害指標與臨床狀況的相關性¹。常被分析之脂質過氧化 (lipid peroxidation) 指標除了本文將介紹之F₂-isoprostanes (F₂-IsoPs) 類的物質外，還有malondialdehyde (MDA)、4-hydroxy-2-nonenal和脂質過氧化物 (lipid hydroperoxides) 等，尤以使用操作簡單之thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) 分析方法來偵測MDA最為常見。但如Halliwell和Gutteridge所討論，測定TBARS之方法的專一性很差，體內很多內生性物質皆可和thiobarbituric acid (TBA) 反應，因此需以高效液相層析 (high performance liquid chromatography; HPLC) 或氣相層析/質譜技術 (gas chromatography/mass spectrometry; GC/MS) 等方法測定MDA才具專一性。但即使如此，MDA仍非脂質過氧化之專一性產物，因其在活體中可經由二十碳氫類化合物 (eicosanoid) 代謝產生及受飲食影響¹。

DNA氧化傷害或許在癌症這樣的疾病中較重要，因其會造成DNA在複製過程中產生突變¹。但活體中大部分組織不再有太多DNA複製或合成的情形時，其在臨床檢體中之增加有時難以解釋在一些急性病變中如何立即影響組織之功能。而我們認為，多不飽和脂肪酸普遍存在於細胞上，且其發生會立即影響細胞膜功能，或許因此在大多數氧化壓力狀況下較易發生。雖然蛋白氧化也會立即影響細胞的正常功能，但在臨床研究上通常

需直接取得組織分析才較有意義，除非是血液疾病或心血管疾病等，否則體液或血球中的分析結果可能不太能解釋與組織病變的關係。

目前已知 F_2 -IsoPs為評估體內脂質過氧化或甚至氧化壓力最可靠的生化指標²。雖然 F_2 -IsoPs可在活體外 (*in vitro*) 自行生成，但因為其不會被腸道所吸收，所以檢體中的 F_2 -IsoPs含量不會受到飲食的影響¹。即使自1990年發現 F_2 -IsoPs至今已892篇文獻以 F_2 -IsoPs探討人類相關問題，在台灣多數研究者仍對此新興的指標感到陌生。本實驗室歷經數年的努力，在台灣第一個建立以氣相層析質譜儀 (gas chromatography/mass spectrometer; GC/MS) 分析生物檢體中 F_2 -IsoPs、 F_4 -neuroprostanes (F_4 -NPs) 及其部分相關分子之參考方法。因此，本文以此為主軸，介紹它們在臨床研究上的重要性。

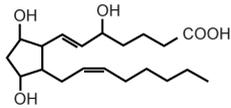
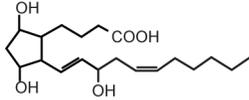
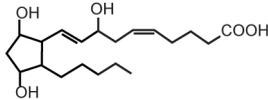
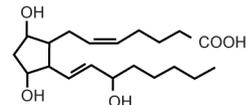
F_2 -IsoPs的生成與其在臨床研究之優勢

多不飽和脂肪酸受到高反應性之自由基—如氫氧自由基 (hydroxyl radical) 的攻擊會進行脂質過氧化反應。在1990年，Jason D. Morrow和L. Jackson Roberts, II兩位醫師發現了 F_2 -IsoPs，其為普遍存在於細胞膜上的花生四烯酸 (arachidonic acid; AA) 的脂質過氧化產物，為前列腺素 (prostaglandin; PG) 的類似物，但與產生PG之環氧酶 (cyclooxygenase) 的作用無關³。有四個雙鍵的AA其結構中有三個氫原子是在介於兩個雙鍵之間的碳上面，它們易受自由基攻擊而脫動，形成三種花生四烯酸自由基 (arachidonyl radicals)，接著因氧分子的加成作用產生四種過氧化自由基 (peroxyl radicals)，而後的內環化作用 (endocyclization) 和再一次的氧分子加成作用，形成四種不穩定的類前列腺素 H_2 (prostaglandin H_2 -like; H_2 -IsoP) 之內過氧化物 (endoperoxides)，最後進行還原

反應，形成 F_2 -IsoPs²。 F_2 -IsoPs有四種位置異構物 (regioisomers) (圖一)，每種位置異構物又有八個消旋的非鏡像異構物 (racemic diastereomers)，所以理論上一共可形成64種 F_2 -IsoPs²。

Morrow等人於1990年發現 F_2 -IsoPs之後，並未對其命名做出明確的定義，四種位置異構物也只用I-IV來區分其組別³，一直到1997年開始才出現統一的命名系統。目前常用的命名系統有兩種，一種是源自Morrow和Roberts實驗室 (Taber等人) 所擬之命名系統，此為Eicosanoid Nomenclature Committee所認可，且被International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) 所接受。此命名系統是以羧基上的碳 (carboxyl carbon) 作為C-1，依據這四種位置異構物中羥基 (hydroxyl group) 所在之碳的位置，將其分別命名為5-、12-、8-和15-系列⁴。另一種則是由FitzGerald實驗室 (Rokach等人) 所發展出來的，依其 ω -carbon位置的不同，以III-VI來表示四種位置異構物⁵。這三種命名方式的對照表請參照表一，本篇採用Taber等人的命名方式。

經偵測發現人體內的5-和15-系列之IsoPs含量比8-和12-系列的多⁶，其中又以15- F_{2t} -isoprostane (15- F_{2t} -IsoP) 為人體內最主要的 F_2 -IsoPs形式⁷，與prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) 互為同分異構物 (圖二)。在未有統一的 F_2 -IsoPs命名方式出現之前，15- F_{2t} -IsoP有許多別名，例如8-iso- $PGF_{2\alpha}$ 、8-epi- $PGF_{2\alpha}$ 、 $IPF_{2\alpha}$ -IV和 $iPF_{2\alpha}$ -III都代表15- F_{2t} -IsoP。15- F_{2t} -IsoP和 $PGF_{2\alpha}$ 主要的差異在於其生成的方式不同。 $PGF_{2\alpha}$ 的生成需靠環氧酶的作用，而且只能從游離態 (free form) 的AA來產生，但 F_2 -IsoPs主要是由細胞膜上的AA經脂質過氧化反應生成酯化 (esterified form) 的 F_2 -IsoPs，而後經磷脂酶 (phospholipase) 的水解作用 (hydrolysis) 才能游離到體液中⁶。因此，在動物實驗或一些可得人類組織檢體的情況下，測量酯化形式之 F_2 -IsoPs能反映出特定組織上脂質過氧化的情形。但在大

5-系列 F₂-IsoP12-系列 F₂-IsoP8-系列 F₂-IsoP15-系列 F₂-IsoP

圖一、花生四烯酸 (arachidonic acid; AA) 與其脂質過氧化產物 F₂-IsoPs 之四種位置異構物 (regioisomers) 的化學結構式。

部分無法自人體取得組織的情況下，體液中游離態 F₂-IsoPs 之測定就能反映鄰近組織的氧化傷害情形。例如：腦脊髓液代表腦部，關節液代表關節，而血液中的 F₂-IsoPs 則含量代表全身性的氧化壓力狀態⁸。至於尿液檢體，由於取得容易，故被廣為使用。尿液中的 F₂-IsoPs 由血液過濾而來，但因其含量之變化有可能受到腎臟或泌尿系統影響，而被質疑是否能代表全身性氧化壓力的情形²。除了已提到的血漿、尿液和腦脊髓液，支氣管肺泡沖洗液 (bronchoalveolar lavage fluid)、膽汁、淋巴液、關節液和羊水等體液也可測量到游離態 F₂-IsoPs 的含量⁹。另外，在血漿中除了可以分析游離態 F₂-IsoPs，也可分析存於脂蛋白 (lipoprotein) 上的酯化型 F₂-IsoPs。雖然血漿中酯化型 F₂-IsoPs 的含量高於游離態 F₂-IsoPs，但其分析方法所需之前處理步驟較為麻煩，又易在體外產生，因此在收集檢體上造成許多麻煩¹⁰。而血漿中的酯化型 F₂-IsoPs 是在血液中產生的，不似游離態 F₂-IsoPs 可反映出組織的氧化傷害情形。

如 Roberts 和 Morrow 的綜合評論²，在活體中偵

測 F₂-IsoPs 來評估氧化壓力有六大優勢：(1) 是一種穩定的產物；(2) 為脂質過氧化的專一性產物；(3) 在所有正常生物性組織和體液中皆可測得，且能定出其正常範圍；(4) 在遭受氧化傷害的動物模式中，其含量會上升；(5) 其含量會隨著體內抗氧化系統的狀況而改變；(6) 其含量並不會受到飲食的影響。再加上前段所述的優點，F₂-IsoPs 之偵測因此在臨床研究上提供許多文獻中常用之氧化傷害指標所不及之優勢。

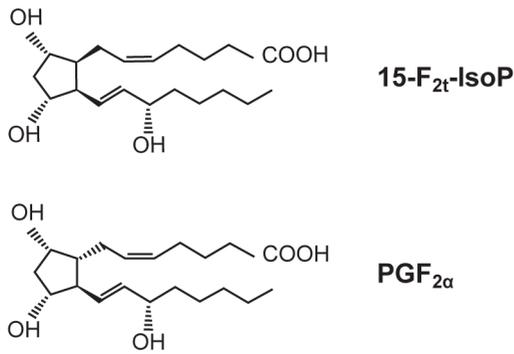
F₂-IsoPs 的生物活性

因為 15-F_{2t}-IsoP 為人體中最主要的 F₂-IsoPs 形式，故其生物活性被廣泛研究。目前證實 15-F_{2t}-IsoP 除了是氧化壓力指標外，也具有特殊的生物活性—增加血管收縮、血小板聚集和特定細胞的增生，這些都與血栓烷 A₂ 受體 (thromboxane A₂ receptors; TP_r's) 有關聯¹¹。在增加血管收縮的作用上，發現不論是在肺、腎、腦、心臟還是視網膜的血管都可受其影響¹²，且 15-F_{2t}-IsoP 可降低因阿斯匹林 (aspirin) 而抑制血小板聚集的反應¹³。至於血管平滑肌細胞¹⁴與內皮細胞¹⁵會因 15-F_{2t}-IsoP 的存在而刺激其 DNA 合成及細胞增生。

在 Comporti 等人的綜合評論性論文中¹¹，認為 15-F_{2t}-IsoP 因引發 TP_r's 的活化，使得腎絲球微血管收縮，以及腎絲球的過濾速率 (glomerular filtration rate) 降低¹³，這個機制可能和腎衰竭的形成有關。而 Audoly 等人指出，15-F_{2t}-IsoP 可藉由

表一、F₂-IsoPs 之四種位置異構物 (regioisomers) 的命名對照表。

Morrow 等人於 1990 年所訂之命名法 ³	Taber 等人命名法 ⁴	Rokach 等人命名法 ⁵
I	5-系列	VI
II	12-系列	V
III	8-系列	IV
VI	15-系列	III



圖二、F₂-IsoPs和PGF_{2α}的化學結構式。

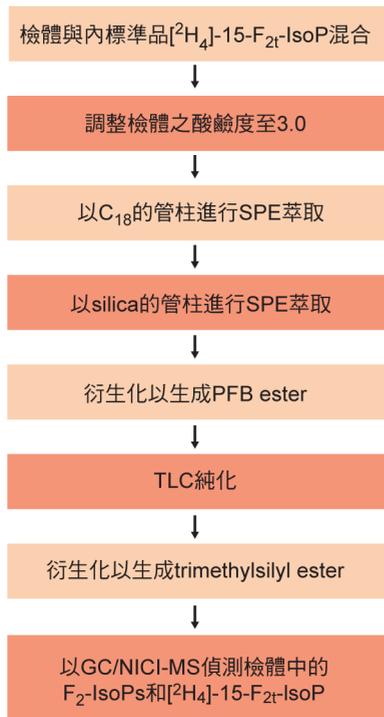
相對於其環戊烷環 (cyclopentane ring) 而言，F₂-IsoPs的兩個支鏈 (side chain) 是同向的 (*cis* orientation)，PGF_{2α}的則是互為反向 (*trans* orientation)。

活化TPR's來調控血壓的大小與血小板的聚集，可能對於與氧化壓力和環氧酶活化有關之病症，像是動脈粥狀硬化 (atherosclerosis) 或缺血再灌注傷害 (ischemia-reperfusion injury)，有重要之影響¹⁶。另外，也發現15-F_{2t}-IsoP會使得視網膜的實質細胞和內皮細胞內的鈣離子含量短暫地上升，讓血栓烷 (thromboxane) 和內皮素 (endothelin) 被釋放出來，造成視網膜血管的收縮，這個現象可能會使早產兒或糖尿病患者產生視網膜病變¹⁷。至於肝臟的星狀細胞 (hepatic stellate cell; HSC) 可藉由細胞增生或是改變其表型的方式來促進其產生基質蛋白 (matrix protein)，但是卻會引發脂質過氧化反應。經由實驗證明，以15-F_{2t}-IsoP來處理HSC，會使得其細胞數量大增，DNA與膠原 (collagen) 的合成量增加。但若是抑制了TPR's的活化，即使以15-F_{2t}-IsoP來處理HSC，上述之反應也不會產生。而膠原的產生會造成肝臟的纖維化 (fibrosis) 或甚至是肝硬化 (cirrhosis)，所以15-F_{2t}-IsoP被視為是肝臟纖維化的媒介¹⁸。以上這些例子皆指出，15-F_{2t}-IsoP的特殊生物活性在人體的病理變化中扮演重要角色。

F₂-IsoPs的檢測方法

現行的F₂-IsoPs檢測方法分為兩大類，一類是使用質譜技術 (mass spectrometry)，另一類則是進行免疫分析 (immunoassay)。在使用質譜儀這一類上，可利用氣相層析/負離子化學游離質譜儀 (gas chromatography/negative-ion-chemical-ionization mass spectrometer; GC/NICI-MS)、液相層析質譜儀 (liquid chromatography/mass spectrometer; LC/MS) 或液相層析串聯質譜儀 (liquid chromatography/tandem mass spectrometer; LC/MS/MS) 來進行分析。而在免疫分析分析方面，則是有酵素免疫分析 (enzyme immunoassay; EIA) 和放射免疫分析 (radioimmunoassay; RIA) 這兩種¹⁹。使用質譜儀分析，其精確度與專一性皆優於免疫分析法，但缺點是儀器價格昂貴及技術難度高。

GC/NICI-MS方法是Morrow和Roberts等人所用來定量F₂-IsoPs類分子之參考方法，且對於生物檢體中分析F₂-IsoPs之精確度 (accuracy)、準確度 (precision) 和偵測極限等皆已做確認²⁰。檢體在以GC/NICI-MS分析之前，需經過非常繁鎖的純化過程，故需要大量的勞力及時間來進行檢體的前處理，無法快速且大量地進行分析。體液中游離型F₂-IsoPs分析的簡單流程示意圖如圖三所示。首先要將內標準品 [²H₄]-15-F_{2t}-IsoP和檢體混合，以便在繁鎖的純化過程中，校正檢體的回收率。之後將檢體的酸鹼度調成3.0，進行兩次的固相萃取 (solid phase extraction; SPE)。第一次是以C₁₈管柱做萃取，第二次則是以矽 (silica) 管柱做萃取。而後進行衍生化 (derivitization)，以五氟溴甲苯 (pentafluorobenzyl bromide) 將F₂-IsoPs的羧基轉變為pentafluorobenzyl (PFB) ester。接著進行薄層色層分析 (thin-layer chromatography; TLC)，做進一步的純化。最後再進行一次衍生化，以bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide 將F₂-IsoPs的羥基轉變為trimethylsilyl ester後，便可以GC/MS作分析。若要分析組織之酯化型F₂-IsoPs，組織需先經Folch溶液萃取並經氫氧化鉀 (potassium hydroxide; KOH) 水解酯化的



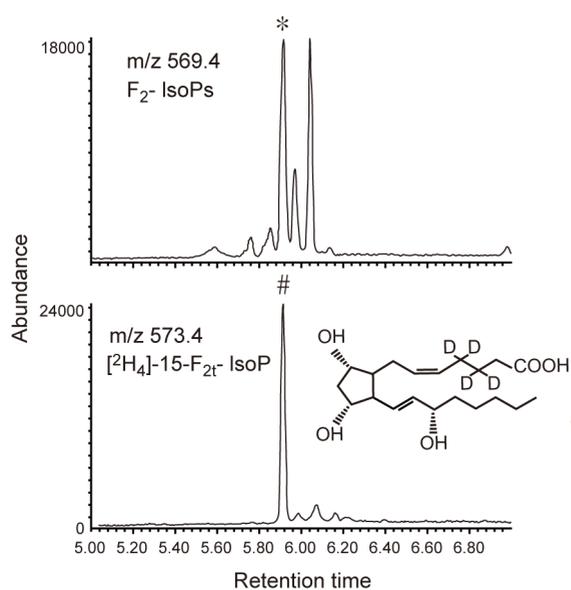
圖三、以氣相層析質譜儀 (gas chromatography/mass spectrometer; GC/MS) 分析法測量體液中游離形式之 F_2 -IsoPs的前處理步驟。(彩圖詳見本刊網頁)

F_2 -IsoPs成游離態 F_2 -IsoPs，才能進一步繼續用前述步驟分析。這整個完整的穩定同位素稀釋質譜分析技術 (stable isotope dilution mass spectrometric assay) 在Morrow的論文中已被詳盡地描述^{20,21}。GC/MS是選用NICI模式來分析，這個模式是所有MS的模式中偵測極限最好的。 F_2 -IsoPs和內標準品 $[^2H_4]$ -15- F_{2t} -IsoP的結果以選擇離子偵測 (selected ion monitoring; SIM) 之層析圖 (chromatogram) 表示。以圖四來看， F_2 -IsoPs因為經兩次的衍生化，結構中的羧基轉變為PFB ester，羥基轉變為trimethylsilyl ester，經MS分析時，因為會去捕抓一低能量電子，使PFB與主結構分離，轉變為帶有羧酸根的陰離子，所以最後測得之荷質比 (mass-to-charge ratio; m/z) 為569.4，而內標準品 $[^2H_4]$ -15- F_{2t} -IsoP的結構比 F_2 -IsoPs多四個重氫 (deuterium)，所以m/z為573.4。這個設

計讓內標準品不會干擾 F_2 -IsoPs的分析，但因兩者的極性相近，所以滯留時間 (retention time) 相同，藉由觀察內標準品 $[^2H_4]$ -15- F_{2t} -IsoP的滯留時間，可確定檢體中 F_2 -IsoPs訊號波的所在。因為已知內標準品的質量，藉由計算兩者訊號波高度的比例，可推算出 F_2 -IsoPs在檢體內的含量。雖然以GC/NICI-MS分析時是以 $[^2H_4]$ -15- F_{2t} -IsoP作為內標準品，但是在m/z 569.4所測得的訊號波不僅有15- F_{2t} -IsoP，還包括其他 F_2 -IsoPs的異構物，因此以 F_2 -IsoPs表示此訊號波^{20,22}。Mori等人以標準品驗證在GC/NICI-MS方法中，15- F_{2t} -IsoP所在之訊號波也包含15(R)- F_{2t} -IsoP和 $9\beta,11\alpha$ -PGF₂²³。但目前在人體體液中，只證實有顯著之15(R)- F_{2t} -IsoP存在²⁴。而Vaughn等人則指出，使用HPLC分離大鼠組織的部分成分，再用GC/NICI-MS分析 F_2 -IsoPs，並無法分離出一些5、12和15-系列的位置異構物²²。

在正常人的血漿中，游離態 F_2 -IsoPs的濃度為 35 ± 6 pg/ml，在腦脊髓液中的含量為 23 ± 1 pg/ml，在尿液中的含量為 1.6 ± 0.6 ng/mg肌酸酐 (creatinine)²⁰。若不以肌酸酐來校正尿液中 F_2 -IsoPs的含量，本實驗室使用GC/NICI-MS所測得之數個正常人的尿液中 F_2 -IsoPs濃度約在300-750 pg/ml之間。由此可知，尿液中的 F_2 -IsoPs含量遠高於血漿或腦脊髓液。本實驗室以GC/NICI-MS進行 F_2 -IsoPs的常規檢測時，不論是正常人之血漿還是腦脊髓液，其用量只需0.5 ml。這對於檢體量有限之研究是相當有用的。

使用LC/MS/MS分析法時，在檢體前處理上只需進行SPE，不需進行TLC步驟，故前處理步驟較為簡單。不過，其偵測極限不如GC/NICI-MS^{20,21}，所以現在多用於尿液檢體的檢測，少部分使用在血漿的檢測上。至於腦脊髓液或其他低含量之體液，因為 F_2 -IsoPs的含量太低，無法用此法來測量，目前仍需使用靈敏度較高的GC/NICI-MS方法來測量。由於一般生物醫學相關實驗室對LC之操作較熟悉，對於以GC/NICI-MS分析 F_2 -IsoPs感到



圖四、分析人類腦脊髓液中 F_2 -IsoPs的離子偵測 (selected ion monitoring; SIM) 層析圖 (chromatogram)。*代表 F_2 -IsoPs。#代表內標準品 $[^2H_4]$ -15- F_{2t} -IsoP，其結構式中的D為重氫 (deuterium)。

陌生及困難，因此會想要建立LC/MS/MS的方法。然而，因GC/NICI-MS靈敏度較高，可進行各式檢體中 F_2 -IsoPs的定量分析，其機器之價格又約只有LC/MS/MS的四分之一，故使用GC/NICI-MS來作為常規定量方法應較具有經濟效益。

至於定性方面，LC/MS或LC/MS/MS在同時區分不同位置異構物或特定異構物²⁴⁻²⁶方面較GC/NICI-MS為佳。例如，前述用GC/NICI-MS無法區分之15- F_{2t} -IsoP和15(R)- F_{2t} -IsoP²³，用LC/MS/MS可將這兩者在尿液檢體中區分開來²⁴。不過，在尿液中，仍以5和15-系列之 F_2 -IsoPs較易被LC/MS偵測到²⁶。如Milne等人²¹所評論，雖然至今已有很多以LC/MS或LC/MS/MS偵測 F_2 -IsoPs的方法被發表出來，但只有三篇文獻有用生物檢體去驗證其精確度和準確度等的問題^{24,27,28}。不過，這三篇文獻中只有Haschke等人有用LC/MS/MS方法測定血漿中游離形式的 F_2 -IsoPs，其他兩篇則皆測定游離型與酯化型 F_2 -IsoPs的總和。血漿中酯化型 F_2 -IsoPs含

量豐富，因此偵測時所需之血漿量較只偵測游離型 F_2 -IsoPs來得少，但其問題如前所述，酯化型 F_2 -IsoPs易在檢體收集過程中於體外產生，且無法解釋非血液相關之組織的氧化傷害情況。因此，若以LC/MS/MS的方法偵測檢體中之 F_2 -IsoPs，或許可以進一步評估不同的位置異構物或不同的特定異構物與疾病之相關性是否有所不同，這樣的問題是目前文獻中較不清楚的，值得進一步深入研究。然而，如前所述，這樣的探討可能僅限於尿液，難以擴及所有的檢體和疾病狀況。而且，在目前可購得之特定異構物標準品有限的情況下，能夠作這樣探討的 F_2 -IsoPs異構物並不多。

目前已有多個廠商有販售EIA試劑組，不過檢體在進行EIA測量前仍需要經過SPE和TLC的純化，否則因為檢體中各項生物分子太多，會干擾檢測結果。一開始建立此方法時，Wang等人在檢體進行純化之前，會加入 $[^3H]$ -TXB₂作為內標準品，以便校正檢體在萃取時所造成的流失²⁹。但是像 $[^3H]$ -TXB₂這種具放射性的物質處理麻煩，且一般實驗室未經複雜認證不能操作，也不適合大規模用於臨床檢驗上。因此後來從文獻上可看出很多實驗室在進行純化時不加內標準品，或是根本不進行純化。如此一來無法建立校正每個檢體回收率的措施，或是因檢體中各項生物分子太多，讓結果產生很大的變異性。另外，現在市面上常見的EIA試劑組都使用偵測15- F_{2t} -IsoP的多株抗體 (polyclonal antibodies)，不過因為IsoPs、PG及其代謝產物或同分異構物眾多，以及這些抗體專一性之驗證不夠，會使結果的可信度降低。本實驗室之前就發現在使用某廠牌之EIA試劑組時，若使用純度不高的溶劑或水質有問題的二次水都會造成嚴重干擾³⁰。有些研究者想發展單株抗體 (monoclonal antibodies) 的檢測法²¹，雖然這樣做或許可改善分析的專一性，但若未用具有放射性的內標準品，仍無法保證可省去檢體純化步驟或是解決無法校正檢體純化步驟之回收率的問題。Proudfoot等人指出，即使使用 $[^3H]$ -15- F_{2t} -IsoP作為內標準品，相同的檢體在EIA所測之15- F_{2t} -IsoP和

在GC/NICI-MS所測之多個F₂-IsoPs異構物這兩種方法測量下，得到的F₂-IsoPs濃度差異很大³¹，所以其結果不若以GC/NICI-MS所得結論可信。RIA也具有處理放射性廢液或廢棄物等問題，使此法更難以在一般實驗室中使用。

F₂-IsoPs與人類疾病

因為F₂-IsoPs為測量體內氧化壓力最可靠的生化指標，所以許多探討疾病與氧化壓力關係的研究都會使用F₂-IsoPs。如Basu^{9,19}的綜合評論性論文中即指出心血管、肺、肝、腎、神經性和發炎性等疾病都和體內F₂-IsoPs之上升有相關性，但是其中包含一些用EIA方法的結論。本文則是針對有運用質譜技術分析體內F₂-IsoPs含量與疾病之相關性的論文來做介紹。

心血管疾病如冠狀動脈再灌流（coronary reperfusion）的病人，其尿液中的F₂-IsoPs含量上升³²，動脈硬化病人的血管組織中F₂-IsoPs含量較高³³。肺部疾病方面，像是氣喘³⁴、慢性阻塞性肺病（chronic obstructive pulmonary disease）³⁵或是肺部嚴重受損的病人³⁶，F₂-IsoPs在尿液或是呼氣的濃縮物中的濃度也會升高。抽菸易造成心血管或肺部疾病，這些受試者的血漿中F₂-IsoPs含量較不抽菸者高³⁷。而著名的阿茲海默症（Alzheimer's disease）^{38,39}、杭丁頓舞蹈症（Huntington's disease）⁴⁰與多發性硬化症（multiple sclerosis）⁴¹等神經退化性疾病的病人，其腦脊髓液或腦組織中的F₂-IsoPs會升高，但是在帕金森氏症（Parkinson's disease）病人的腦組織中則沒有改變⁴²。動脈瘤破裂所引發的蜘蛛膜下腔出血（aneurysmal subarachnoid hemorrhage; aSAH）⁴³或是缺血性中風（ischemic stroke）⁴⁴等這些中風病人的腦脊髓液或血漿中，F₂-IsoPs的含量也會上升。第二型糖尿病（type 2 diabetes）病人處於高血糖狀態時，血液中的F₂-IsoPs含量會上升⁴⁵，但給予甲型生育醇（ α -tocopherol）或混合型生育醇（mixed tocopherol）可降低F₂-IsoPs的含量⁴⁶。

不過第一型糖尿病（type 1 diabetes）病患的尿液中，F₂-IsoPs的含量與正常人相比並無顯著差異⁴⁷。其他如洗腎病患的病人，其體內的F₂-IsoPs也有較高的含量⁴⁸。由喝酒所引起的肝病（alcohol-induced liver disease）之病人，其尿液中F₂-IsoPs的含量顯著增加⁴⁹，正常人若減少喝酒量則有助於降低血漿中F₂-IsoPs的含量⁵⁰。自體免疫疾病如全身性硬化症（systemic sclerosis）的病人，其尿液中的F₂-IsoPs含量也會上升⁵¹。

另外，較特別的像是遺傳性疾病地中海貧血（thalassemia）病人，血漿中有較高的F₂-IsoPs含量，這可能是因為其血紅素的生成有缺陷，易引起溶血，使得體內的氧化壓力增加⁵²。而粒線體（mitochondrion）的電子傳遞鏈（electron transport system; ETS）為體內產生RS的主要地方¹，因此粒線體DNA的突變在醫學上受到重視。像是Canter等人首度證實粒線體DNA A8344G突變的家族中，若其異質性（heteroplasmy）的比率較高，其血漿中F₂-IsoPs的含量隨之上升，日後發病的機率也因此提升⁵³。

胎兒或新生兒體內的氧化壓力狀態如成人一般，也可經由測量F₂-IsoPs的含量來呈現。像是Comporti等人就取新生兒的臍靜脈血漿來測量其體內的氧化壓力大小，結果發現新生兒血漿中的F₂-IsoPs含量比成人高出許多，且早產兒血漿中的F₂-IsoPs含量又明顯高於足月出生的嬰兒，這些現象可能源自於嬰兒體內RS和抗氧化系統的不平衡⁵⁴。但是Reuter等人卻發現，新生兒的尿液中F₂-IsoPs含量與支氣管和肺的發育障礙（bronchopulmonary dysplasia）沒有相關性，這可能是受測者數量太少，產生第二型錯誤（type II error）所致⁵⁵。

此外，時常發現不同的團隊在研究某一疾病與F₂-IsoPs的關係上出現不同結果，這可能與檢體的來源有著莫大的關係¹⁹。例如阿茲海默症的病人，其F₂-IsoPs的含量在腦脊髓液⁵⁶或腦組織³⁹中

會有明顯地上升趨勢，但在尿液或血漿中則沒有⁵⁷。阿茲海默症是由於腦部病變所造成的，病人體內氧化壓力的增加主要也表現在腦部，因此可檢測出腦部氧化壓力的檢體，像是腦脊髓液或腦組織，才能顯示出阿茲海默症與F₂-IsoPs的關係。本實驗室主要在研究aSAH與氧化壓力的關係，發現aSAH病人血漿中的F₂-IsoPs含量雖然和腦脊髓液一樣都比正常人高，但只有腦脊髓液的F₂-IsoPs含量才和病人的臨床狀況及癒後（outcome）有相關性⁴³。這個結果也證實，所研究的疾病要與所取得的檢體相配合，才能真正檢測出此疾病與氧化壓力的變化是否有關聯。

F₄-NPs的生成

F₄-NPs於1998年由Roberts等人所發現，這是一個類似IsoPs的物質（F-ring isoprostane-like compounds），產生的機制也十分相似，和F₂-IsoPs的差異在於其為源自於二十二碳六烯酸（docosahexaenoic acids; DHA）的脂質過氧化產物⁵⁸。因為DHA的結構中有六個雙鍵，所以可形成五種DHA自由基，接著與氧反應後，可生成八種過氧化自由基，故整個脂質過氧化反應可形成八種位置異構物，而每個位置異構物又包含八個消旋的非鏡像異構物，所以理論上一共可產生128個F₄-NPs⁵⁸。

F₄-NPs的結構類似於F₂-IsoPs，且帶有F-type IsoP rings和四個雙鍵，因而得名。其命名方式也類似於F₂-IsoPs，以羧基上的碳作為C-1，依據烯丙醇（allylic alcohol）所在之位置將F₄-NPs分為八類：4-、7-、10-、11-、13-、14-、17-和20-系列（圖五）⁵⁹。經分析發現F₄-NPs以4-和20-系列的含量較其他位置異構物多⁶⁰。

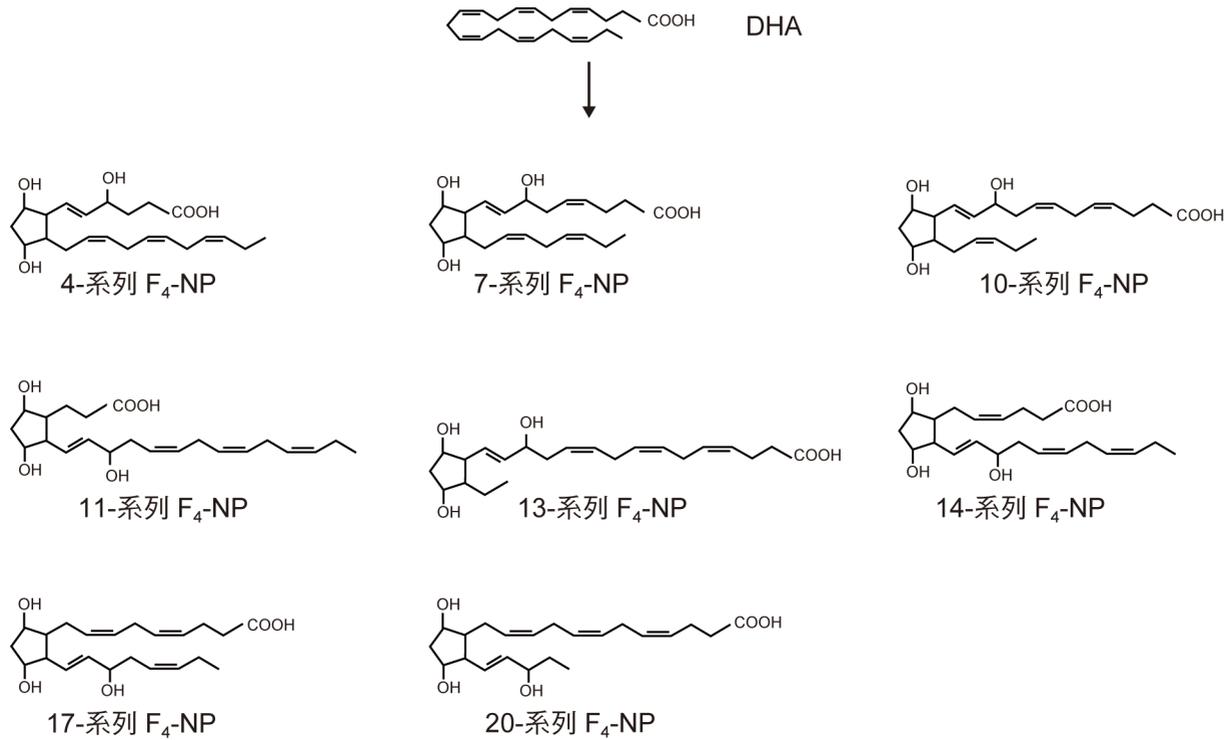
在目前的研究中尚未去探討F₄-NPs是否具有特殊的生物學活性，不過因為DHA的結構中比AA多了二個雙鍵，等量的DHA與AA在活體外進行氧化反應，可生成較多的F₄-NPs，因此DHA對脂質

過氧化反應較AA來得敏感⁵⁸。經研究顯示，DHA主要分布於人體的腦部、視網膜和睪丸中。在腦組織中，DHA又特別存在於神經元的細胞膜上⁶¹。因此腦脊髓液中的F₄-NPs被視為是測量腦神經元氧化傷害較敏感的指標⁶²。

不過因為DHA在人體內的分布有侷限性，所以要測量F₄-NPs作為觀察體內腦神經元的氧化傷害時，檢體的種類就成為很重要的限制因素。目前研究阿茲海默症的Montine團隊就發現，在人類的尿液中檢測不到F₄-NPs的存在⁶³，在1 ml的血漿中雖可檢測到F₄-NPs，但含量十分低，接近偵測極限⁵⁸，只有在腦脊髓液⁵⁸或腦組織⁶⁴中才能夠準確地偵測出F₄-NPs的含量。F₄-NPs的生成也與F₂-IsoPs一樣，先在細胞膜上生成酯化的F₄-NPs，經水解作用才會形成游離態。

F₄-NPs的檢測方法以及與人類疾病的關係

由於腦脊髓液中F₄-NPs的含量低，所需的檢體量較偵測F₂-IsoPs為多，因此F₄-NPs的檢測目前是使用靈敏度較高的GC/NICI-MS方法偵測，一開始由Roberts等人發展出來⁵⁸。此方法所用的內標準品為[²H₄]-PGF_{2α}，不過檢體的前處理方式和F₂-IsoPs類似，主要的差異在於進行SPE純化（矽管柱）時，用來清洗檢體內極性不同之生物分子的有機溶劑不同，以及經TLC純化時，所要萃取的矽之刮下範圍變寬。之後又有發展出以[¹⁸O₂]-17-F_{4c}-NP作為內標準品的檢體前處理方式^{60,64}，但因為[¹⁸O₂]-17-F_{4c}-NP是由Morrow實驗室自行合成的物質，無法在市面上購買到，所以本實驗室以Roberts實驗室後來所用之[²H₄]-15-F_{2t}-IsoP作為內標準品⁶⁵，但經TLC純化時，矽的刮下範圍仍是4公分⁵⁸。由於F₄-NPs有很多同分異構物，以GC/NICI-MS偵測後所得的SIM層析圖顯示出許多訊號波，且每種系列的位置異構物在檢體中所佔之比例又不同，因此是將這些訊號波的面積做積分來



圖五、二十二碳六烯酸 (docosahexaenoic acids; DHA) 與其脂質過氧化產物F₄-NPs之八種位置異構物 (regioisomers) 的化學結構式。

定量。

F₄-NPs算是個新興的生化指標，加上目前只有發展出以GC/NICI-MS的檢測方法，所以使用上並不如F₂-IsoPs這麼普及。以F₄-NPs作為生化指標研究的人類疾病以阿茲海默症為最多，發現不論是在病人的腦脊髓液或是腦組織，還是動物實驗小鼠的腦組織，F₄-NPs的含量均高於控制組^{58,64,66}。而本實驗室所研究的aSAH與氧化壓力的關係中，發現F₄-NPs在病人腦脊髓液中的含量比正常人高出許多，且與病人腦部出血的嚴重程度與癒後好壞有相關性⁶⁷。

在許多引起腦神經病變的疾病或是探討如何降低腦神經元氧化傷害的治療方法之動物實驗上，也運用F₄-NPs作為生化指標。例如在第一型單純疱疹病毒 (herpes simplex virus type 1)

感染而引發腦炎的老鼠腦組織中，其F₄-NPs的含量大幅提升⁶⁸。而因體內先天性免疫 (innate immunity) 的活化或興奮毒性 (excitotoxicity) 所造成腦神經元氧化傷害及樹突退化的老鼠，藉由測量腦組織中F₄-NPs含量的變化，證明給予甲型生育醇或ibuprofen具有療效⁶⁹⁻⁷¹。

其他相關分子及其在活體中評估氧化傷害之可能應用

F₂-IsoPs主要的代謝物2,3-dinor-5,6-dihydro-15-F_{2t}-IsoP，目前是作為以尿液檢體偵測全身性氧化壓力的指標⁷²。尿液的收集對於病人而言是最不具有侵入性的，但是偵測尿液中的F₂-IsoPs，常被人質疑其代表全身的氧化壓力狀態的可行性，因為尿液中的F₂-IsoPs可能主要來自

於腎臟，或許主要代表腎臟的氧化壓力狀態。有鑑於此，測量尿液中由腎臟代謝來的2,3-dinor-5,6-dihydro-15-F_{2t}-IsoP或許有其重要性²。經實驗結果發現，多基因性的高膽固醇血症（polygenic hepercholesterolemia）的病人及以四氯化碳（carbon tetrachloride）處理過的大鼠，尿液中的2,3-dinor-5,6-dihydro-15-F_{2t}-IsoP含量大幅上升，且給予脂溶性抗氧化物的治療，可降低其在尿液中的含量⁷³。這些證實可用2,3-dinor-5,6-dihydro-15-F_{2t}-IsoP代表以尿液檢體偵測全身氧化壓力的指標。不過因其分析時需要使用[¹⁸O₂]-2,3-dinor-5,6-dihydro-15-F_{2t}-IsoP作為內標準品來進行定量，但該內標準品在市面上買不到，因此大大降低其使用之普及率。另外，2,3-dinor-5,6-dihydro-15-F_{2t}-IsoP也和15-F_{2t}-IsoP一樣具有使血管收縮的生物活性⁷⁴。

AA經脂質過氧化反應後生成的H₂-IsoPs中間產物除了可還原成F₂-IsoPs外，其環狀結構的重新排列可生成E環或D環的IsoPs（E₂-IsoP或D₂-IsoP），其中15-E_{2t}-IsoP已被證實具有使血管收縮之生物活性⁷⁵。E₂-IsoP與D₂-IsoP經脫水作用（dehydration）分別會形成A₂-IsoP與J₂-IsoP⁸。這兩個cyclopentenone IsoPs具有高活性，可快速進行Michael addition反應，使硫醇（thiols）類的穀胱甘肽（glutathione）或蛋白質大分子受到攻擊^{76,77}。因此當組織內如硫醇類的還原物質濃度下降時，E₂/D₂-IsoPs的增加程度可能較F₂-IsoPs來得大⁷⁷。另外，H₂-IsoPs的環狀結構重新排列也可形成γ-ketoaldehydes的類似物E₂/D₂-isoketals（E₂/D₂-IsoKs），與蛋白質具有高反應性⁸。不過以上物質只有在組織上測定才具有意義，故在臨床方面之應用有限。

AA的脂質過氧化反應若在高氧的環境下進行，會產生較多的isofurans（IsoFs），而IsoPs產生量相對而言較少。因此IsoFs與IsoPs的比率可因細胞或組織中之氧分壓狀態有所不同⁷⁸。一些神經退化疾病，例如帕金森氏症，就可運用IsoFs作為生

化指標⁴²。

DHA與AA的結構類似，發生脂質過氧化反應的途徑也大同小異，目前就發現其脂質過氧化反應到最後，若進行還原反應，可生成F₄-NPs，若其環狀結構重新排列會變為E₄/D₄-NPs⁷⁹或是neuroketals⁸⁰，E₄/D₄-NPs再進一步進行脫水反應，便可形成A₄/J₄-NPs⁸¹。若DHA在高氧的情形下進行脂質過氧化反應，會產生大量的neurofurans⁸²。這些物質對於研究和腦神經元氧化傷害有關之疾病都有幫助。不過，其應用一樣受限於可獲得腦組織之臨床研究或動物實驗。

結語

F₂-IsoPs、F₄-NPs與其相關物的分析技術雖然很困難與複雜，分析的儀器又不是很容易取得，故很難廣泛推展其檢測法，但是在研究氧化壓力的課題上佔有不可或缺的地位和無可限量的潛力。F₂-IsoPs與F₄-NPs等提供一個強而有力的證據，證實氧化壓力在生理或病理變化上所扮演的角色，讓我們了解氧化壓力與人類疾病的關係和其機制。此外，它們不僅僅只是個氧化傷害的指標，它們及其衍生之某些分子或是部分異構物產生之生物作用可進一步造成組織傷害。由本實驗室目前的研究成果和文獻中的報導可知，這些分子或許可進一步成為評估與氧化壓力相關疾病的嚴重程度、預後（prognosis）或癒後，以及評估抗氧化劑治療效果的生化指標。

致謝

我們要特別感謝美國Vanderbilt大學Jason D. Morrow教授及其實驗室人員提供各項在F₂-IsoPs和F₄-NPs分析的細節，使我們在台灣能夠建立此技術。Morrow教授於2008年夏天不幸驟然過逝，這篇文章除了要表達我們的哀傷和紀念他在IsoPs等分子之發現的貢獻，更要感念他過去六年來對

本文通訊作者不斷的鼓勵和支持，我們才能一步步走過許多的阻礙和挫折。我們也要感謝本校分子醫學中心主任張玉生教授及教育部頂尖大學計畫提供具NICI模式之GC/MS儀器。本實驗室一系列之研究由EMRPD160241、EMRPD170581、NSC 91-2314-B-182-072、NSC96-2320-B-182-018和NSC97-2320-B-182-012-MY3支持。最後，我們要感謝本實驗室前成員許意慈和現在成員薛安利分別在建立IsoPs之前處理流程和GC/MS分析細節之重大貢獻，以及林口長庚醫院腦神經外科林志隆醫師，作為我們研究腦神經外科疾病和氧化壓力的長期合作夥伴。

引用文獻

- Halliwell B, Gutteridge MC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th edition. New York: Oxford University Press, 2007.
- Roberts LJ, Morrow JD. Measurement of F_2 -isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic Biol Med* 2000;28:505-513.
- Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ. A series of prostaglandin F_2 -like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:9383-9387.
- Taber DF, Morrow JD, Roberts LJ. A nomenclature system for the isoprostanes. *Prostaglandins* 1997;53:63-67.
- Rokach J, Khanapure SP, Hwang SW, Adiyaman M, Lawson JA, FitzGerald GA. Nomenclature of isoprostanes: a proposal. *Prostaglandins* 1997;54:853-873.
- Milne GL, Yin H, Morrow JD. Human biochemistry of the isoprostane pathway. *J Biol Chem* 2008;283:15533-15537.
- Morrow JD, Minton TA, Badr KF, Roberts LJ. Evidence that the F_2 -isoprostane, 8-epi-prostaglandin F_{2a} , is formed in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1994;1210:244-248.
- Roberts LJ, Morrow JD. Products of the isoprostane pathway: unique bioactive compounds and markers of lipid peroxidation. *Cell Mol Life Sci* 2002;59:808-820.
- Basu S. Isoprostanes: novel bioactive products of lipid peroxidation. *Free Radic Res* 2004;38:105-122.
- Morrow JD, Roberts LJ. The isoprostanes: unique bioactive products of lipid peroxidation. *Prog Lipid Res* 1997;36:1-21.
- Comporti M, Signorini C, Arezzini B, Vecchio D, Monaco B, Gardi C. F_2 -isoprostanes are not just markers of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2008;44:247-256.
- Hou X, Roberts LJ, Gobeil F Jr, Taber D, Kanai K, Abran D, Brault S, Checchin D, Sennlaub F, Lachapelle P, Varma D, Chemtob S. Isomer-specific contractile effects of a series of synthetic F_2 -isoprostanes on retinal and cerebral microvasculature. *Free Radic Biol Med* 2004;36:163-172.
- Takahashi K, Nammour TM, Fukunaga M, Ebert J, Morrow JD, Roberts LJ, Hoover RL, Badr KF. Glomerular actions of a free radical-generated novel prostaglandin, 8-epi-prostaglandin F_{2a} , in the rat. Evidence for interaction with thromboxane A_2 receptors. *J Clin Invest* 1992;90:136-141.
- Fukunaga M, Makita N, Roberts LJ, Morrow JD, Takahashi K, Badr KF. Evidence for the existence of F_2 -isoprostane receptors on rat vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1993;264:C1619-1624.
- Yura T, Fukunaga M, Khan R, Nassar GN, Badr KF, Montero A. Free-radical-generated F_2 -isoprostane stimulates cell proliferation and endothelin-1 expression on endothelial cells. *Kidney Int* 1999;56:471-478.
- Audoly LP, Rocca B, Fabre JE, Koller BH, Thomas D, Loeb AL, Coffman TM, FitzGerald GA. Cardiovascular responses to the isoprostanes iPF_{2a} -III and iPE_2 -III are mediated via the thromboxane A_2 receptor in vivo. *Circulation* 2000;101:2833-2840.
- Lahaie I, Hardy P, Hou X, Hassessian H, Asselin P, Lachapelle P, Almazan G, Varma DR, Morrow JD, Roberts LJ, Chemtob S. A novel mechanism for vasoconstrictor action of 8-isoprostaglandin F_{2a} on retinal vessels. *Am J Physiol* 1998;274:R1406-1416.
- Comporti M, Arezzini B, Signorini C, Sgherri C, Monaco B, Gardi C. F_2 -isoprostanes stimulate collagen synthesis in activated hepatic stellate cells: a link with liver fibrosis? *Lab Invest* 2005;85:1381-1391.
- Basu S. F_2 -isoprostanes in human health and diseases: from molecular mechanisms to clinical implications. *Antioxid Redox Signal* 2008;10:1405-1434.
- Milne GL, Sanchez SC, Musiek ES, Morrow JD. Quantification of F_2 -isoprostanes as a biomarker of oxidative stress. *Nat Protoc* 2007;2:221-226.
- Milne GL, Yin H, Brooks JD, Sanchez S, Jackson RL, Morrow JD. Quantification of F_2 -isoprostanes in biological fluids and tissues as a measure of oxidant stress. *Methods Enzymol* 2007;433:113-126.
- Waugh RJ, Morrow JD, Roberts LJ, Murphy RC. Identification and relative quantitation of F_2 -isoprostane regioisomers formed in vivo in the rat. *Free Radic Biol Med* 1997;23:943-954.
- Mori TA, Croft KD, Puddey IB, Beilin LJ. An improved method for the measurement of urinary and plasma F_2 -isoprostanes using gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem* 1999;268:117-125.
- Haschke M, Zhang YL, Kahle C, Klawitter J, Korecka M,

- Shaw LM, Christians U. HPLC-atmospheric pressure chemical ionization MS/MS for quantification of 15-F_{2t}-isoprostane in human urine and plasma. *Clin Chem* 2007;53:489-497.
25. Li H, Lawson JA, Reilly M, Adiyaman M, Hwang SW, Rokach J, FitzGerald GA. Quantitative high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric analysis of the four classes of F₂-isoprostanes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:13381-13386.
 26. Yin H, Gao L, Tai HH, Murphey LJ, Porter NA, Morrow JD. Urinary prostaglandin F_{2α} is generated from the isoprostane pathway and not the cyclooxygenase in humans. *J Biol Chem* 2007;282:329-336.
 27. Sircar D, Subbaiah PV. Isoprostane measurement in plasma and urine by liquid chromatography-mass spectrometry with one-step sample preparation. *Clin Chem* 2007;53:251-258.
 28. Taylor AW, Bruno RS, Frei B, Traber MG. Benefits of prolonged gradient separation for high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry quantitation of plasma total 15-series F₂-isoprostanes. *Anal Biochem* 2006;350:41-51.
 29. Wang Z, Ciabattini G, Creminon C, Lawson J, Fitzgerald GA, Patrono C, MacLouf J. Immunological characterization of urinary 8-epi-prostaglandin F_{2α} excretion in man. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;275:94-100.
 30. Yen HC, Cheng HS, Hsu YT, Ho HJ, Nien CY, Lee YS. Effects of age and health status on levels of urinary 15-F_{2t}-isoprostane. *J Biomed Lab Sci* 2001;13:24-28.
 31. Proudfoot J, Barden A, Mori TA, Burke V, Croft KD, Bellin LJ, Puddey IB. Measurement of urinary F₂-isoprostanes as markers of in vivo lipid peroxidation-A comparison of enzyme immunoassay with gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Biochem* 1999;272:209-215.
 32. Delanty N, Reilly MP, Pratico D, Lawson JA, McCarthy JF, Wood AE, Ohnishi ST, Fitzgerald DJ, FitzGerald GA. 8-epi PGF_{2α} generation during coronary reperfusion. A potential quantitative marker of oxidant stress in vivo. *Circulation* 1997;95:2492-2499.
 33. Gniwotta C, Morrow JD, Roberts LJ, Kuhn H. Prostaglandin F₂-like compounds, F₂-isoprostanes, are present in increased amounts in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:3236-3241.
 34. Dworski R, Murray JJ, Roberts LJ, Oates JA, Morrow JD, Fisher L, Sheller JR. Allergen-induced synthesis of F₂-isoprostanes in atopic asthmatics. Evidence for oxidant stress. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1947-1951.
 35. Pratico D, Basili S, Vieri M, Cordova C, Violi F, Fitzgerald GA. Chronic obstructive pulmonary disease is associated with an increase in urinary levels of isoprostane F_{2α}-III, an index of oxidant stress. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:1709-1714.
 36. Carpenter CT, Price PV, Christman BW. Exhaled breath condensate isoprostanes are elevated in patients with acute lung injury or ARDS. *Chest* 1998;114:1653-1659.
 37. Morrow JD, Frei B, Longmire AW, Gaziano JM, Lynch SM, Shyr Y, Strauss WE, Oates JA, Roberts LJ. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F₂-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage. *N Engl J Med* 1995;332:1198-1203.
 38. Montine TJ, Markesbery WR, Morrow JD, Roberts LJ. Cerebrospinal fluid F₂-isoprostane levels are increased in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1998;44:410-413.
 39. Pratico D, MY Lee V, Trojanowski JQ, Rokach J, Fitzgerald GA. Increased F₂-isoprostanes in Alzheimer's disease: evidence for enhanced lipid peroxidation in vivo. *FASEB J* 1998;12:1777-1783.
 40. Montine TJ, Beal MF, Robertson D, Cudkovicz ME, Biaggioni I, O'Donnell H, Zackert WE, Roberts LJ, Morrow JD. Cerebrospinal fluid F₂-isoprostanes are elevated in Huntington's disease. *Neurology* 1999;52:1104-1105.
 41. Greco A, Minghetti L, Sette G, Fieschi C, Levi G. Cerebrospinal fluid isoprostane shows oxidative stress in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 1999;53:1876-1879.
 42. Fessel JP, Hulette C, Powell S, Roberts LJ, Zhang J. Isofurans, but not F₂-isoprostanes, are increased in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease and with dementia with Lewy body disease. *J Neurochem* 2003;85:645-650.
 43. Lin CL, Hsu YT, Lin TK, Morrow JD, Hsu JC, Hsu YH, Hsieh TC, Tsay PK, Yen HC. Increased levels of F₂-isoprostanes following aneurysmal subarachnoid hemorrhage in humans. *Free Radic Biol Med* 2006;40:1466-1473.
 44. Kelly PJ, Morrow JD, Ning M, Koroshetz W, Lo EH, Terry E, Milne GL, Hubbard J, Lee H, Stevenson E, Lederer M, Furie KL. Oxidative stress and matrix metalloproteinase-9 in acute ischemic stroke: the Biomarker Evaluation for Antioxidant Therapies in Stroke (BEAT-Stroke) study. *Stroke* 2008;39:100-104.
 45. Sampson MJ, Gopaul N, Davies IR, Hughes DA, Carrier MJ. Plasma F₂ isoprostanes: direct evidence of increased free radical damage during acute hyperglycemia in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2002;25:537-541.
 46. Wu JH, Ward NC, Indrawan AP, Almeida CA, Hodgson JM, Proudfoot JM, Puddey IB, Croft KD. Effects of α-tocopherol and mixed tocopherol supplementation on markers of oxidative stress and inflammation in type 2 diabetes. *Clin Chem* 2007;53:511-519.
 47. O'Byrne S, Forte P, Roberts LJ, Morrow JD, Johnston A, Anggard E, Leslie RD, Benjamin N. Nitric oxide synthesis and isoprostane production in subjects with type 1 diabetes and normal urinary albumin excretion. *Diabetes* 2000;49:857-862.

48. Ikizler TA, Morrow JD, Roberts LJ, Evanson JA, Becker B, Hakim RM, Shyr Y, Himmelfarb J. Plasma F₂-isoprostane levels are elevated in chronic hemodialysis patients. *Clin Nephrol* 2002;58:190-197.
49. Meagher EA, Barry OP, Burke A, Lucey MR, Lawson JA, Rokach J, FitzGerald GA. Alcohol-induced generation of lipid peroxidation products in humans. *J Clin Invest* 1999;104:805-813.
50. Barden A, Zilkens RR, Croft K, Mori T, Burke V, Beilin LJ, Puddey IB. A reduction in alcohol consumption is associated with reduced plasma F₂-isoprostanes and urinary 20-HETE excretion in men. *Free Radic Biol Med* 2007;42:1730-1735.
51. Cracowski JL, Girolet S, Imbert B, Seinturier C, Stanke-Labesque F, Bessard J, Boignard A, Bessard G, Carpentier PH. Effects of short-term treatment with vitamin E in systemic sclerosis: a double blind, randomized, controlled clinical trial of efficacy based on urinary isoprostane measurement. *Free Radic Biol Med* 2005;38:98-103.
52. Matayatsuk C, Lee CY, Kalpravidh RW, Sirankapracha P, Wilairat P, Fucharoen S, Halliwell B. Elevated F₂-isoprostanes in thalassemic patients. *Free Radic Biol Med* 2007;43:1649-1655.
53. Canter JA, Eshaghian A, Fessel J, Summar ML, Roberts LJ, Morrow JD, Sligh JE, Haines JL. Degree of heteroplasmy reflects oxidant damage in a large family with the mitochondrial DNA A8344G mutation. *Free Radic Biol Med* 2005;38:678-683.
54. Comporti M, Signorini C, Leoncini S, Buonocore G, Rossi V, Ciccoli L. Plasma F₂-isoprostanes are elevated in newborns and inversely correlated to gestational age. *Free Radic Biol Med* 2004;37:724-732.
55. Reuter SD, O'Donovan DJ, Hegemier SE, Smith EO, Heird WC, Fernandes CJ. Urinary F₂-isoprostanes are poor prognostic indicators for the development of bronchopulmonary dysplasia. *J Perinatol* 2007;27:303-306.
56. Montine TJ, Beal MF, Cudkovic ME, O'Donnell H, Margolin RA, McFarland L, Bachrach AF, Zackert WE, Roberts LJ, Morrow JD. Increased CSF F₂-isoprostane concentration in probable AD. *Neurology* 1999;52:562-565.
57. Montine TJ, Shinobu L, Montine KS, Roberts LJ, Kowall NW, Beal MF, Morrow JD. No difference in plasma or urinary F₂-isoprostanes among patients with Huntington's disease or Alzheimer's disease and controls. *Ann Neurol* 2000;48:950.
58. Roberts LJ, Montine TJ, Markesbery WR, Tapper AR, Hardy P, Chemtob S, Dettbarn WD, Morrow JD. Formation of isoprostane-like compounds (neuroprostanes) in vivo from docosahexaenoic acid. *J Biol Chem* 1998;273:13605-13612.
59. Taber DF, Roberts LJ. Nomenclature systems for the neuroprostanes and for the neurofurans. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2005;78:14-18.
60. Yin H, Musiek ES, Gao L, Porter NA, Morrow JD. Regiochemistry of neuroprostanes generated from the peroxidation of docosahexaenoic acid in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 2005;280:26600-26611.
61. Skinner ER, Watt C, Besson JA, Best PV. Differences in the fatty acid composition of the grey and white matter of different regions of the brains of patients with Alzheimer's disease and control subjects. *Brain* 1993;116(Pt 3):717-725.
62. Roberts LJ, Fessel JP. The biochemistry of the isoprostane, neuroprostane, and isofuran pathways of lipid peroxidation. *Chem Phys Lipids* 2004;128:173-186.
63. Montine TJ, Quinn JF, Milatovic D, Silbert LC, Dang T, Sanchez S, Terry E, Roberts LJ, Kaye JA, Morrow JD. Peripheral F₂-isoprostanes and F₄-neuroprostanes are not increased in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2002;52:175-179.
64. Musiek ES, Cha JK, Yin H, Zackert WE, Terry ES, Porter NA, Montine TJ, Morrow JD. Quantification of F-ring isoprostane-like compounds (F₄-neuroprostanes) derived from docosahexaenoic acid in vivo in humans by a stable isotope dilution mass spectrometric assay. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004;799:95-102.
65. Arneson KO, Roberts LJ. Measurement of products of docosahexaenoic acid peroxidation, neuroprostanes, and neurofurans. *Methods Enzymol* 2007;433:127-143.
66. Reich EE, Markesbery WR, Roberts LJ, Swift LL, Morrow JD, Montine TJ. Quantification of F-ring and D-/E-ring isoprostanes and neuroprostanes in Alzheimer's disease. *Adv Exp Med Biol* 2001;500:253-256.
67. Hsieh YP, Lin CL, Shieh AL, Yin H, Yen HC. Correlation of F₄-neuroprostanes levels in cerebrospinal fluid with outcome and severity of aneurysmal subarachnoid hemorrhage in humans. *Free Radic Biol Med* 2008;45: S105. (Abstract)
68. Milatovic D, Zhang Y, Olson SJ, Montine KS, Roberts LJ, Morrow JD, Montine TJ, Dermody TS, Valyi-Nagy T. Herpes simplex virus type 1 encephalitis is associated with elevated levels of F₂-isoprostanes and F₄-neuroprostanes. *J Neurovirol* 2002;8:295-305.
69. Milatovic D, Zaja-Milatovic S, Montine KS, Horner PJ, Montine TJ. Pharmacologic suppression of neuronal oxidative damage and dendritic degeneration following direct activation of glial innate immunity in mouse cerebrum. *J Neurochem* 2003;87:1518-1526.
70. Milatovic D, VanRollins M, Li K, Montine KS, Montine TJ. Suppression of murine cerebral F₂-isoprostanes and F₄-neuroprostanes from excitotoxicity and innate immune response in vivo by alpha- or gamma-tocopherol. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*

- 2005;827:88-93.
71. Zaja-Milatovic S, Gupta RC, Aschner M, Montine TJ, Milatovic D. Pharmacologic suppression of oxidative damage and dendritic degeneration following kainic acid-induced excitotoxicity in mouse cerebrum. *Neurotoxicology* 2008;29:621-627.
72. Roberts LJ, Moore KP, Zackert WE, Oates JA, Morrow JD. Identification of the major urinary metabolite of the F₂-isoprostane 8-iso-prostaglandin F_{2α} in humans. *J Biol Chem* 1996;271:20617-20620.
73. Morrow JD, Zackert WE, Yang JP, Kurhts EH, Callewaert D, Dworski R, Kanai K, Taber D, Moore K, Oates JA, Roberts LJ. Quantification of the major urinary metabolite of 15-F_{2t}-isoprostane (8-iso-PGF_{2α}) by a stable isotope dilution mass spectrometric assay. *Anal Biochem* 1999;269:326-331.
74. Hou X, Roberts LJ, Taber DF, Morrow JD, Kanai K, Gobeil F Jr, Beauchamp MH, Bernier SG, Lepage G, Varma DR, Chemtob S. 2,3-Dinor-5,6-dihydro-15-F_{2t}-isoprostane: a bioactive prostanoid metabolite. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001;281:R391-400.
75. Fukunaga M, Takahashi K, Badr KF. Vascular smooth muscle actions and receptor interactions of 8-iso-prostaglandin E₂, an E₂-isoprostane. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;195:507-515.
76. Milne GL, Zanoni G, Porta A, Sasi S, Vidari G, Musiek ES, Freeman ML, Morrow JD. The cyclopentenone product of lipid peroxidation, 15-A_{2t}-isoprostane, is efficiently metabolized by HepG2 cells via conjugation with glutathione. *Chem Res Toxicol* 2004;17:17-25.
77. Milne GL, Musiek ES, Morrow JD. The cyclopentenone (A₂/J₂) isoprostanes--unique, highly reactive products of arachidonate peroxidation. *Antioxid Redox Signal* 2005;7:210-220.
78. Fessel JP, Jackson RL. Isofurans: novel products of lipid peroxidation that define the occurrence of oxidant injury in settings of elevated oxygen tension. *Antioxid Redox Signal* 2005;7:202-209.
79. Reich EE, Zackert WE, Brame CJ, Chen Y, Roberts LJ, Hachey DL, Montine TJ, Morrow JD. Formation of novel D-ring and E-ring isoprostane-like compounds (D₄/E₄-neuroprostanes) in vivo from docosahexaenoic acid. *Biochemistry* 2000;39:2376-2383.
80. Bernoud-Hubac N, Davies SS, Boutaud O, Montine TJ, Roberts LJ. Formation of highly reactive gamma-ketoaldehydes (neuroketals) as products of the neuroprostaglandin pathway. *J Biol Chem* 2001;276:30964-30970.
81. Fam SS, Murphey LJ, Terry ES, Zackert WE, Chen Y, Gao L, Pandalai S, Milne GL, Roberts LJ, Porter NA, Montine TJ, Morrow JD. Formation of highly reactive A-ring and J-ring isoprostane-like compounds (A₄/J₄-neuroprostanes) in vivo from docosahexaenoic acid. *J Biol Chem* 2002;277:36076-36084.
82. Song WL, Lawson JA, Reilly D, Rokach J, Chang CT, Giasson B, FitzGerald GA. Neurofurans, novel indices of oxidant stress derived from docosahexaenoic acid. *J Biol Chem* 2008;283:6-16.