



一种新型羟基自由基产生分子机理的研究

朱本占

中国科学院生态环境研究中心, 环境化学与生态毒理学国家重点实验室, 北京 100085

E-mail: bzhu@rcees.ac.cn

2009-01-20 收稿, 2009-02-24 接受

国家重点基础研究发展计划(编号: 2008CB418106)、国家自然科学基金(批准号: 20777080, 20877081, 20747001, 20890112, 20621703)和中国科学院“百人计划”资助项目

摘要 羟基自由基($\cdot\text{OH}$)被公认是生物系统中最具活性的活性氧物种, 能导致生物体内DNA, 蛋白质和脂质氧化损伤. 目前, 关于 $\cdot\text{OH}$ 的产生机理, 最被广泛接受的是过渡金属离子催化的Fenton反应. 五氯酚(PCP)是一种重要的工农业生物杀灭剂, 主要用作木材保护. 采用水杨酸羟基化法和电子自旋共振自旋捕获等作为分析手段, 发现 H_2O_2 和五氯酚的代谢产物之一四氯-1,4-苯醌(TCBQ)能通过不依赖于金属离子的途径产生 $\cdot\text{OH}$; 进一步的研究发现, TCBQ而非其相应的半醌自由基对 $\cdot\text{OH}$ 的产生极其重要. TCBQ和 H_2O_2 反应的主要产物被鉴定为三氯羟基-1,4-苯醌(TrCBQ-OH), 其中的氧原子被证明来源于 H_2O_2 . 基于这些数据和分析, 提出以下假设: TCBQ和 H_2O_2 反应产生 $\cdot\text{OH}$ 不是通过依赖于半醌自由基的有机Fenton反应进行, 而是 H_2O_2 对TCBQ进行亲核攻击, 形成不稳定的三氯氢过氧基-1,4-苯醌(TrCBQ-OOH)中间产物, 其可均裂产生 $\cdot\text{OH}$ 和三氯羟基-1,4-苯醌自由基($\text{TrCBQ-O}\cdot$). 上述反应途径展示了一类新型的 $\cdot\text{OH}$ 产生机理, 即 $\cdot\text{OH}$ 的形成不需要具有氧化还原活性的过渡金属离子参与. 该机理可部分解释五氯酚等其他多卤芳香类杀虫剂的致癌性.

关键词

羟基自由基

五氯酚

电子自旋共振自旋捕获

四氯苯醌

过氧化氢

1 五氯酚及其主要致癌代谢物

五氯酚(PCP)是一种重要的工农业生物杀灭剂, 主要用作木材保护. 在中国和其他发展中国家, PCP还被用于杀灭钉螺以预防血吸虫病. PCP在世界范围内的广泛使用及其相当的稳定性使其成为无处不在的环境污染物. 事实上, PCP已在体液如血清、尿液、乳汁中检测到, 在那些非职业性暴露者的组织中也能检测到^[1~3]. 人类对于PCP的暴露主要源自PCP处理的木材制品, 亦可源自六氯苯^[1~3].

PCP是一种高致癌物质. 研究发现, 长期暴露于PCP的小鼠有肝脏肿瘤、血管内皮瘤和嗜铬细胞瘤^[4], 在大鼠中出现了恶性间皮瘤和鼻咽癌^[5]. 在人体, 发现恶性淋巴瘤和白血病的发生与长期暴露于PCP相

关^[1~3]. 因此, PCP已被美国环保署列为优先控制污染物, 被国际癌症研究联盟(IARC)列为2B组环境致癌物^[1]. 虽然PCP产生毒性的机理还不是很清楚, 但是已经发现其醌类和半醌类代谢物在其中起了重要的作用(图1).

在大鼠和人体细胞以及啮齿类动物的活体实验均发现PCP可被肝脏微酶体的细胞色素P450氧化脱氯形成四氯氢醌(tetrachlorohydroquinone, TCHQ)^[3,6]. TCHQ可经由四氯半醌自由基(tetrachlorosemiquinone radical, TCSQ $\cdot$)被进一步氧化成四氯-1,4-苯醌(tetrachloro-1,4-benzoquinone, TCBQ).

含醌类结构的化合物发生氧化还原反应是一个很普遍的现象, 该过程可产生大量的活性氧, 进而导致氧化应激反应. 在各种活性氧物质中, 普遍认为超

引用格式: 朱本占. 0B 一种新型羟基自由基产生分子机理的研究. 科学通报, 2009, 54: 1673~1680

Zhu B Z. A novel mechanism for metal-independent production of hydroxyl radicals (in Chinese). Chinese Sci Bull (Chinese Ver), 2009, 54: 1673–1680, doi: 10.1360/972009-142

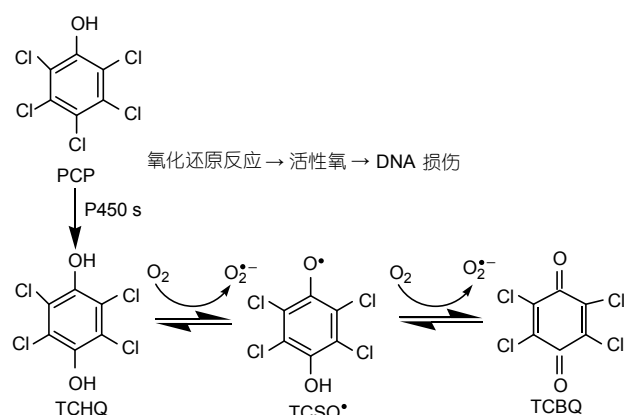
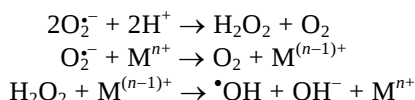


图1 五氯酚及其醌类和半醌类代谢产物

氧根阴离子 O_2^- 本身不能直接攻击DNA,而是当其变成 H_2O_2 ,并和过渡金属离子反应产生活性很强的羟基自由基($\cdot OH$)之后才会对DNA造成损伤.该系列反应被称为Haber-Weiss反应,或 O_2^- 推动的Fenton反应(其中M代表过渡金属离子,通常为铜离子和铁离子)^[7]:



虽然PCP本身对DNA不显示任何反应活性,但其主要代谢物TCHQ在离体DNA、多种细胞系以及小鼠的肝脏中均可造成DNA链的断裂^[8~12].TCHQ还可在V79细胞的HPRT中心造成微核形成及变异^[13],在V79细胞和小鼠中能导致8-羟基-2-脱氧鸟苷(8-OH-dG)的形成^[11,14].最近发现在肿瘤细胞中TCHQ可诱导形成加合物和缺嘌呤/缺嘧啶位点(AP位点)^[15].

氧化性DNA损伤与直接的DNA加合物均可参与PCP所致小鼠肝癌的形成^[9,11,15].最常用的DNA氧化损伤的生物标记物8-OH-dG可在施用了急性和亚急性剂量PCP和TCHQ的B6C3F₁小鼠肝脏中检测到,且其浓度水平相对于对照组明显增加^[11].最近对PCP作用27周的老鼠研究亦显示8-OH-dG相对于对照组显著增高^[16].目前认为,PCP醌类代谢物的氧化还原过程所产生的活性氧在PCP基因毒性中扮演重要角色,然而其确切分子机制尚不明.在活性氧中, $\cdot OH$ 被认为是在生物系统中反应活性最强的. $\cdot OH$ 所致DNA损伤包括碱基氧化、脱氧核糖破坏、双螺旋断裂和AP位点形成^[7]. $\cdot OH$ 可通过直接抽取DNA含糖部分的氢而产生AP位点^[17~19].AP位点形成的另一个途径是醌-DNA加合物的脱嘌呤/脱嘧啶反应.TCBQ和

TCSQ $\cdot$ 具有较强的亲电性,因而可导致DNA烷基化和DNA加合物的形成^[16,20,21].

生物体系的氧化与抗氧化能力通常处于一种平衡状态.正常细胞中,主要由小分子抗氧化剂谷胱甘肽(GSH)和抗坏血酸来抵抗氧化损伤,它们以毫摩尔浓度级存在.但是,这种防御机制可被过量产生的活性氧破坏,从而导致生物大分子如DNA的损伤.必须指出,在正常生理条件下,细胞中活性氧(包括 H_2O_2)的浓度很低,而在氧化应激的条件下,如暴露于PCP代谢物,活性氧浓度可显著增加^[22].对鼠肝组织进行TCHQ处理可因为GSH配体的形成而导致60%的GSH损耗^[12].有报告认为,PCP代谢物所致GSH以及其他抗氧化剂的损耗可以消除细胞对于活性氧的防御性,从而导致DNA损伤^[12].由此可以推测,若通过补充食源抗氧化剂如硫辛酸、抗坏血酸、类黄酮等来提高细胞内抗氧化剂的含量,有可能增强对PCP代谢物所致DNA损伤的防御.最近有研究表明^[23],在PCP作用3 h前给雄鼠B6C3F₁口服维生素E和烯丙基硫醚可明显抑制肝脏8-OH-dG的升高.

2 PCP代谢物所致基因毒性的可能化学机制

2.1 去铁胺保护TCHQ所致DNA损伤的分子作用机制

如前所述,TCHQ已被确定为PCP的一个主要有毒代谢物.TCHQ可导致DNA单链断裂,并参与PCP相关基因毒性.TCHQ导致DNA损伤的能力曾被归因于其通过金属依赖型Fenton反应形成 $\cdot OH$ 的能力.这种观点主要基于以下事实:TCHQ所致DNA损伤可完全被铁螯合剂去铁胺抑制.去铁胺(去铁敏)(desferrioxamine或deferoxamine或Desferal,DFO)是一种异羟肟酸类络合剂,它主要与游离或蛋白结合的三价铁离子结合形成无毒、稳定的络合物(图2),但对二价离子如亚铁离子、铜离子、锌离子、钙离子等亲和力较低.去铁胺不能与转铁蛋白、血红蛋白或其他含氯高铁血红素中的铁离子结合,因此不会产生缺铁性贫血.去铁胺在临床上主要用于治疗急性铁中毒和地中海性贫血等症.去铁胺与三价铁离子结合形成的铁胺络合物具有很高的络合稳定常数,一旦形成,被认为是一个氧化还原惰性的络合物.因此,在自由基研究领域,去铁胺被广泛用作铁离子是否参与Fenton反应的探针.我们发现^[24],去铁胺和苯基异羟肟酸(BHA)可保护TCHQ导致的纯化

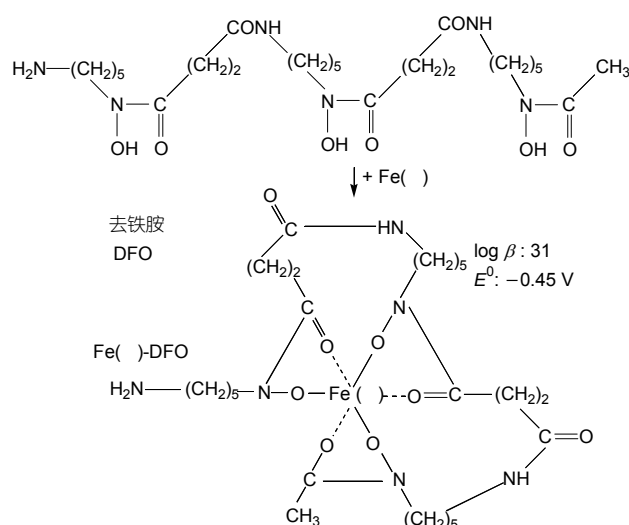


图2 去铁胺及其铁络合物的化学结构

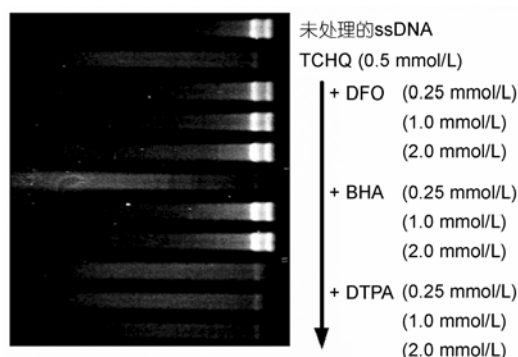


图3 DFO 而非 DTPA, 可保护 TCHQ 诱导产生的 DNA 单链断裂

根据文献[24]修改

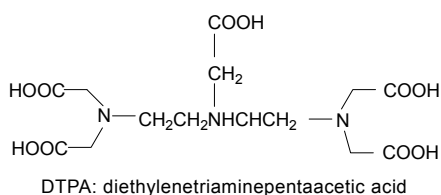
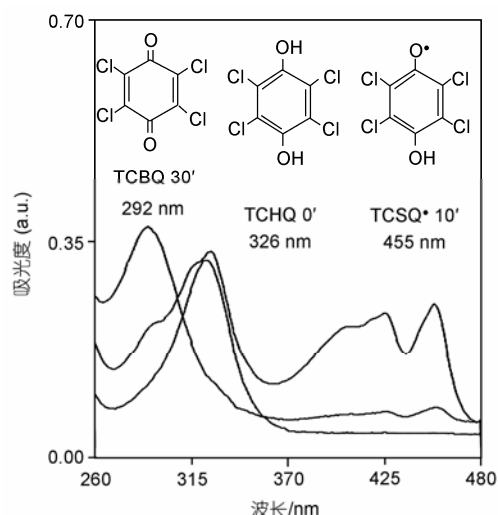
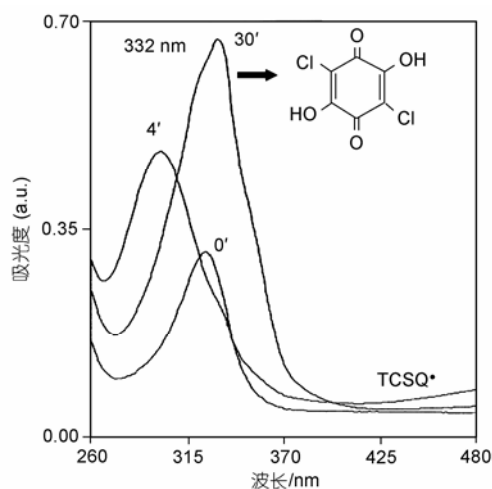


图4 DTPA 的化学结构

DNA 单链断裂(图 3), 而其他非异羟肟酸铁螯合剂如 DTPA (图 4)则无保护作用。

根据 ESR 和紫外-可见光谱分析, DFO 可通过形成 DFO-氮氧自由基(DFO[•])导致 TCSQ[•]浓度和半衰期的显著降低(图 5~8)。这些结果表明, DFO 对 TCHQ 所致 DNA 损伤的抑制并非由于络合铁, 而是由于清除化学活性较强的 TCSQ[•]。

图5 TCHQ 自氧化的紫外-可见光谱变化
根据文献[24]修改图6 DFO 存在时, TCHQ 自氧化的紫外-可见光谱变化
根据文献[24]修改

然后我们将研究从纯化DNA扩展至人纤维母细胞, 从DFO扩展至其他异羟肟酸. 应用MTT和彗星分析法分别测定PCP代谢物的细胞和基因毒性效应. 我们发现^[25], 同时培养DFO可显著抑制TCHQ所致细胞毒性和基因毒性(图 9 和 10). 同样的保护也在另外 3 种异羟肟酸中可见. 这些证据表明, DFO和其他异羟肟酸(图 11)可通过清除活性TCSQ[•]对TCHQ所致细胞和基因毒性提供保护。

2.2 PCP 代谢物所致基因毒性分子作用机制

为进一步了解 TCHQ 导致基因毒性的分子作用机制, 我们采用水杨酸羟基化法研究了 TCHQ/H₂O₂

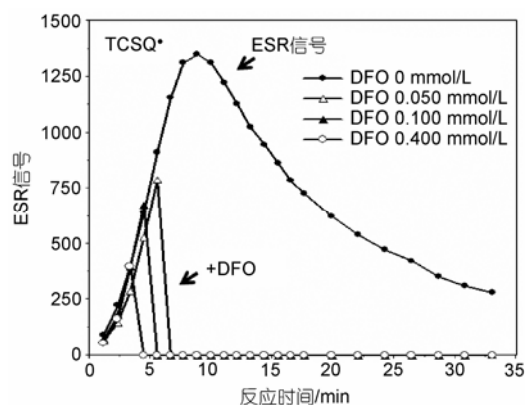


图7 DFO 可有效抑制 TCSQ* 的形成

根据文献[24]修改

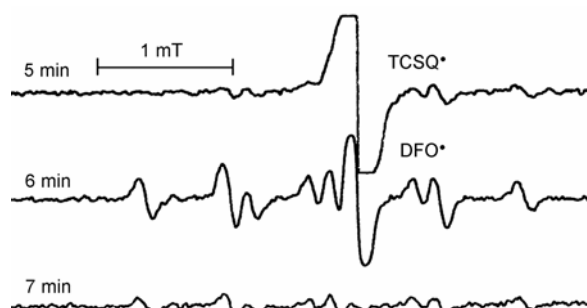


图8 TCSQ* 的衰减同时伴随 DFO* 的形成

根据文献[24]修改

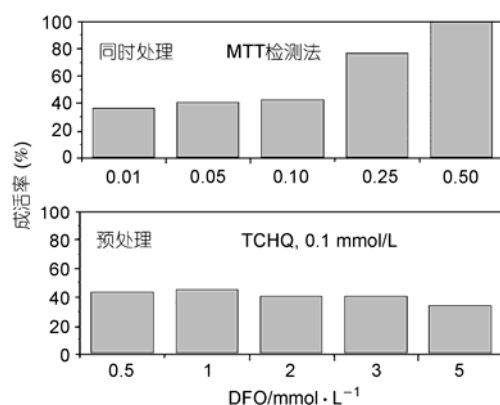


图9 DFO 可保护 TCHQ 诱导产生的细胞毒性 (人纤维母细胞)

根据文献[25]修改

体系产生 $\cdot\text{OH}$ 的情况^[26], HPLC-EC被用来检测 2,3-和 2,5-二羟基苯甲酸的含量水平. 研究发现, 2,3-和 2,5-二羟基苯甲酸的生成可被 $\cdot\text{OH}$ 清除剂如二甲基亚砜 (DMSO) 和乙醇显著抑制, 与之相比, 这些产物

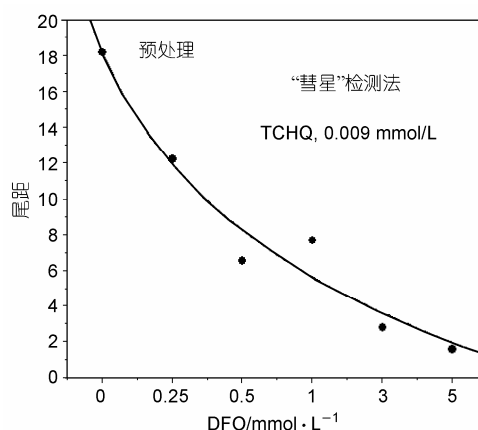


图10 DFO 可保护 TCHQ 诱导产生的基因毒性 (人纤维母细胞)

根据文献[25]修改

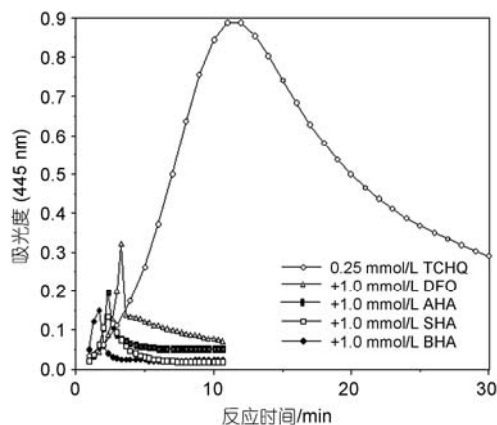
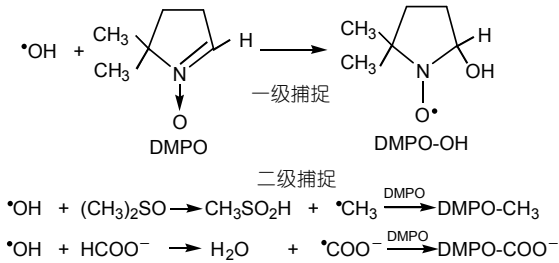
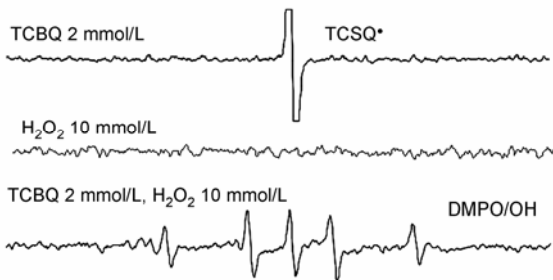


图11 其他异羟肟酸亦可有效抑制 TCSQ* 的形成

根据文献[25]修改

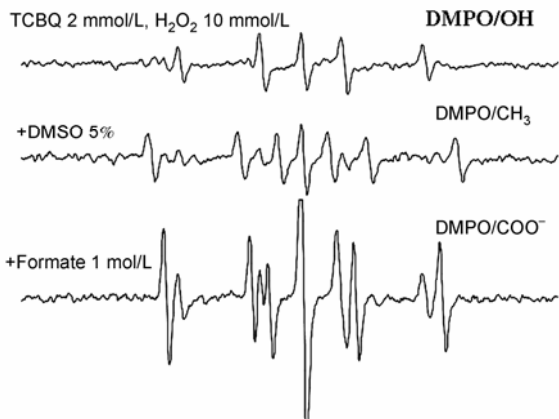
不受非异羟肟酸类螯合剂影响. 同样的效应也存在于 TCBQ/ H_2O_2 系统. 基于上述结果, 我们认为, TCHQ/ H_2O_2 生成 $\cdot\text{OH}$ 可能是通过一种金属非依赖型的类 Fenton 反应.

由于水杨酸羟基化法不能提供 $\cdot\text{OH}$ 形成的直接证据, 一种更为独特的方法, 如应用DMPO(5,5-二甲基-1-吡咯啉-N-氧化物)作电子自旋共振(ESR)捕捉剂, 被用来进一步证实和拓展先前的结果. 由 $\cdot\text{OH}$ 攻击 DMSO产生的特征性的DMPO加合物: DMPO/ $\cdot\text{OH}$ 和 DMPO/ $\cdot\text{CH}_3$, 可成为 H_2O_2 与TCHQ或TCBQ形成 $\cdot\text{OH}$ 的最有力的直接证据(图 12). 我们发现^[27], 在 DMPO存在时, TCBQ和 H_2O_2 反应可形成DMPO/ $\cdot\text{OH}$ 加合物(图 13). $\cdot\text{OH}$ 清除剂 DMSO 和甲

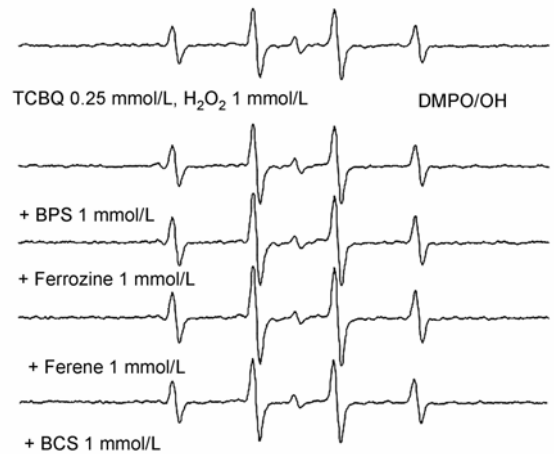
图 12 ESR 自旋捕捉法检测 $\cdot\text{OH}$ 的原理图 13 TCBQ 和 H_2O_2 反应可产生 $\cdot\text{OH}$

根据文献[27]修改

酸盐(formate)可显著抑制 $\text{DMPO}/\cdot\text{OH}$ 的形成,同时生成特征性的 $\text{DMPO}/\cdot\text{CH}_3$ 和 $\text{DMPO}/\cdot\text{COO}^-$ 加合物(图 14). $\text{TCBQ}/\text{H}_2\text{O}_2$ 反应形成的 $\text{DMPO}/\cdot\text{OH}$ 和 $\text{DMPO}/\cdot\text{CH}_3$ 不受非异羟肟酸螯合剂影响(BPS, Ferrozine 和 Ferene 为特异性二价铁螯合剂,BCS 为特异性一价铜螯合剂)(图 15). 上述实验结果表明,PCP 代谢物 TCBQ 和 H_2O_2 反应确实可生成 $\cdot\text{OH}$,但此过程不依赖于过渡金属离子的存在.

图 14 TCBQ 和 H_2O_2 反应产生 $\cdot\text{OH}$ 的更确切的 ESR 证据

根据文献[27]修改

图 15 TCBQ 和 H_2O_2 反应产生的 $\cdot\text{OH}$ 不受铁和铜螯合剂影响

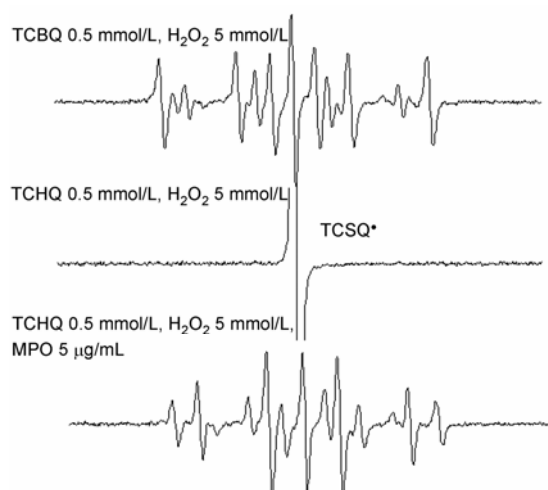
根据文献[27]修改

3 PCP 代谢物和 H_2O_2 所致金属非依赖型 $\cdot\text{OH}$ 形成的分子作用机制

基于上述实验结果,我们起初认为,TCBQ 和 H_2O_2 生成 $\cdot\text{OH}$ 可能是通过一个金属非依赖型的有机 Fenton 反应: $\text{TCSQ}\cdot + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \cdot\text{OH} + \text{OH}^- + \text{TCBQ}$, $\text{TCSQ}\cdot$ 在此反应中替代了经典 Fenton 反应中的亚铁.这类半醌自由基和 H_2O_2 之间的反应曾由 Koppenol 和 Butler 提出[28],他们认为,如果一个醌/半醌的还原电位在 -330 mV 和 460 mV 之间,理论上便会导致非金属依赖型的有机 Fenton 反应发生.

如果上述机制正确,那么 $\text{TCBQ}/\text{H}_2\text{O}_2$ 生成 $\cdot\text{OH}$ 应当依赖于 $\text{TCSQ}\cdot$ 的浓度,即 $\text{TCSQ}\cdot$ 浓度越高, $\cdot\text{OH}$ 生成越多,反应的主要产物应为 TCBQ. 然而,我们发现,在 TCHQ(TCBQ 的还原型)和 H_2O_2 体系中,尽管在 TCHQ 自氧化过程中可产生高浓度的 $\text{TCSQ}\cdot$,却无 $\text{DMPO}/\cdot\text{OH}$ 和 $\text{DMPO}/\cdot\text{CH}_3$ 形成. 有趣的是,如果 TCHQ 在髓过氧化物酶(MPO)作用下被迅速氧化为 TCBQ, $\text{DMPO}/\cdot\text{OH}$ 和 $\text{DMPO}/\cdot\text{CH}_3$ 又会重新大量出现(图 16). 此外,我们还发现 $\text{DMPO}/\cdot\text{OH}$ 和 $\text{DMPO}/\cdot\text{CH}_3$ 的形成直接依赖于 TCBQ 浓度. 上述结果表明, $\cdot\text{OH}$ 形成的关键因素是 TCBQ,而非其相应的半醌自由基 $\text{TCSQ}\cdot$.

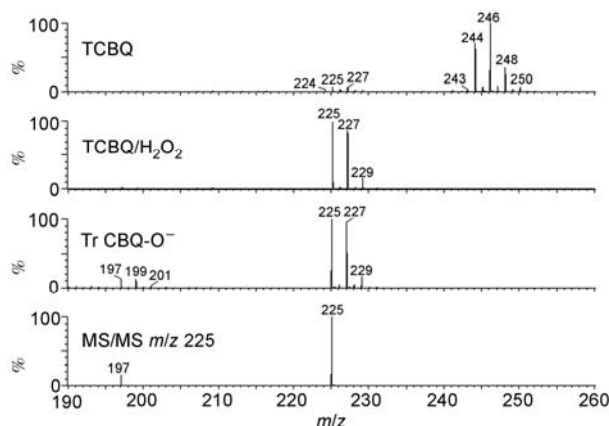
为得到更多 $\text{TCBQ}/\text{H}_2\text{O}_2$ 生成 $\cdot\text{OH}$ 机制的信息,我们研究了 $\text{TCBQ}/\text{H}_2\text{O}_2$ 生成 $\text{DMPO}/\cdot\text{OH}$ 反应的时间和浓度的依赖关系,观察到有快相(约 30 s)和慢相两个反应相存在. 这提示 $\cdot\text{OH}$ 的生成可能来自 TCBQ

图 16 $\cdot\text{OH}$ 形成的关键因素是 TCBQ 而非 TCSQ $\cdot$

根据文献[29]修改

和 H_2O_2 间的两步反应. 当固定 TCBQ 的浓度为 0.1 mmol/L 时, DMPO/ $\cdot\text{OH}$ 生成速率取决于 H_2O_2 的浓度. 即使 H_2O_2 的浓度低至 20 $\mu\text{mol/L}$, DMPO/ $\cdot\text{OH}$ 仍可生成. 另外, 紫外-可见光谱分析表明, 在中性 pH 条件下, TCBQ 和 H_2O_2 之间存在直接的相互作用, 反应混合物从最初的黄色迅速转变为特征性的紫色(可见光 $\lambda_{\text{max}} = 535 \text{ nm}$; 紫外 $\lambda_{\text{max}} = 295 \text{ nm}$).

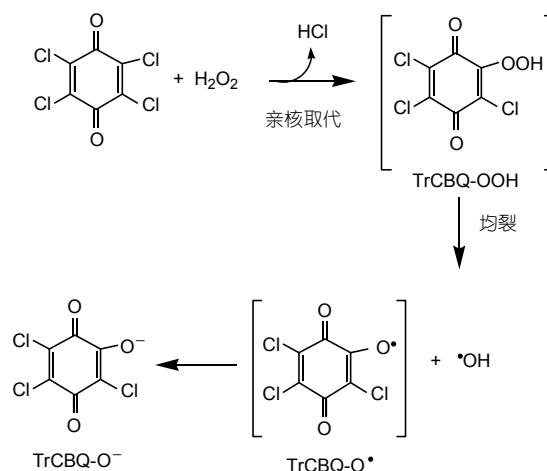
TCBQ 和 H_2O_2 反应的主要产物采用电喷雾-四极杆飞行时间质谱仪等分析手段鉴定为三氯羟基-1,4-苯醌(TrCBQ-OH)的离子形式(图 17). 利用氧同位素标记 H_2O_2 的研究表明, 反应产物 TrCBQ-OH 中的氧原子源于 H_2O_2 . 基于这些数据和分析, 我们提出以下假设[29]: TCBQ 和 H_2O_2 反应产生 $\cdot\text{OH}$ 不是通过依赖于半醌自由基的有机 Fenton 反应进行, 而是 H_2O_2 对

图 17 TCBQ 和 H_2O_2 反应生成 TrCBQ-O^-

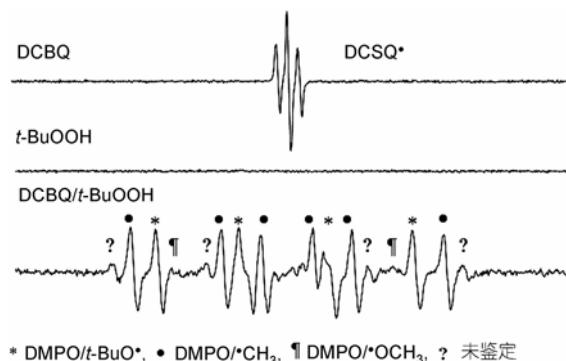
根据文献[29]修改

TCBQ 进行亲核攻击, 形成不稳定的三氯氢过氧基-1,4-苯醌(TrCBQ-OOH)中间产物, 该种中间产物能均裂产生 $\cdot\text{OH}$ 和三氯羟基-1,4-苯醌自由基($\text{TrCBQ-O}^\cdot$). $\text{TrCBQ-O}^\cdot$ 随后能歧化形成三氯羟基-1,4-苯醌的离子形式(TrCBQ-O^-)(图 18).

上述反应途径展示了一种新型的 $\cdot\text{OH}$ 产生分子机理: $\cdot\text{OH}$ 的形成不需要具有氧化还原活性的过渡金属离子参与, 也不需要光照、辐射和高温加热. 我们还发现 TCBQ 和 2, 5-二氯-1, 4-苯醌(DCBQ)等卤代醌可通过类似的反应机制显著促进有机氢过氧化物如叔丁基过氧化氢($t\text{-BuOOH}$)的分解和烷氧自由基($t\text{-BuO}^\cdot$)的形成(图 19 和 20)[30]. 上述机理能部分解释许多芳香性有机卤化物(如多氯代酚、多溴联苯、六氯苯和橙色剂等)的致癌机制, 因为这些物质能在体内代谢成四氯、三氯、二氯和一氯苯醌. 值得注意

图 18 TCBQ 和 H_2O_2 反应产生 $\cdot\text{OH}$ 可能的作用机制

根据文献[29]修改

图 19 2, 5-二氯-1, 4-苯醌(DCBQ)和叔丁基过氧化氢($t\text{-BuOOH}$)反应产生 $t\text{-BuO}^\cdot$

根据文献[30]修改

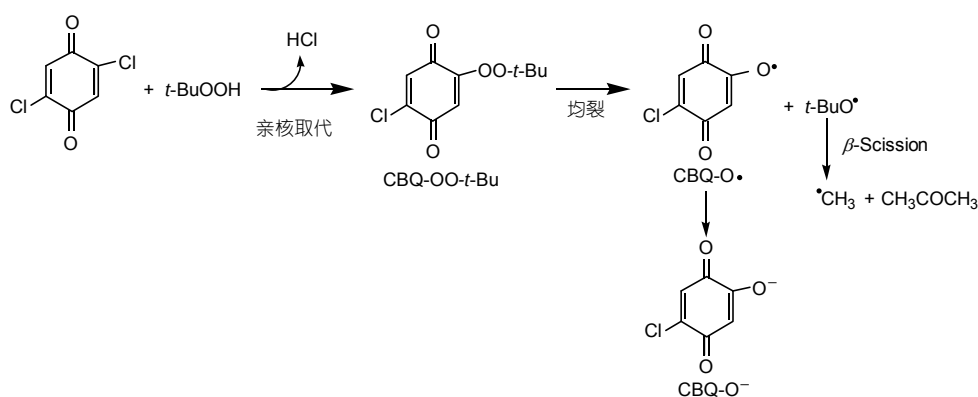


图 20 DCBQ 和 $t\text{-BuOOH}$ 反应产生 $t\text{-BuO}^\bullet$ 可能的作用机制

根据文献[30]修改

的是, 采用目前的实验手段还不能检测到 TrCBQ-OOH 和 $\text{TrCBQ-O}^\bullet$ 中间产物的存在。这可能是因为二者的半衰期太短或者是稳定态浓度太低。故需要进行进一步的研究以鉴定这些反应的中间产物。

参考文献

- 1 IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Occupational Exposures in Insecticide Application, and Some Pesticides. Pentachlorophenol, Vol 53, 1991. 371—402
- 2 Seiler J P. Pentachlorophenol. *Mutat Res*, 1991, 257: 27—47
- 3 Rao K R. Pentachlorophenol: Chemistry, Pharmacology, and Environmental Toxicology. New York: Plenum, 1987
- 4 McConnell E E, Huff J E, Hejtmancik M, et al. Toxicology and carcinogenesis studies of two grades of pentachlorophenol in B6C3F1 mice. *Fundam Appl Toxicol*, 1991, 17: 519—532 [doi]
- 5 Chhabra R S, Maronpot R M, Bucher J R, et al. Toxicology and carcinogenesis studies of pentachlorophenol in rats. *Toxicol Sci*, 1999, 48: 14—20 [doi]
- 6 Renner G, Mucke W. Transformations of pentachlorophenol. Part I: Metabolism in animals and man. *Toxicol Environ Chem*, 1986, 11: 9—29 [doi]
- 7 Halliwell B, Gutteridge J M C. Free Radicals in Biology and Medicine. 4th ed. Oxford: Oxford University Press, 2007
- 8 Witte I, Juhl U, Butte W. DNA-damaging properties and cytotoxicity in human fibroblasts of tetrachlorohydroquinone, a pentachlorophenol metabolite. *Mutat Res*, 1985, 145: 71—75
- 9 Dahlhaus M, Almstadt E, Henachke P, et al. Oxidative DNA lesions in V79 cells mediated by pentachlorophenol metabolites. *Arch Toxicol*, 1996, 70: 457—460 [doi]
- 10 Ehrlich W. The effect of pentachlorophenol and its metabolite tetrachlorohydroquinone on cell growth and the induction of DNA damage in Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res*, 1990, 244: 299—302 [doi]
- 11 Dahlhaus M, Almstadt E, Appel K E. The pentachlorophenol metabolite tetrachloro-p-hydroquinone induces the formation of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine in liver DNA of male B6C3F1 mice. *Toxicol Lett*, 1994, 74: 265—274 [doi]
- 12 Wang Y J, Ho Y S, Chu S W, et al. Induction of glutathione depletion, p53 protein accumulation and cellular transformation by tetrachlorohydroquinone, a toxic metabolite of pentachlorophenol. *Chem Biol Interact*, 1997, 105: 1—16 [doi]
- 13 Jansson K, Jansson V. Induction of micronuclei in V79 Chinese hamster cells by tetrachlorohydroquinone, a metabolite of pentachlorophenol. *Mutat Res*, 1992, 279: 205—208 [doi]
- 14 Dahlhaus M, Almstadt E, Henschke P, et al. Induction of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine and single strand breaks in DNA of V79 cells by tetrachloro-p-hydroquinone. *Mutat Res*, 1995, 329: 29—36
- 15 Lin P H, Nakamura J, Yamaguchi S, et al. Induction of direct adducts, apurinic/apyrimidinic sites and oxidized bases in nuclear DNA of human HeLa S3 tumor cells by tetrachlorohydroquinone. *Carcinogenesis*, 2001, 22: 635—639 [doi]
- 16 La D K, Lin P H, Swenberg J A. Analysis of DNA adducts in rats chronically exposed to pentachlorophenol. *Carcinogenesis*, 2002, 23: 365—369 [doi]
- 17 Breen A P, Murphy J A. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol Med*, 1995, 18: 1033—1077 [doi]
- 18 Balasubramanian B, Pogozelski W K, Tullius T D. DNA strand breaking by the hydroxyl radical is governed by the accessible surface areas of the hydrogen atoms of the DNA backbone. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 9738—9743 [doi]
- 19 Nakamura J, La D K, Swenberg J A. 5'-Nicked apurinic/apyrimidinic sites are resistant to β -elimination by β -polymerase and are persistent in human cultured cells after oxidative stress. *J Biol Chem*, 2000, 275: 5323—5328 [doi]

- 20 Lin P H, Nakamura J, Yamaguchi S, et al. Oxidative damage and direct adducts in calf thymus DNA induced by tetrachlorohydroquinone and tetrachloro-1, 4-benzoquinone. *Carcinogenesis*, 2001, 22: 627—634 [\[doi\]](#)
- 21 Bodell W J, Ye Q, Pathak D N, et al. Oxidation of eugenol to form DNA adducts and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: Role of quinone methide derivative in DNA adduct formation. *Carcinogenesis*, 1998, 19: 437—443 [\[doi\]](#)
- 22 Lin Y P, Zhu B Z, Yang M C, et al. Bcl-2 over-expression inhibits pentachlorophenol metabolite-induced apoptosis in NIH3T3 cells: A possible mechanism for tumor promotion. *Mol Carcinog*, 2004, 40: 24—33 [\[doi\]](#)
- 23 Sai-Kato K, Umemura T, Takagi A, et al. Pentachlorophenol-induced oxidative DNA damage in mouse liver and protective effect of antioxidants. *Food Chem Toxicol*, 1995, 33: 877—882 [\[doi\]](#)
- 24 Zhu B Z, Har-El R, Kitrossky N, et al. New modes of action of desferrioxamine: scavenging of semiquinone radical and stimulation of hydrolysis of tetrachlorohydroquinone. *Free Radic Biol Med*, 1998, 24: 360—369 [\[doi\]](#)
- 25 Witte I, Zhu B Z, Lucken A, et al. Protection by desferrioxamine and other hydroxamic acids against tetrachlorohydroquinone-induced cyto- and genotoxicity in human fibroblasts. *Free Radic Biol Med*, 2000, 28: 693—700 [\[doi\]](#)
- 26 Zhu B Z, Kitrossky N, Chevion M. Evidence for production of hydroxyl radicals by pentachlorophenol metabolites and hydrogen peroxide: A metal-independent organic Fenton reaction. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 270: 942—946 [\[doi\]](#)
- 27 Zhu B Z, Zhao H T, Kalyanaraman B, et al. Metal-independent production of hydroxyl radicals by chlorinated quinones and hydrogen peroxide: an ESR spin-trapping study. *Free Radic Biol Med*, 2002, 32: 465—473 [\[doi\]](#)
- 28 Koppenol W H, Butler J. Energetics in interconversion reactions of oxyradicals. *Adv Free Radic Biol Med*, 1985, 1: 91—131 [\[doi\]](#)
- 29 Zhu B Z, Kalyanaraman B, Jiang G. Molecular mechanism for metal-independent production of hydroxyl radicals by hydrogen peroxide and halogenated quinones. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 17575—17578 [\[doi\]](#)
- 30 Zhu B Z, Zhao H T, Kalyanaraman B, et al. Mechanism of metal-independent decomposition of organic hydroperoxides and formation of alkoxyl radicals by halogenated quinones. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 3698—3702 [\[doi\]](#)

A novel mechanism for metal-independent production of hydroxyl radicals

ZHU Ben-Zhan

State Key Laboratory of Environmental Chemistry and Eco-toxicology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

The hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) has been considered to be one of the most reactive oxygen species produced in biological systems. It has been shown that $\cdot\text{OH}$ can cause DNA, protein, and lipid oxidation. One of the most widely accepted mechanisms for $\cdot\text{OH}$ production is the transition metal-catalyzed Fenton reaction. Pentachlorophenol (PCP) has been widely used as a wood preservative. Using the salicylate hydroxylation assay and electron spin resonance (ESR) spin-trapping methods, we found that $\cdot\text{OH}$ can be produced by H_2O_2 and tetrachloro-1, 4-benzoquinone (TCBQ) (one of the major carcinogenic metabolites of PCP) independent of transition metal ions. Further studies showed that TCBQ, but not its corresponding semiquinone radical, the tetrachlorosemiquinone radical ($\text{TCSQ}^\cdot$), is essential for $\cdot\text{OH}$ production. The major reaction product between TCBQ and H_2O_2 was identified to be the ionic form of trichloro-hydroxy-1, 4-benzoquinone (TrCBQ-OH), and H_2O_2 was found to be the source and origin of the oxygen atom inserted into the reaction product TrCBQ-OH . Based on these data, we propose that $\cdot\text{OH}$ production by H_2O_2 and TCBQ is not through a semiquinone-dependent organic Fenton reaction, but rather through the following novel mechanism: a nucleophilic attack of H_2O_2 on TCBQ, forming a trichloro- hydroperoxyl-1, 4-benzoquinone (TrCBQ-OOH) intermediate, which decomposes homolytically to produce $\cdot\text{OH}$. These findings represent a novel mechanism of $\cdot\text{OH}$ formation not requiring the involvement of redox-active transition metal ions, and may partly explain the potential carcinogenicity of widely used biocides such as PCP and other polyhalogenated aromatic environmental pollutants.

hydroxyl radical, pentachlorophenol, electron spin resonance (ESR) spin-trapping method, tetrachloro-1, 4-benzoquinone, hydrogen peroxide

doi: 10.1360/972009-142