

4-鄰位醌類衍生物誘發小牛胸腺 DNA 去鹼基核酸及單鏈斷裂生成之研究

林伯雄¹ 廖宏慈² 侯國隆²

關鍵詞：去鹼基核酸、DNA 單股斷鏈、氧化 DNA 損害。

摘 要

本研究之主旨即在於應用生物性指標(biomarker)探討醌類之鄰位醌類化合物，4-單氯醌(4-chlorocatechol, 4-CICAT)能否經由不斷氧化還原循環(redox cycle)進而生成活潑性氧(reactive oxygen species, ROS)，對 DNA 造成破壞作用，包括去鹼基核酸(apurinic/aprimidinic, AP sites)及 DNA 單鏈斷裂(single strand break, SSB)進行測試。研究結果顯示，4-CICAT 於過渡性金屬銅 Cu(II)存在之環境下能對小牛胸腺 DNA 同時誘發 DNA SSB 及 AP sites 之核酸損害作用。ROS 移除劑，例如氫氧自由基移除劑 DMSO(6%)、甲醇(6%)，超氧自由基移除劑 superoxide dismutase (SOD) 對 DNA SSB 及 AP sites，均無抑制作用，但過氧化氫酶(catalase)卻具有抑制效應，顯示其中實際參與核酸損害作用之 ROS 分子為 H₂O₂。同時，Cu(I)螯合劑，bathocuproine 共同反應情形下，能抑制 Cu(II)與 4-CICAT 誘發的核酸損害作用，此一結果顯示，Cu(I)與活潑性氧分子中之 H₂O₂ 可能為實際參與核酸損害作用之物種。此外，glutathione (GSH)亦可抑制 Cu(II)與 4-CICAT 所誘發的 DNA SSB 及 AP sites 之生成，此一研究證據顯示，GSH 可能是與 4-CICAT 結合後中斷其氧化還原之循環，終止 ROS 生成，進而抑制核酸損害作用，同時 GSH 亦有可能是直接與 ROS 反應，直接移除 ROS，達到保護 DNA 之作用。總結上述之實驗證據，如同對位醌類化合物，醌類之鄰位醌類化合物亦可經由不斷之氧化還原循環(redox cycle)生成 H₂O₂，並對 DNA 造成氧化損害作用。

PARALLEL INDUCTION OF APURINIC/APYRIMIDINIC SITES AND DNA STRAND BREAKS IN CALF THYMUS DNA BY 4-CHLOROCATECHOL

Po-Hsiung Lin Hong-Tsee Leow Kuo-Lung Hou

Department of Environmental Engineering,
National Chung-Hsing University,
Taichung 402, Taiwan, R.O.C.

Key Words: AP site, DNA SSB, Oxidative DNA damage.

¹ 國立中興大學環境工程學系助理教授

² 國立中興大學環境工程學系碩士班研究生

ABSTRACT

DNA damage induced by 4-chlorocatechol (4-CICAT) was investigated using calf thymus DNA (ct-DNA) under physiological conditions. Results indicated that with the addition of transition metal copper (II) (20 - 100 μM), parallel increases in DNA strand breaks and abasic (AP) sites were detected in ct-DNA exposed to 4-CICAT (0.1-100 μM) over the corresponding control. In the presence of both Cu(II) (20 μM) and NADPH (100 μM), 4-CICAT induce a 10-fold increase in the number of AP sites at nanomolar concentration under physiological conditions. Further investigation indicated that the DNA damage induced by 4-CICAT plus Cu(II) and NADPH was inhibited by the additions of catalase, copper(I)-specific chelator, and glutathione whereas superoxide dismutase and hydroxyl radical scavengers were ineffective. These results suggest the involvement of Cu(I) and hydrogen peroxide in the induction of oxidative DNA damage by 4-CICAT. In summary, these data demonstrate that similar to the para-quinonoid counterparts, chlorinated ortho-quinonoids are capable of inducing significant oxidative modifications in genomic DNA

一、前言

氯酚(chlorophenols)衍生物為環境中最為廣泛使用之農業用生化防除藥劑(biocides)之一。部分工業生產過程中之副產物及廢棄物中，亦含有氯酚衍生物。氯酚化合物較不易為生物所分解代謝，而易於環境中累積，因此氯酚類化合物為環境極為重要之污染物質。台灣地區目前已知之有害廢棄物儲存場，或廢棄物掩埋場中，部分之土壤及地下水已遭受高濃度之五氯酚及其他氯酚類化合物之污染。目前包括五氯酚(pentachlorophenol)、2,4-二氯酚(2,4-dichlorophenol)等，已被環保署列為164種優先管制的毒性污染物名單內。

氯酚化合物，例如4-單氯酚(4-chlorophenol)、五氯酚(pentachlorophenol)等化合物，可經由生物分解中之好氧代謝過程透過氧化酵素(oxygenase)之參與，而形成含氯鄰位醌類化合物(chlorocatechol)。例如4-單氯酚代謝過程中所產生之4-單氯醌(4-chlorocatechol, 4-CICAT)。含氯數較少之氯酚化合物，通常以dioxigenase使catechol開環後，再脫去氯原子；而含氯數較多的氯酚化合物，則至少需經由去除一氯原子後再透過開環而移除[1]。此外，環境中含氯醌(chlorocatechol)之來源，亦可經由工業製造或自然生成而進入環境中。含氯醌可作為工業製造方面之添加物或原料通常是用於製造橡膠、染劑、

塑膠、藥品或化妝品等[2]。由於此化合物不易經由標準廢水處理而去除，會經由工業廢水的排放而聚積在湖泊或河流的底泥中。另外，細菌或真菌類在降解氯苯、含氯芳香族等過程中常會伴隨產生含氯醌此種中間產物，並釋放到環境中[3]，降解後的含氯醌多半較降解前更具毒性[4]，常成為廢棄物處理的一個問題。

哺乳類動物對氯酚類化合物之代謝轉化可經由兩種途徑而生成醌類衍生物。以五氯酚為例，cytochrome P450 1A2可將五氯酚轉化生成醌，所生成之醌再進一步經由自動氧化而形成半醌及苯醌，氧分子可藉由此過程生成而形成活潑性氧(reactive oxygen species, ROS)[5,6]，包括過氧化氫(hydrogen peroxide, H_2O_2)、超氧自由基(superoxide anion, $\text{O}_2^{\cdot -}$)、氫氧自由基(OH^{\cdot})等。另一途徑則是經由過氧化酵素(peroxidase or cytochrome P450 peroxygenase)將五氯酚直接轉化而生成苯醌。苯醌可被還原形成半醌，藉由此氧化還原循環過程不斷產生大量之ROS，此類ROS亦即造成氧化的壓力(oxidative stress)主要來源。以五氯酚為例，五氯酚會造成哺乳類細胞染色體的損害(chromosomal damage)，可導致作業場所勞工淋巴細胞染色體產生異常的現象(chromosomal aberration)，而其所引起的染色體損害，很可能是來自於五氯酚的對位醌類衍生物所誘發之氧化還原循

環所引起之 DNA 氧化破壞作用(oxidative DNA damage) [7,8]。研究證據顯示，小牛胸腺 DNA 與金屬離子與氯酚對位醌類衍生物同時反應後，其 AP sites 及 DNA SSB 皆有非常顯著之增加[9]。此外人類 HeLaS3 tumor cell line 若與氯酚對位醌類衍生物，同時反應後，其細胞核內 DNA 之 AP sites 顯著增加。鑑於氯酚對人體及自然界中野生動物具有致基因性毒害、致畸、及致癌作用潛在風險，因此，鄰位醌類代謝物其致基因毒性機制，對氯酚類化合物之致癌機制研究相當重要，但目前對鄰位醌類代謝物質(ortho-quinonoids)之致基因毒性研究，仍舊欠缺。本研究之主旨即在於探討氯酚鄰位醌類代謝物，4-CICAT，能否經由不斷之氧化還原循環生成 ROS，進而對核酸 DNA 產生破壞作用及其機制進行探討。

二、實驗材料與方法

2.1 實驗藥品

本研究中所使用的水，皆經逆滲透、活性炭吸附及離子交換處理過的超純水，其電導度在 18 Ω 以上 (Millipore, Ultra-pure water system)。小牛胸腺 DNA(calf thymus DNA, ct-DNA)、NADPH、氯化銅(CuCl₂)、過氧化氫酵素(catalase, CAT)、超氧化物歧化酵素(SuperOxide Dismutase, SOD)、還原態麩胱甘肽(Glutathione, GSH)、Butylated Hydroxytoluene (BHT)、Dimethyl sulfoxide (DMSO)、bathocupronine (BAT)、絕對酒精及四氯對位醌 (tetrachlorohydroquinone, Cl₄HQ)購自 Sigma 化學公司。甲醇(methanol)購自 Aldrich 化學公司，4-CICAT 購自 Relix Biotech 公司(Richmonde, BC, Canada)。磷酸鹽緩衝液(PBS)購自 USB 化學公司產品。瓊膠電泳所用之瓊膠(agarose)採用 Bio-Rad 公司產品，TBE 緩衝液購自 USB 公司，ethidium bromide (EtBr)、bromophenol blue、formamines 購自 Sigama 公司，xylene cyanol FF 購自 Aldrich 公司，DNA marker 購自 MBI 公司。

2.2 實驗方法與步驟

2.2.1 金屬離子及 NADPH 之影響

鑑於對位醌類(para-quinonoids)代謝物已知可在過渡性金屬離子，例如銅離子 Cu(II)，存在環境下，可增強其 DNA 氧化損壞作用(例如去鹼基核酸)。為

確定鄰位醌類(ortho-quinonoids)代謝物亦具有誘發生成之 DNA 氧化損害作用之能力，4-CICAT(250 μM)與 DNA(100 μg)反應樣本中，加入過渡性金屬離子 Cu(II)(20-100 μM)，於含有 50 mM 磷酸鹽緩衝液(phosphate buffer saline, PBS, pH 7.4)中。部分樣品將加入 NADPH(100 μM)及 Cu(II)，測試其存在對 4-CICAT 之影響。於 37 °C 進行反應，經過 2 小時反應後，反應物迅速置於冰浴(0 °C)中以終止反應並避免空氣及光線直射，藉以降低氧化對 DNA 造成損害作用之背景值。冰浴終止反應後，以 2.5 倍體積(1000 μl)及 -20 °C 之絕對酒精將 DNA 離心沈澱。待除去上層液後，再加入等體積(400 μl)70 % 的乙醇(-20 °C)，經短暫震盪勻洗後，再重複此一勻洗步驟。收集 DNA 纖維分子重新溶於 4 °C 純水。待 DNA 完全溶解後，以分光光度計(spectrophotometer)定量，依據波長為 260 nm 時吸收度為 1，代表 DNA 濃度為 50 μg/ml，經由換算，可得知所回收之 DNA 濃度。DNA 之氧化損壞作用將以瓊膠-電泳法(gel electrophoresis)分析 DNA 單鏈斷裂及去鹼基核酸之程度。

2.2.2 ROS 移除劑、抗氧化劑及 Cu(I) 螯合劑之影響

為確定有活潑性氧分子之物種直接參與 4-CICAT 所造成的 DNA 氧化損害作用，部份樣本將加入不同的活潑性氧分子移除劑，如氫氧自由基移除劑(甲醇及 DMSO, 6 %)、抗氧化劑 BHT(1 mM)、CAT(30units)、SOD(30units)及 BAT(100uM)以鑑定醌類衍生物所生成之活潑性氧分子，何者直接參與對 DNA 造成損壞作用。

2.2.3 還原態麩胱甘肽(Glutathione, GSH)存在之影響

生物體內生性之還原態麩胱甘肽(Glutathione, GSH)，原是作為移除體內具活性代謝物之小分子物質，一旦與代謝物鍵結即可降低其活性並增加其水溶性，使之易於排除體外。但已有證據顯示，少部分與 GSH 鍵結後之產物，例如雌性激素之苯醌類化合物，仍具有化學活性，對 DNA 具有損壞作用。因此，GSH 與 4-CICAT 形成鍵結後的產物，有可能仍具化學活性，及對 DNA 產生氧化損壞作用。GSH (10~10000 μM)將預先與 4-CICAT (250 μM)反應，待加入過渡性金屬離子後(例如 Cu(II) (100 μM))，再與 DNA(100 μg)反應，用以測試 GSH 之存在對 4-CICAT

所引起之 DNA 氧化損壞作用之影響。

2.3 分析方法

2.3.1 去鹼基核酸分析法

15 μg 的 DNA 溶於 150 μl 的磷酸鹽緩衝液中，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的溫度下與 1mM 的醛基反應探針(aldehyde reactive probe, ARP)反應 10 分鐘。利用冰乙醇將 DNA 沈澱，再使用 70% 的酒精潤洗沉澱後的 DNA，並將 DNA 重新溶於 TE 緩衝液(10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.2)。DNA 置於 100 $^{\circ}\text{C}$ 加熱 5 分鐘後即快速置於冰浴冷卻，再與等體積 2 M 醋酸銨溶液(ammonium acetate)混和均勻。利用 Minifold II 真空過濾裝置(vacuum filter device)將 DNA 固定在 nitrocellulose(NC) 濾膜上。將 NC membrane 浸泡在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的 5 倍 SSC(0.75M NaCl, 0.075M trisodium citrate) 溶液 15 分鐘，於 80 $^{\circ}\text{C}$ 的真空烘箱乾燥 1-2 小時。NC 濾膜以含 BSA(20mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1M NaCl, 1mM EDTA, 0.5%casein, 0.25%BSA, 0.1%Tween 20) 及 10mM Tris-NaCl 溶液於室溫預先培養 1 小時。之後 NC 濾膜於 streptavidin-conjugated horseradish peroxidase (HRP)的溶液中於室溫下培養 30 分鐘。再經沖洗緩衝液(0.26M NaCl, 1mM EDTA, 20mM Tris-HCl, 0.1%Tween 20, pH7.5)潤溼 NC 膜 15 分鐘後，膜上的酵素活性將以 ECL 試劑呈現。NC 濾膜將於 X 光底片曝光，再以 Gel Doc 2000 數據影像處理分析系統及 GelScan XL 軟體系統分析 X 光底片。最後再與去鹼基核酸的內標準品比較以估計待測物中所含有的去鹼基核酸數目。

2.3.2 DNA 單股斷鏈分析

本實驗使用修正後 Chen 所提列之瓊膠電泳方法 [10,11,12]，分析 DNA 單股斷鏈。實驗之流程如下所述：DNA(5 μg)溶在純水中，加入 5 μl DNA 序列終止液(內含 10mM NaOH、95% formamide、0.1% bromophenol blue 以及 0.1% xylene cyanol)後，於 100 $^{\circ}\text{C}$ 反應 5 分鐘。變性後之 DNA 立即在含有 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ethidium bromide (EtBr)的 0.7% agarose gel(瓊膠)中進行電泳分離，並以含有 1 mM EDTA 的 Tris-acetate(40 mM)作為電泳所需的緩衝液。以 100 伏特電壓進行電泳分離，約經 4 小時後，將電泳分離後的瓊膠置於備有 UV(312 nm)光之 Gel Doc 2000 數據

影像處理分析系統下，使 DNA 顯影，並照相分析結果。

2.4 數據分析

實驗所得之結果，去鹼基核酸分析部份均以平均值 \pm 標準偏差(mean \pm SD)來表示。當 $P < 0.05$ 時，表示在統計上有差異顯著。統計分析是以 Kyplot 軟體以 ANOVA 以檢定各組間之差異，並以 Dunnett's multiple 比較法測試。

三、結果

3.1 4-CICAT 誘發 ct-DNA 之 AP sites 生成

3.1.1 過渡性金屬離子與 NADPH 之影響

研究結果證實，4-CICAT (0.1 – 10 μM)與過渡性金屬 Cu(II) (20 μM)及 NADPH (100 μM)同時存在下能對 ct-DNA 誘發 AP sites 之生成且其 AP sites 之生成量會隨濃度之增加而增加如圖 1 所示。其中當 4-CICAT 之濃度為 0.1 μM 即能誘發 10 倍於控制組之 AP sites 生成(71.5 vs 6.50 AP sites per 10^6 total nucleotides)($p < 0.05$)。此一證據顯示，含氯鄰位煙醌一如對位煙醌，皆能與過渡性金屬 Cu(II)及 NADPH 作用而造成 DNA AP sites 之生成。

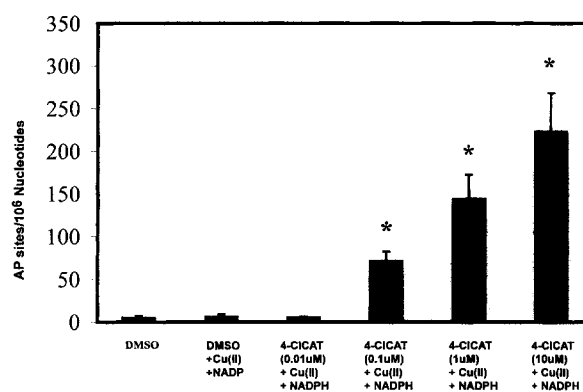


圖1 不同濃度之4-CICAT於Cu(II)及NADPH存在下對 ct-DNA誘發 AP sites之生成量之影響。其中4-CICAT(0.1 – 10 μM)與ct-DNA (100 μg)反應過程中，加入過渡性金屬離子 Cu(II)(20 μM) 及 NADPH(100 μM)，於50 mM磷酸鹽緩衝液(pH 7.4) 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反應2小時。DNA經純化後以去鹼基核酸分析法分析AP site生成量(*表示與對照組相比有 $p < 0.05$ 的顯著性)

3.1.2 活潑性氧分子移除劑之影響

利用不同 ROS 移除劑，藉由其可移除特定活潑性氧分子之特性，部分樣本中測試，經添加特定之移除劑作為移除氧化還原循環作用中所產生之活潑性氧分子物種之實驗結果顯示。當 4-CICAT (250 μ M) 及 Cu(II) (100 μ M) 與 DNA 反應中，分別添加 DMSO (6%)、SOD (30 units) 對反應產生的 AP sites 並無抑制作用，然而 CAT (30 units) 則有明顯的抑制效果 ($p < 0.05$) (圖 2)。此一結果顯示，4-CICAT 之氧化還原作用中生成的活潑性氧分子為過氧化氫 (H_2O_2)。

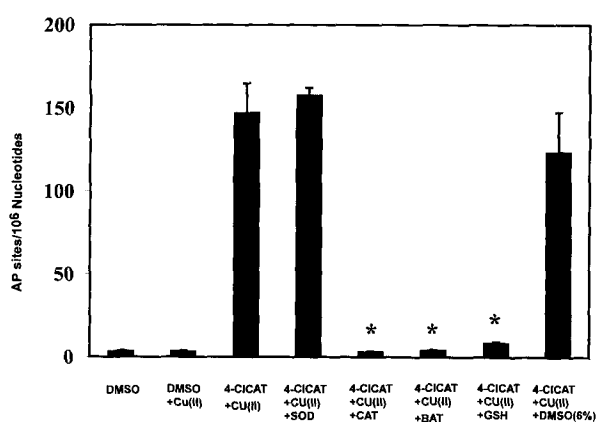


圖 2 活潑性氧分子移除劑對 4-CICAT 誘發去鹼基核酸之影響。其中 4-CICAT (250 μ M) 與 ct-DNA (100 μ g) 反應過程中，加入過渡性金屬離子 Cu(II) (100 μ M)，於 50 mM 磷酸鹽緩衝液 (pH 7.4) 37 °C 下反應 2 小時。部分樣本中額外添加 SOD (30 units), CAT (30 units), BAT (100 μ M), GSH (500 μ M)。DNA 經純化後以去鹼基核酸分析法分析 AP site 生成量 (*表示與對照組相比有 $p < 0.05$ 的顯著性)

3.1.3 還原態麩胱甘肽 (glutathione, GSH) 之影響

為進一步探討生物體內具降解毒性作用之 GSH 對 4-CICAT 之 DNA 氧化損壞作用之影響，本研究中以 4-CICAT (250 μ M) 及 Cu(II) (100 μ M) 與 DNA 反應中添加 GSH (500 μ M)，實驗結果顯示，額外添加 GSH 對 4-CICAT 及 Cu(II) 造成 ct-DNA 之 AP sites (8.7 AP sites per 10⁶ total nucleotides) 相較於不添加 GSH 對照組 (147 AP sites per 10⁶ total nucleotides) 具有顯著之抑制作用 ($p < 0.05$) (圖 2)。

3.1.4 Cu(I) 螯合劑 (bathocuproine) 之影響

為能進一步了解過渡性金屬 Cu(II) 於醌類化合物氧化還原過程中，其參與 DNA 氧化損壞作用之有效金屬型態，因此針對 Cu(I) 添加具特異性之 Cu(I) 螯合劑 BAT (100 μ M)，來探討 Cu(I) 螯合劑對反應之影響。研究結果顯示，BAT 對 4-CICAT (50 μ M) 及 Cu(II) (20 μ M) 所生成 DNA AP sites 能產生抑制之作用 (4.3 vs 147 AP sites per 10⁶ total nucleotides) ($p < 0.05$) (圖 2)。此一研究結果顯示，BAT 可有效隔離 Cu(I)，同時亦能阻止 Cu(II)/Cu(I) 間的氧化循環反應，使得苯醌 (benzoquinone) 及煙醌 (catechol) 還原或氧化循環過程中無法進行，進而阻止伴隨此反應所生成的 H_2O_2 出現，因此能抑制 AP sites 之生成。

3.2 4-CICAT 誘發 DNA SSB 之生成

3.2.1 活潑性氧分子移除劑之影響

針對中 4-CICAT 經添加 Cu(II) 後於生理環境下是否能對 ct-DNA 產生 DNA SSB。研究結果顯示，4-CICAT (250 μ M) 在 Cu(II) (100 μ M) 存在環境下可誘發 ct-DNA 之 SSB。此外反應中所添加活潑性氧分子移除劑之測試中，甲醇、DMSO 為 $\cdot OH$ 之移除劑，抗氧化劑 BHT 為非具專一性之 ROS 移除劑、SOD 為 $O_2^{\cdot -}$ 之移除劑，CAT 為 H_2O_2 之移除劑。研究結果證實，甲醇 (6%)、DMSO (6%)、抗氧化劑 BHT (1 mM)、SOD (30 units) (圖 3, Lanes 4-7)，對 4-CICAT 及 Cu(II) 所誘發之 DNA SSB，均無抑制能力。但相反地，CAT 則具有明顯的抑制效果 (圖 3, Lane 8)。因此，此一證據顯示，4-CICAT 經添加 Cu(II) 後所生成之 H_2O_2 ，可能為主要之活潑性氧分子，除對 ct-DNA 產生 AP sites 外，並可造成 DNA SSB。

3.2.2 GSH 之影響

本研究中以 4-CICAT 及 Cu(II) (100 μ M) 與小牛胸腺 DNA 反應，並於部分樣本中加入不同濃度之 GSH (10 - 1000 μ M)，測試 GSH 對 4-CICAT 生成 DNA SSB 中所扮演的角色。實驗結果顯示，GSH (500 μ M) 即對 4-CICAT (250 μ M) 造成的 DNA SSB 具有抑制作用，兩者之間並存在著劑量-效應正相關 (圖 4)。

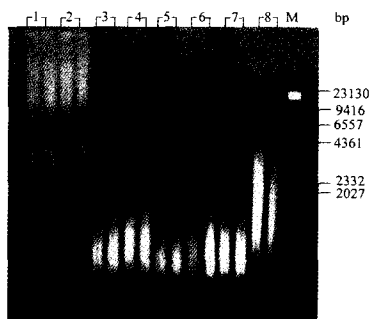


圖 3 活潑性氧分子移除劑對 4-CICAT 造成 DNA 單股斷鏈效應之比較。其中 4-CICAT(250 μ M) 與 DNA(100 μ g) 反應中加入過渡性金屬離子 Cu(II)(100 μ M)，於 50 mM 磷酸鹽緩衝液(pH 7.4)37 $^{\circ}$ C 下反應 2 小時。DNA 經純化後以瓊膠電泳分析法分析 DNA 單股斷鏈效應。M：DNA Marker；Lane 1：DMSO；Lane 2：DMSO + Cu(II)；Lane 3：4-CICAT + Cu(II)；Lane 4：4-CICAT + Cu(II) + DMSO(6%)；Lane 5：4-CICAT + Cu(II) + methanol(6%)；Lane 6：4-CICAT + Cu(II) + SOD(30 units)；Lane 7：4-CICAT + Cu(II) + BHT(1mM)；Lane 8：4-CICAT + Cu(II) + catalase(30 units)

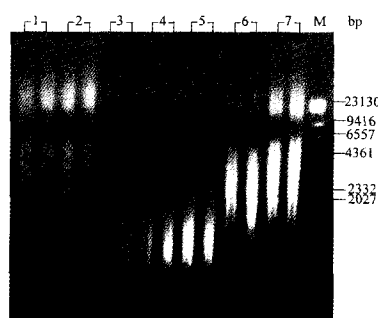


圖 4 還原態胱甘肽(glutathione, GSH)對 4-CICAT 造成 DNA 單股斷鏈效應之影響。GSH(10~1000 μ M)將預先與 4-CICAT (250 μ M) 反應，待加入 Cu(II) (100 μ M)，再與 DNA(100 μ g) 於 50 mM 磷酸鹽緩衝液(pH 7.4)37 $^{\circ}$ C 下反應 2 小時。DNA 經純化後以瓊膠電泳分析法分析 DNA 單股斷鏈效應。M：DNA Marker；Lane 1：DMSO；Lane 2：DMSO + Cu(II)；Lane 3：4-CICAT + Cu(II)；Lane 4：4-CICAT + Cu(II) + GSH(10 μ M)；Lane 5：4-CICAT + Cu(II) + GSH(100 μ M)；Lane 6：4-CICAT + Cu(II) + GSH(500 μ M)；Lane 7：4-CICAT + Cu(II) + GSH(1000 μ M)

四、討 論

ROS 可與 DNA 反應誘發 DNA 損害作用，包括鹼基氧化(base oxidation)、去氧核糖損害(sugar damage)、DNA 斷鏈(strand break)、去鹼基核酸(apurinic/apyrimidinic sites, AP sites)形成、以及 DNA 與蛋白質之間的交叉結合等(DNA-protein cross link)[13]。研究證據顯示，醌類化物的氧化還原循環作用包含酵素性(enzymatic) (例如 P450/P450 還原酵素)以及非酵素性(non-enzymatic)作用，期間伴隨產生半醌(semiquinone)與 $O_2^{\cdot-}$ [14,15,16]。而 $O_2^{\cdot-}$ 又可經由 SOD，或是自發性反應形成 H_2O_2 ，在過渡性金屬(如銅、鐵)存在環境下， H_2O_2 被還原 $\cdot OH$ [17]。 $\cdot OH$ 為強氧化劑，可造成細胞巨分子之氧化損害作用。本研究結果證實，氯酚鄰位醌類衍生物 4-CICAT 與 Cu(II)同時存在下，會於過程中產生 ROS，並同時對 ct-DNA 造成 DNA SSB 及 AP sites 之生成，而 NADPH 之存在將進一步提昇其 DNA 之氧化壞作用(圖 1 與圖 2)。此一結果與其他醌類化物，例如 4-hydroxyestradiol (4-OH-E₂)、四氯對位醌(tetrachlorohydroquinone, Cl₄HQ)等與 Cu(II)的反應結果，皆呈現出類似結果。本研究之結果亦證實，當 4-CICAT 與 Cu(II)反應過程中所生成之 $O_2^{\cdot-}$ 並非造成 DNA 氧化損壞作用之主要 ROS 之物種，而 H_2O_2 則實際參與 DNA SSB 及 AP sites 之同時形成。此一研究證據進一步顯示，含氯鄰位醌類化物為氯酚衍生物代謝產物中重要之致基因毒害之物種，且其作用機制中，係經由氧化還原循環所生成之 ROS 所致。

銅為生物體內必需的過渡性元素，分布在整個生物體中，在多數器官中，銅以毫莫耳的濃度存在，在腎臟或肝臟等組織中銅的濃度可超過 100 μ M。細胞中約有 20%的銅位於細胞核中並與染色體、DNA 鹼基緊密結合，特別是 guanine 第 7 位置的 N 原子上。DNA-銅的結合被認為與維持染色體正常結構、基因調控有關。研究證據顯示，多種酚類化合物，如醌(hydroquinone)、雌性激素之衍生物 2-hydroxy-catechol estrogen(2-OH-E₂)、以及對位醌(1,4-HQ)等，與 Cu(II)反應後，均會伴隨生成 ROS 並造成 DNA SSB[18,19]。本研究中添加 Cu(I)螯合劑同樣對 DNA 損壞作用具有抑制能力，顯示可能 Cu(I)/Cu(II)氧化還原循環作用在 4-CICAT 造成 DNA 損壞作用中扮演重要角色。由於在細胞中銅與 DNA 結合在一起，因

此銅與 4-CICAT 反應產生的活性氧化物可能會攻擊 DNA 特定位置，特別是與銅結合的鹼基之相鄰位置如 guanine。Cu(I)螯合劑-BAT-的加入抑制 DNA 單鏈斷裂程度，顯示當 BAT 與 Cu(I)結合阻止 Cu(I)再氧化成 Cu(II)，終止 Cu(II)/Cu(I)間的氧化還原循環作用，這暗示 Cu(II)/Cu(I)間的氧化還原循環作用在此反應扮演重要角色。由此推論首先 Cu(II)還原生成 Cu(I)，因 Cu(I)與 DNA 具有高度親和力，使得 Cu(I)迅速與 DNA 生成共價性或非共價性 DNA-Cu(I)複合物鍵結[20]，因此可推測 4-CICAT 氧化生成 4-單氯鄰位苯醌過程中，所產生的 $O_2^{\cdot-}$ 因自發性反應形成 H_2O_2 ，進而使得鄰近的 DNA-Cu(I)複合物進一步形成 DNA-Cu(I)OOH，並造成 DNA 斷鏈[21,22]。綜合以上結果可以推論 4-CICAT 造成 DNA 氧化損壞作用之機制如圖 5 所示。

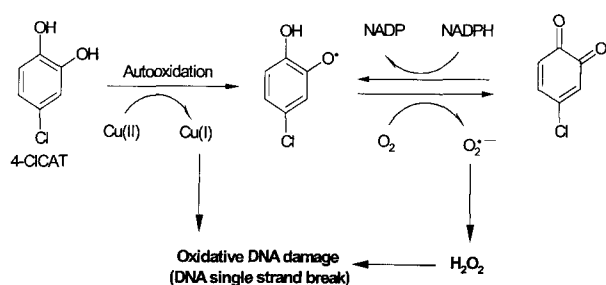


圖 5 4-單氯鄰位醌(4-CICAT)造成 DNA 氧化損壞作用之機制

細胞可經由酵素系統或是非酵素系統的作用，除去活性氧化物，避免細胞受到活性氧化物的損害作用，其中 GSH 便是屬於非酵素系統中的一個小分子物質，它可以直接與活性氧化物反應生成 GSSG 與水，但也有證據顯示，少部分與 GSH 鍵結後之產物，例如雌性激素之苯醌類化合物，仍具有化學活性，對 DNA 具有損壞作用[23]。因此 GSH 在醌類化合物與 DNA 反應作用中所扮演的角色，需要進一步的釐清，本研究之實驗結果證實，GSH 具有抑制 4-CICAT 所誘發 DNA 氧化損壞作用。由於 GSH 並非具專一特性之 ROS 移除劑，但由實驗結果中推測，GSH 在此反應中的作用可能類似於 catalase 之保護機制，將反應產生的 H_2O_2 轉變成水分子，而達到保護 DNA 的功用。

本研究結果針對小牛胸腺 DNA 所進行之測試 4-CICAT 對 DNA 氧化損壞之初步結果，目前已針對哺

乳動物細胞株進一步驗證此一研究結果。

五、結 論

本研究結果，可獲得以下之結論：

1. 過渡性金屬 Cu(II)與氯酚鄰位醌類活性代謝物 4-CICAT 共同存在下，會誘發 ctDNA 之 DNA SSB 及 AP sites 同時生成，而 NADPH 之存在將能進一步提昇齊 DNA 氧化損壞作用。
2. Cu(I)-specific 螯合劑能抑制 Cu(II)與 4-CICAT 誘發的 DNA SSB，顯示 Cu(II)/Cu(I)的氧化還原循環作用為一重要步驟，同時 Cu(I)與活潑性氧分子中之 H_2O_2 所結合之錯合物，Cu(I)OOH，有可能為實際參與 DNA 單鏈斷裂之物种。
3. GSH 可同時抑制 Cu(II)與 4-CICAT 所誘發的 DNA SSB 及 AP sites 之生成，此一研究證據顯示 GSH 可能是與 4-CICAT 結合後中斷其氧化還原之循環，終止 ROS 生成而造成抑制 DNA 氧化損壞作用之生成；同時 GSH 亦有可能是直接與 ROS 反應，直接移除 ROS，達到保護 DNA 之作用。
4. 因 4-CICAT 能同時誘發核酸 DNA SSB 及 AP sites 之生成，顯示所生成之 AP sites 應為 3'- 或 5'-斷裂之 AP sites，此一現象對 DNA 修補酵素可能產生一定程度之影響。

六、致 謝

本研究感謝國科會研究計劃 NSC 89-2320-B-005-006 之補助，特此申謝。

參考文獻

1. Steiert, J.G. and Crawford, R.L., "Microbial Degradation of Chlorinated Phenols," *Trend in Biotechnology*, Vol. 3, No. 12 pp. 300-305(1985).
2. Milligan, P.W. and Häggblom, M.M., "Biodegradation of Resorcinol and Catechol by Denitrifying Enrichment Cultures," *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 17, pp. 1456-1461 (1998).
3. Neilson, A.H., "The Biodegradation Organic Compounds," *The Journal of Applied Bacteriology*, Vol. 69, pp. 445-470(1990).
4. Boyed, E. M., Meharg, A. A., Wright, J., and Killham,

- K., "Assessment of Toxicological Interactions of Benzene and Its Primary Degradation Products (catechol and phenol) Using a Lux-modified Bacterial Bioassay," *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 16, pp. 849-856 (1997).
5. La, D.K., Lin, P.H. and Swenberg, J.A., "Analysis of DNA Adducts in Rats Chronically Exposed to Pentachlorophenol," *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, Vol. 39, pp. 2253 (1998).
 6. Carstens, C.P., Blum, J.K. and Witte, I., "The Role of Hydroxyl Radicals in Tetra-chlorohydroquinone Induced DNA Strand Break Formation in PM2 DNA and Human Fibroblasts." *Chemico-Biological Interactions*, Vol. 74, pp. 305-314 (1990).
 7. Lin, P. H., Nakamura, J., Yamaguchi, S., La, D.K. and Swenberg, J.A. "Oxidative Damage and Direct Adducts in Calf Thymus DNA Induced by Tetrachlorohydroquinone and Tetrachloro-1,4-benzoquinone," *Carcinogenesis*, Vol. 22, pp. 627-634 (2001).
 8. Lin, P.H., Nakamura, J., Yamaguchi, S., La, D.K., Upton, P.B. and Swenberg, J.A. "Induction of Direct Adducts, 5'-cleaved Apurinic/aprimidinic Sites, and Oxidized Bases in Nuclear DNA of Human HeLa S3 Tumor Cells by Tetrachlorohydroquinone," *Carcinogenesis*, Vol. 22, pp. 635-639 (2001).
 9. Lin, P.H., La, D.K., Upton, P.B. and Swenberg, J.A. "Analysis of DNA Adducts in Rats Exposed to Pentachlorophenol," *Carcinogenesis*, *Accepted, In Press* (2001).
 10. Freeman, S.E., Blackett, A.D., Monteleone, D.C., Setlow, R.B., Sutherland, B.M. and Sutherland, J.C. "Quantitation of Radiation-, Chemical-, or Enzyme-Induced Single Strand Breaks in Nonradioactive DNA by Alkaline Gel Electrophoresis: Application to Pyrimidine Dimers," *Analytical Biochemistry*, Vol. 158, pp. 119-129 (1986).
 11. Ogden, R.C. and Adams, D.A. "Electrophoresis in Agarose and Acrylamide Gels," *Methods in Enzymology* Vol. 152, pp. 61-87 (1987).
 12. Chen, Y., Shen, L., Zhang, F., Lau, S. S., van Breemen, R. B., Nikolic, D. and Bolton, J. L.. "The Equine Estrogen Metabolite, 4-hydroxyequilenin Causes DNA Single-strand Breaks and Oxidation of DNA Bases in Vitro," *Chemical Research in Toxicology*, Vol. 11, pp. 1105-1111 (1998).
 13. Breen, A.P. and Murphy, J.A. "Reactions of Oxy Radicals with DNA," *Free Radical Biology and Medicine*, Vol. 18, pp. 1033-1077 (1995).
 14. Powis, G. "Metabolism and Reactions of Quinoid Anticancer Agents," *Pharmacology and Therapeutics*, Vol. 35, pp. 57-162 (1987).
 15. O'Brien, P. J. "Molecular Mechanisms of Quinone Cytotoxicity," *Chemico-Biological Interactions*, Vol. 80, pp. 1-14(1991).
 16. Monks, T. J., Hanzlik, R. P., Cohen, G. M., Ross, D., and Graham, D. G. "Contemporary Issues in Toxicology: Quinone Chemistry and Toxicity," *Toxicology*, Vol. 112, pp. 2-16 (1992).
 17. Stadtman, E. R. and Berlett, B. S., "Fenton Chemistry. Amino Acid Oxidation," *The Journal Biological Chemistry*, Vol. 266, pp. 17201-17211.(1991)
 18. Lin, P.H., Nakamura, J., Yamaguchi, S., La, D.K. and Swenberg, J.A. "Oxidative Damage and Direct Adducts in Calf Thymus DNA Induced by Tetrachlorohydroquinone and Tetrachloro-1,4-Benzoquinone," *Carcinogenesis* (2001).
 19. Li, Y., Trush, M. A. and Yager, J. D. "DNA Damage Caused by Reactive Oxygen Species Originating from a Copper-dependent Oxidation of the 2-hydroxy Catechol of Estradiol," *Carcinogenesis*. Vol. 15, pp. 1421-1427 (1994).
 20. Kawanishi, S., Hiraku, Y. and Oikawa, S. "Mechanism of Guanine-specific DNA Damage by Oxidative Stress and Its Role in Carcinogenesis and Aging," *Mutation Research*, Vol. 488, pp. 65-76 (2001).
 21. Drouin, R., Rodriguez, H., Gao, S. A., Gebreyes, Z., O'Connor, T. R., Holmquist, G. P. and Akman, S. A. "Cupric Ion/ascorbate/hydrogen Peroxide-induced DNA Damage: DNA-bound Copper Ion Primarily Induces Base Modifications," *Free Radical Biology and Medicine*, Vol. 21, pp. 261-273(1996).
 22. Liu, C., Zhou, J., Li, O., Wang, L., Liao, Z. and Xu, H.

“DNA Damage by Copper(II) Complexes: Coordination-structural Dependence of Reactivities,” *Journal of Inorganic Biochemistry*, Vol. 75, pp. 233-240 (1999).

23. Butterworth, M., Lau, S. S. and Monks, T. J “2-Hydroxy-4-glutathion-S-yl-17beta-estradiol and 2-hydroxy-1-glutathion-S-yl-17beta-estradiol Produce Oxidative Stress and Renal Toxicity in An Animal Model of 17beta-estradiol-mediated Nephrocarcinogenicity,” *Carcinogenesis*, Vol.1 9, pp. 133-139(1998).

論文收稿：91 年 5 月 17 日

論文修訂：91 年 7 月 2 日

論文接受：91 年 7 月 20 日