

蛋白质加合物作为分子生物标志物的分析研究

刘淑芬¹, 方清明¹, 金祖亮¹, S. M. Rappaport² (1. 中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085; 2. UNC AT CHAPEL HILL, NC, USA)

摘要: 为了探索研究用人的静脉血中蛋白质-环氧苯乙烯加合物作为人接触苯乙烯的分子生物标志物的可行性, 用改进的 Ra-Ni 方法分析测定蛋白质-环氧苯乙烯加合物。收集大白鼠鲜血与环氧苯乙烯体外反应的加合物样品, 用定量苯乙烯, 环氧苯乙烯染毒的大白鼠血样品和 2 个现场接触苯乙烯的工人静脉血(石棉厂, 钢琴厂)样品, 测所有样品里的蛋白质加合物。结果表明体外反应样品, 所测的蛋白质-环氧苯乙烯加合物与环氧苯乙烯剂量有较好的相关性; 动物实验样品所测的蛋白质加合物分别与注射环氧苯乙烯, 苯乙烯剂量呈较好的相关性; 现场人群的样品, 所测石棉厂的人群血中蛋白质加合物与接触苯乙烯剂量有一定的相关性, 而钢琴厂的人群血样中所测的蛋白质加合物与接触苯乙烯剂量相关性不明显。根据蛋白质-环氧苯乙烯加合物与剂量的关系, 初步确认用血红蛋白中的半胱氨酸-环氧苯乙烯加合物作为人接触苯乙烯的分子标志物有可行性。同时为用蛋白质-环氧苯乙烯加合物作为人接触低浓度苯乙烯的分子生物标志物提供可靠的现场实验数据。

关键词: 蛋白质加合物; 环氧苯乙烯; 分子生物标志物

中图分类号: X17 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2000)05-0006-06

Investigation of Protein Adducts as A Molecular Biomarker for Human Exposed to Pollutants

Liu Shufen¹, Fang Qingming¹, Jin Zuliang¹, Rappaport S. M.² (1. Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China; 2. UNC AT CHAPEL HILL, NC, USA)

Abstract: Hemoglobin-styrene oxide adducts in blood was studied as a molecular biomarker of worker exposed to styrene. Determination of protein-styrene oxide adducts in different biological samples with modified Ra-Ni procedure was described in this paper. The following biological samples were investigated: flash rat blood reacted with styrene oxide in vitro; rat blood reacted with styrene or styrene oxide in vivo; vein blood from workers in two factories who exposed to styrene. The data showed that there was a good dose-response relationship between reacting dose of styrene oxide or styrene and amount of protein-styrene oxide adducts in both in vitro and in vivo experiments. For human samples, a dose-response relationship between adducts and exposure was found in glass fiber factory, but none in piano manufacture plant.

Keywords: protein adduct; styrene oxide; molecular biomarker

DNA 加合物作为人接触有毒物的分子生物标志物, 是当今国内外相关领域的研究热点^[1]。到目前为止, 对人群体研究无论是化合物种类还是现场都是有限的, 仅有对环氧乙烷, 环氧丙烷, 三硝基甲苯等几种化合物的研究报道^[2]。已经研究证明, 毒性不大的苯乙烯经氧化代谢所形成的环氧苯乙烯(styrene oxide, SO)有致突, 致癌作用^[3], 因为它能与 DNA, 蛋白质形成加合物, 且与剂量有相关性^[4]。Christakopoulos A 等用改进的 Edman 方法测玻璃钢厂工人静脉血中血红蛋白(Hemoglobin, Hb)-SO 加合物(测 N-末端缬氨酸加合物)与接触苯乙烯浓度有相关性^[5], 而 Karen Y 等用 Ra-Ni 方法分析测定船厂工人静脉血中 Hb-SO 加合物(测半胱氨酸加合物)与接触苯乙烯浓度相关性不

明显^[6]。本文选择人接触低浓度苯乙烯的现场, 用改进的 Ra-Ni 分析方法分析测定生物样品里的蛋白质-SO 加合物, 结果在一个现场的人群血中测出 Hb-SO 加合物与接触低浓度的苯乙烯有较好的相关性, 为探讨用蛋白质-SO 加合物作为人接触低浓度苯乙烯的分子生物标志物提供可靠的依据。

1 实验

1.1 材料与仪器

化学品: 苯乙烯(99%), 环氧苯乙烯(97%), 3-苯

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(59873028)和美国国家卫生基金资助协作项目

作者简介: 刘淑芬(1941~), 女, 研究员, 主要研究方向是环境分析化学与分子毒理。

收稿日期: 1999-09-10

基丙醇(3PP), 甲氧基苄, Raney-Nickel(Ra-Ni, 50% 水含量保存), N-溴丁二酰亚胺(NBS), 4-甲基苯乙烯, 4-甲基苯乙醇(4-m-2-PE), 吡啶(无水), 五氟苯酰氯(PFB-酰氯)等购于 Aldrich 公司; 人的血红蛋白, 蛋白质辅酶 XIV, 透析膜(内径 16mm)购置于 Sigma 公司; 其他常用的化学药品购于北京化学试剂公司。

仪器: 气相色谱(GC)5890(HP), 色谱质谱联用仪(GC/MS)5989(HP), 高速离心机(Bekeman), 普通离心机, 紫外可见分光光度计, 真空干燥箱, 恒温水浴等为国产。

1.2 实验方法

1.2.1 部分化学品及标样的合成与纯化

(1) 4-甲基环氧苯乙烯(4m-SO) 用 4-甲基苯乙烯和 NBS 反应, 分离后用 NaOH 处理有机层, 反应 2h 后的有机层经干燥, 净化, 淋洗, 浓缩, 得到 4m-SO, 制备的详细过程见参考文献[7]。

(2) 4-甲基环氧苯乙烯蛋白质加合物(4m-SO-Hb, 4m-SO-Ab) 10mg 的蛋白质(Hb, Ab-白蛋白-Albumin)与 4m-SO 在 37℃ 下培养 10h, 经过净化的蛋白质产物用含盐酸的冷丙酮沉淀, 分离后的固体干燥至恒重, 加合物的鉴定方法及制备过程参考文献[8]。

(3) 蛋白质加合物标样 d8SO-Hb, d8SO-Ab 是 Dr. Karen(UNC NC USA) 提供。

1.2.2 蛋白质加合物样品的制备

(1) 体外反应样品的制备 0.5ml ISO 生理盐水溶液加入到 1.2ml 新鲜的大鼠全血中, 使其最终的溶液 SO 的浓度为: 0, 10, 30, 100, 300 $\mu\text{mol/L}$, 37℃, 2h, 反应液经提取, 净化得到相应的含有加合物的蛋白质样品。

(2) 动物实验样品的制备 苯乙烯和 SO 分别注射到 SD 大鼠腹腔内, 计量分别为: 苯乙烯是 0, 0.5, 1.0, 3.0ml ol/kg 体重; SO 为 0, 0.1, 0.3, 1.0ml ol/kg 体重; 24h 后用肝素处理过的注射器从大鼠的心脏取血。

(3) 现场人群血样的采取 选择石棉厂玻璃钢器件制造车间 11 位, 钢琴厂喷漆车间 10 位职业接触苯乙烯的工人为检测对象。首先测定每人接触苯乙烯浓度(采样时间是工作班 6h), 用解析气相色谱法(GB/T 16053-1995)分析苯乙烯浓度, 详细过程参照文献[8], 然后采集人的静脉血 5ml 于带有肝素抗凝剂的 10ml 的试管中。

(4) 蛋白质的分离与纯化 采集全血样品在 6h 之内离心, 分离出血浆, 白血球和红细胞。从红细胞中提取 Hb 的过程是用采用高速离心(4℃, 15000r/min) 40min, 经透析后的 Hb 与冷的酸性丙酮反应, 离心分离出球蛋白经淋洗, 干燥备用。血浆中提取 Ab 的过程

是在血浆中加入饱和的氯化氨, 高速离心后加醋酸氨再离心得白蛋白, 经透析, 冰冻干燥后备分析, 蛋白质分离纯化的详细过程参考文献[8]。

1.2.3 用 Ra-Ni 过程分析蛋白质-SO 加合物

(1) 蛋白质样品的水解 10mg 蛋白质样品和 25 μg 4m-SO-Hb 标样溶于 4ml 的水中, 加 25 μg 的标样 d8-SO-Hb, 加 1ml 0.1mol/L Tris-HCl(pH = 7.5), 加 750 μg 的蛋白质辅酶 XIV, 混合后 37℃ 反应 4h, 冷却后用 2 \times 5ml 乙醚预提取, 离心分离收集水层。

(2) Raney-Nickel(Ra-Ni) 催化还原反应 在上述水溶液中加入 5 μg 的苯丙醇(3-phenylpropanol, 3-PP), 加 200mg 的 Ra-Ni, 4℃ 振荡 40min, 用乙醚提取分离, N₂ 干燥。

(3) 衍生化反应 上述样品中加入 1ml 的正己烷, 加 3 μl 吡啶, 1.5 μl 的五氟苯酰氯衍生物(phentafluorobenzoyl chloride, PFB), 50℃ 进行反应 20min, 冷却后用 0.5ml 的甲醇水溶液洗涤, 分离后的正己烷层用 N₂ 干燥到样品体积大约为 200 μl 。

(4) GC/MS 分析 用负离子化学源的 GC/MS (HP-5989A) 仪器分析, 石英毛细管柱长 30m, 内径 0.242mm, 1 μm 厚度的 Db-5 熔融管柱; 程序温度如下: 初温 75℃ 保持 2min, 20℃/min 的速度升到 200℃, 保持 12min, 再以 50℃/min 的速度升到终温 250℃, 保持 10min; 离子源的温度是 150℃, 1 μl 非分流进样, 进样温度 250℃, NICI 的反应气体为甲烷, 载气为氦气, 在 M/Z 316 (2-PE-PFB), M/Z 324 (1-PE-PFB, d8-2-PE), M/Z 330 (4m-2-PE-PFB, 3-PP-PFB) 进行选择性的离子监测, 峰面积定量, 加合物衍生物的保留时间为: 1-PE-PFB(PE, 苯乙醇, phenylethanol) = 14.05min, 2-PE-PFB = 15.47min, d8-2-PE-PFB = 15.38min, 4m-2-PE-PFB = 17.62min, 3-PP-PFB = 18.20min。

2 结果与讨论

2.1 体外反应样品中蛋白质加合物分析结果

(1) 血红蛋白(Hb)-SO 加合物的分析 按上述分析方法, 用 300 $\mu\text{mol/L}$ 的 SO 和大鼠的鲜血体外反应, 同时测定样品中 3 种不同的血红蛋白加合物, 它们是半胱氨酸-SO 的加合物(1-PE, 2-PE), 羧酸-SO 加合物(SG), 图 1, 图 2 给出 3 种加合物的质谱分析结果。

(2) 蛋白质-SO 加合物与剂量的相关性 不同的 SO 浓度和新鲜大鼠血进行体外反应, 3 种蛋白质加合物的分析结果如图 3 所示。从图 3 结果可以看出在实验浓度范围内, 加合物 Hb-SO, Ab-SO 与反应物 SO 的剂量有较好的相关性, 形成加合物的量是 2-PE > 1-PE > SG。

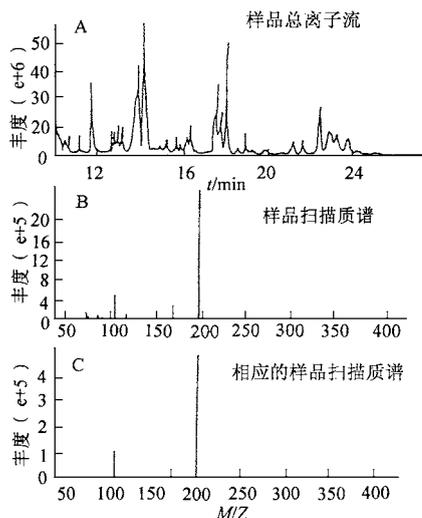


图 1 Hb-SO 体外反应加合物的质谱图(水解后)

Fig. 1 GC/MS/EI analysis of SO-Hb adducts in vitro

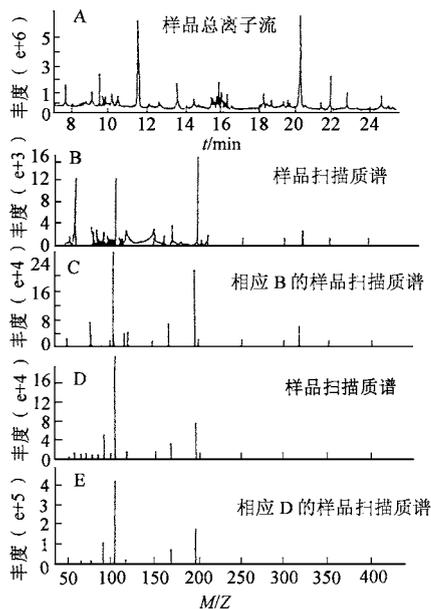


图 2 Hb-SO 体外反应加合物的质谱图(Ra-Ni催化后)

Fig. 2 GC/MS/EI analysis of SO-Hb adducts (Ra-Ni) in vitro

(3) 蛋白质-SO 加合物的检测限 用人的血红蛋白(商品) 10mg, 按上述方法测定加合物的检测限分别为: SG 是 8pmol/gGb, 1-PE 是 5pmol/gGb, 2-PE 是 0.6pmol/gGb. 方法的精密度实验是采用 30 次实验, 测得的变更系数为 12%. 由此可以看出分析方法有高的灵敏度, 好的重现性.

2.2 动物实验样品中蛋白质加合物的分析结果

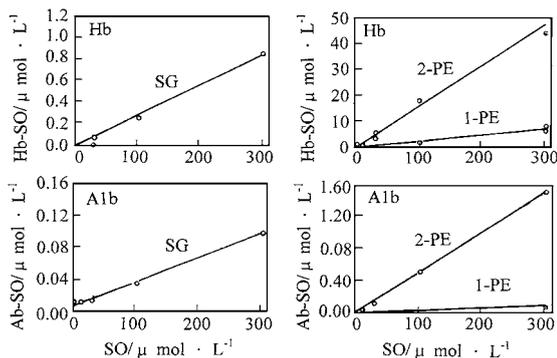


图 3 大鼠血与 SO 体外反应蛋白质-SO 加合物与 SO 剂量关系

Fig. 3 Protein-SO adducts in rat blood treated to SO in vitro

将定量的苯乙烯和 SO 分别注射大白鼠的腹腔内, 测血中蛋白质-SO 3 种加合物(SG, 1-PE, 2-PE) 结果见图 4, 图 5.

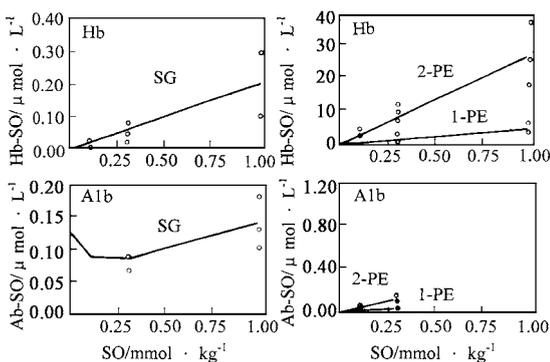


图 4 大鼠血中蛋白质-SO 加合物与 SO 剂量的关系

Fig. 4 Protein-SO adducts in rat blood treated to SO in vivo

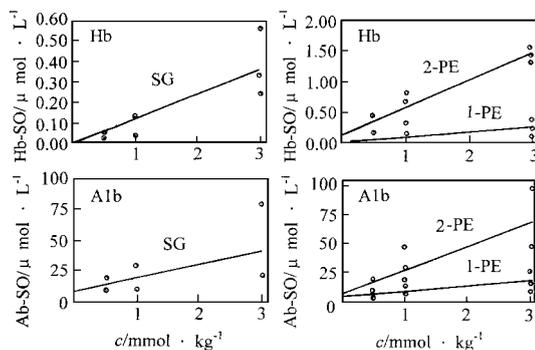


图 5 大鼠血中蛋白质-SO 加合物与苯乙烯剂量的关系

Fig. 5 Protein-SO adducts in rat blood treated to styrene in vivo

从图 4 图 5 可以比较明显的看出, 无论苯乙烯还是环氧苯乙烯与蛋白质形成的蛋白质-SO 加合物与所注入的剂量有较好的相关性, 而且 2-PE > 1-PE > SG, 对比图 3 有类似的结果, 说明蛋白质中半胱氨酸与 SO 的加合能力优于羧酸, 而 SO 形成加合物的能力是 α 位 (2-PE) 优于 β 位 (1-PE)。

2.3 现场职业接触苯乙烯人群静脉血中蛋白质-SO 加合物检测结果

(1) 石棉厂职业接触苯乙烯人群静脉血中蛋白质-SO 加合物检测结果 ① 个体接触苯乙烯的浓度见表 1。② 人群血中蛋白质-SO 加合物 (Hb-SO, Ab-SO) 分析测定结果, 加合物的质谱分析, 加合物与剂量的关系见表 2 和图 6, 7, 8。

表 1 石棉厂采样现状与个体接触苯乙烯浓度¹⁾/mg·m⁻³

编号	性别	年龄	工龄	吸烟史	苯乙烯浓度		
		/岁	/a	/a	第 1 次	第 2 次	平均值
1	女	33	10		77.6	74.3	75.95
2	女	32	10		38.7	48.2	43.45
3	女	28	10		68.5	71.2	69.9
4	女	32	4		32.8	35.5	34.1
5	男	22	4 月	1	1.8	2.0	1.9
6	男	33	10	10	10.5	10.5	10.5
7	男	46	13		13.3	13.3	13.4
8	女	40	12		4.2	4.2	4.2
9	男	30	10	8	12.5	12.5	12.5
10	男	29	10	10	3.7	3.7	3.7
11	男	47	6	戒 10	3.5	3.5	2.5

1) 被采样 11 位工人的工种是人工制造玻璃钢零件, 班上 6h 取样, 采血 5ml。

表 2 人血中蛋白质-SO 加合物(石棉厂)/nmol·g⁻¹

编号	苯乙烯	加合物 1	加合物 2	加合物 1	加合物 2
	浓度 ¹⁾ /mg·m ⁻³	-PE ²⁾ (Gb)	-PE ²⁾ (Gb)	-PE ³⁾ (Ab)	-PE ³⁾ (Ab)
1	75.95		4.00	0.00	3.01
2	43.45	0.07	3.05	0.00	2.18
3	69.9	0.38	3.77	0.00	2.86
4	34.15	0.37	2.84	0.01	2.24
5	1.9	0.47	3.66	0.05	3.00
6	10.5	0.30	2.58	0.30	1.92
7	13.4	0.08	2.09	0.00	3.61
8	4.2	0.26	2.37	0.00	1.99
9	12.5	0.24	2.38	0.41	2.79
10	3.7	0.13	2.12	0.18	1.66
11	3.5	0.21	2.30	0.00	1.81

1) 2 次平均值 2) Hb-SO 加合物 3) Ab-SO 加合物

从图 7、图 8 及表 2 看出, 所测加合物中, Hb-SO 加合物略大于 Ab-SO 加合物, 无论在 Hb 还是 Ab 中加合物 2-PE > 1-PE, 而且 1-PE 的量都很少。在 Hb-SO 加合物中的 2-PE 与接触的苯乙烯浓度有较好的相关

性(图 7), 线性相关 $y = 0.019x + 2.36179$ ($r^2 = 0.5561$, $n = 11$), 若以 10 人为组(除编号 5), 线性相关为 $y = 0.0275x + 2.1075$ ($r^2 = 0.9433$, $n = 10$), 其编号 1~4 取样时在一线工作, 接触浓度相对较高, 所测 2-PE 加合物也多, 而编号 5 工作时间短, 取样当时不在一线工作(所测浓度低), 加合物偏高, 原因待查。

总之从图 7 的 1 组数据明显看出加合物 2-PE 与接触苯乙烯浓度有较好的相关性。其他的几组数据, 如 Hb 中的 1-PE, Ab 中的 1-PE, 2-PE 中加合物与剂量的相关性不明显。应指出在人血样品中只测半胱氨酸加合物(1-PE, 2-PE), 没测 SG 加合物, 原因是在体外和动物实验样品中所测的 SG 加合物量很少, 在人群样品中的意义不大。

(2) 钢琴厂职业接触苯乙烯人群静脉血中蛋白质-SO 加合物检测结果 ① 钢琴厂 10 位职业接触苯乙烯工人个体接触苯乙烯浓度见表 3。② 人群血中蛋白质-SO 加合物分析测定结果: 用上述同样的分析过程分析测定钢琴厂所选人群(10 人) 静脉血中蛋白质-SO 加合物(Hb-SO, Ab-SO), 结果见表 4, 加合物与剂量的关系见图 9, 10。

表 3 钢琴厂采样现状与个体接触苯乙烯浓度¹⁾/mg·m⁻³

编号	性别	年龄	工龄	吸烟史	苯乙烯浓度		
		/岁	/a	/a	第 1 次	第 2 次	平均
12	女	45	8		86.4	83.3	84.8
13	男	50	10	25	302.0	302.0	302.0
14	女	30	5		476.0	535.0	505.0
15	女	40	16		19.0	20.4	19.7
16	男	40	0.1	20	289.0	298.0	293.5
17	男	24	6		151.0	111.0	131.0
18	女	33	12		185.0	234.0	209.5
19	女	39			247.0	279.0	263.0
20	男	22	4	4	90.2	78.9	84.5
21	男	32	4		81.1	84.1	82.6

1) 工种是油漆, 刷漆, 喷漆, 配漆等。班上 6h 取样, 采血 5ml。

从表 4 和图 9, 10 的结果, 初步可以看出在接触苯乙烯的工人静脉血中所测的血红蛋白加合物与剂量其中一组有微弱的相关性(2-PE), 其它几组数据如 Hb 的 1-PE, Ab 中的 1-PE, 2-PE 与剂量相关不明显, 2 种加合物同样是 2-PE > 1-PE。

3 小结

(1) 用 Ra-Ni 方法测蛋白质与环氧苯乙烯加合物的分析方法是灵敏的(如 2-PE 是 0.6Pm ol/gGb), 能同时分析测定蛋白质与 SO 体外反应。动物实验样品中 3 种不同的蛋白质-SO 加合物, 同等反应条件所形成的加合物含量是 2-PE > 1-PE > SG。分析方法灵敏度高,

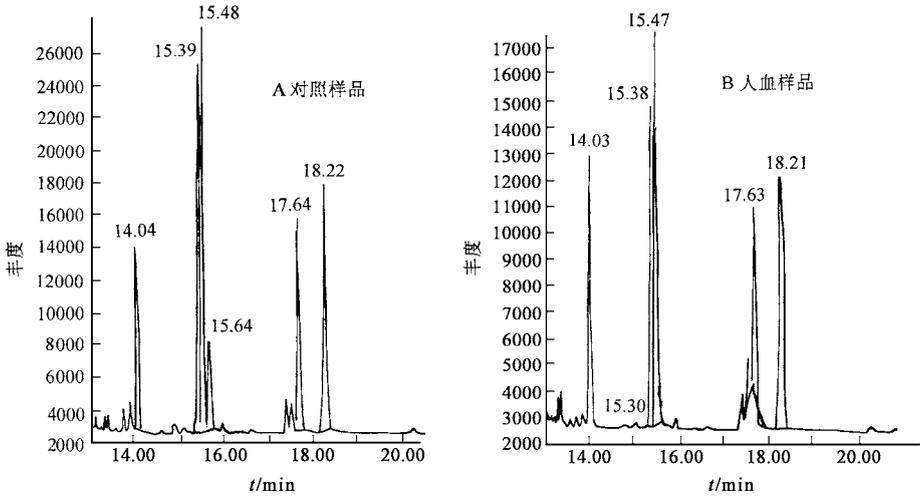


图 6 人血样中蛋白质-SO 加合物的质谱图(石棉厂)

Fig. 6 GC/MS analysis of protein-SO in human exposed to styrene

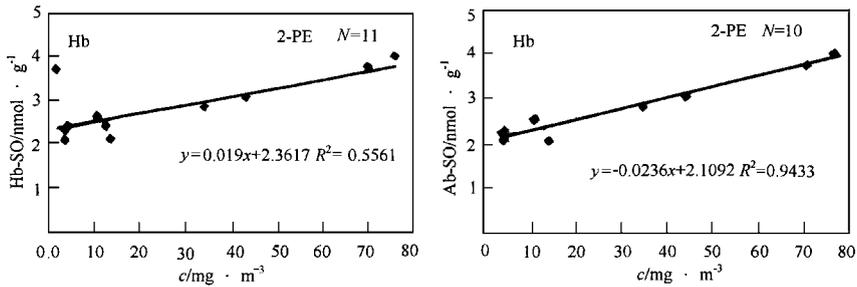


图 7 人血 Hb-SO 加合物与剂量的相关性(石棉厂)

Fig. 7 Hb-SO adducts in human blood exposed to styrene

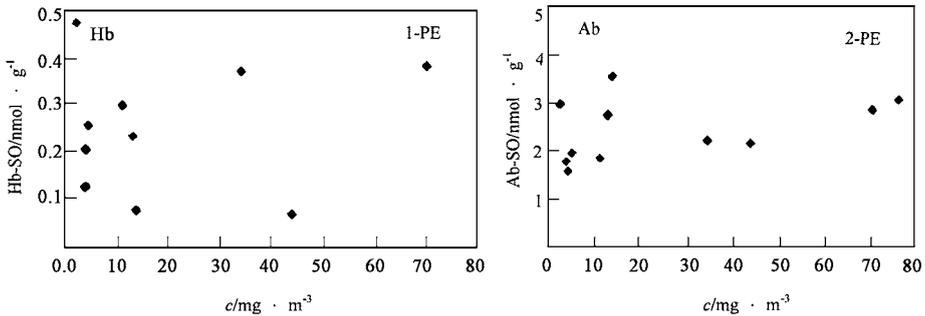


图 8 人血蛋白质-SO 加合物与剂量的关系(石棉厂)

Fig. 8 Protein-SO adducts in human blood exposed to styrene

重现性较好, 样品容易获得.

(2) 各种生物样品中的血红蛋白加合物与接触剂量有较好的相关性. 体外反应样品中, Hb-SO, Ab-SO 加合物(SG, 1-PE, 2-PE)与SO 剂量在实验剂量范围内成线性相关. 动物实验样品中, 相同的 Hb-SO, Ab-SO 加合物与SO, 苯乙烯在实验剂量范围内成线性相关.

在 2 个接触苯乙烯的人群实验中, 所测蛋白质加合物与剂量有不同的结果, 在石棉厂的人群中, 所测的 Hb-SO 加合物中的 2-PE 与接触苯乙烯剂量有很好的相关性, Ab-SO 加合物中的 2-PE, 也有微弱的相关性, 而 1-PE 加合物看不出有明显的相关性. 在钢琴厂的人群实验中, 所测的 Hb-SO 加合物中的 2-PE 与苯乙烯有微

表 4 人血中蛋白质-SO 加合物(钢琴厂,
Hb-SO, Ab-SO)/nmol·g⁻¹

Table 4 Protein-SO adducts in human exposed
to styrene

编号	苯乙烯 浓度 ¹⁾ /mg·m ⁻³	加合物 1-PE ²⁾ (Hb)	加合物 2-PE ²⁾ (Hb)	加合物 1-PE ³⁾ (Ab)	加合物 2-PE ³⁾ (Ab)
12	84.8	0.08	1.64	0.00	2.32
13	302.0	0.28	1.70	0.14	2.96
14	505.5	0.26	2.24	0.00	1.42
15	19.7	0.21	2.74	0.00	2.48
16	293.5	0.41	2.05	0.00	2.70
17	131.0	0.13	1.77	0.00	1.93
18	209.5	0.08	2.54	0.00	1.79
19	263.0	0.39	2.84	0.00	1.43
20	84.5	0.18	2.81	0.00	2.01
21	82.6	0.20	2.19	0.00	2.83

1) 二次平均值 2) Hb-SO 加合物 3) Ab-SO 加合物.

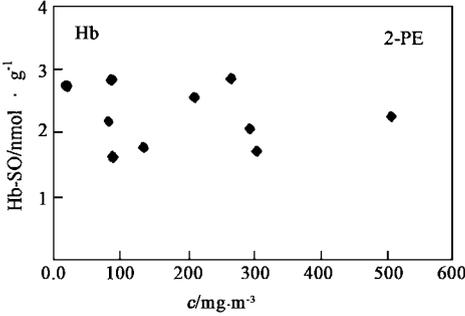


图 9 人的血红蛋白-SO 加合物与苯乙烯浓度的关系(钢琴厂)

Fig. 9 Adducts of hemoglobin-SO in workers exposed to styrene

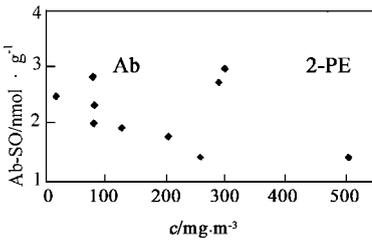


图 10 人白蛋白-SO 加合物与苯乙烯浓度关系(钢琴厂)

Fig. 10 Adducts of Albumin-SO in workers exposed
to styrene

现场人群样品的数据还不能进行统计计算。总之,蛋白质加合物分析方法的改进,分析结果差异原因的探讨如现场与现场,人与人,实验室与实验室,不同的分析方法之间,动物实验结果如何应用人体,分析结果的统计学意义等诸多问题都是研究蛋白质加合物作为人接触有毒物分子生物标志物应进一步深入探讨的问题。

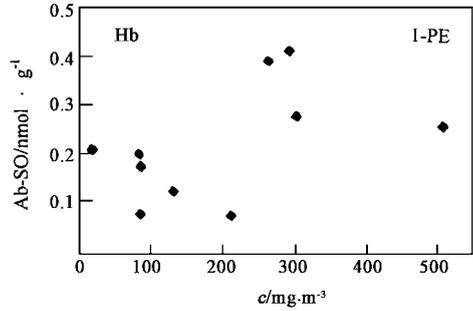
参考文献:

1 Segerback D. Alkylation of DNA and hemoglobin in the

弱的相关性,而其它的 Hb-SO 加合物中的 1-PE, Ab-SO 加合物中的 1-PE, 2-PE 看不出明显的相关性。总之从所测的各种蛋白质加合物与剂量的关系,可以初步看出用血红蛋白中半胱氨酸与 SO 形成的加合物 2-PE 与剂量有较好的相关性,因此试验用 2-PE 作为人接触苯乙烯的分子标志物有可行性。

(3) 首次报道在低浓度接触苯乙烯(小于 100mg/m³) 现场人群的静脉血中测的血红蛋白-SO 加合物与接触的苯乙烯剂量有好的相关性,这一结果为研究用 Hb-SO 加合物作为人接触低浓度苯乙烯的分子标志物提供可靠的实验数据。

(4) 在本研究所选的 2 个现场人群中测的蛋白质-SO 加合物的量,加合物与剂量的关系等有一定的差别,因为受选择的现场数少,每个现场所选择的人群较少,每个样品的取样次数和分析次数等限制,所以所测



mouse following exposure to ethane oxide. Chem. Biol. Interact, 1983, 45: 139~151.

- Liu Y Y, Yao M, Fang J L et al. Monitoring human risk and exposure to trinitrotoluene using hemoglobin adducts as a biomarker. Toxicology letters, 1995, 77: 281~287.
- Ponomarev V, Cabral J R P, Wahrendorf J et al. A carcinogenicity study of styrene 7, 8 oxide in rats. Cancer Lett., 1984, 24: 95~101.
- Nordqvist B M, Lof A, Osterman-Golkar S et al. Covalent binding of styrene and styrene 7, 8-oxide to plasma proteins, hemoglobin and DNA in the mouse. Chem. Biol. Interact, 1985, 55: 63~73.
- Christakopoulos A, Bergmark E, Zorcec V et al. Monitoring occupational exposure to styrene from hemoglobin adducts and metabolites in blood. Scand. J Work Environ. & Health, 1993, 255~263.
- Yool C K, Jin Z L, Rappaport M S. Determination of Albumin and hemoglobin Adducts in Workers Exposed to Styrene and Styrene Oxide. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, 1996, 5: 205~215.
- Rappaport S M, Ting D, Jin Z L et al. Application of Ramey nickel to measure adducts of styrene oxide with hemoglobin and albumin. Chem. Res. Toxicol., 1993, 6: 238~244.
- Rappaport S M, Ting D, Jin Z L et al. Application of ramey nickel to measure adducts of styrene oxide with hemoglobin and albumin. Chem. Res. Toxicol., 1990, 6: 238~224.