有机农药和含铜、锌等无机农药协同毒性作用机理

朱本占, 范瑞梅, 盛治国

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

2011-03-21 收稿, 2011-04-22 接受

国家重点基础研究发展计划(2008CB418106)、中国科学院百人计划和国家自然科学基金(20877081, 20890112, 20921063 和 20925724)资助项目

摘要 目前我们对环境污染物的认识主要来源于对某单一化学物质在相对高浓度情况下的研究. 然而, 人们在其一生中很少只暴露于单独某一种化学物质, 而是同时暴露于多种低浓度的化学物质. 从公众健康的角度讲, 大家主要担心的是当两种和两种以上化学物质相互作用时, 两者能否产生不同寻常的协同毒性. 五氯酚、威百亩等有机农药和含铜、锌等无机农药皆被用作通用杀虫剂或木材保护剂, 两者在许多农田和木材保护处理场所附近的土壤和水体以及在普通人群的体液和组织中, 均发现同时共存. 我们最近的研究表明, 这两类物质共存时可以对大肠杆菌产生协同毒性效应, 其协同毒性作用机制可能是由于两者形成了亲脂性络合物, 促进了细胞对金属离子的吸收和累积. 此类有机和无机污染物之间的相互作用以及亲脂性络合物形成而导致的协同毒性作用, 可能是普遍存在于有机和无机污染物之间的一种共同毒性作用机制. 这一假设是否成立, 尚有待进一步的实验和理论研究.

关键词

协同毒性
亲脂性络合物
五氯酚
威百亩
含铜、锌无机农药

目前, 我们对环境污染物的毒性和致癌性的知识主要来源于对某单一化学物质在相对高浓度情况下的研究. 多年来, 对单独某种物质的研究所获得的作用机理方面的信息, 虽然在多数情况下对我们从实验结果推及对人类风险评估方面打下了合理的基础, 然而当用于评估复杂环境混合物时却不那么成功. 另外, 人们在其一生中很少只暴露于单独某一种化学物质, 而是同时暴露于多种低浓度的化学物质. 从公众健康的角度讲, 大家主要担心的是当两种和两种以上化学物质相互作用时, 两者能否产生不同寻常的协同毒性, 而每一种物质在单独存在时并不产生明显毒性. 事实上, 最近的研究表明, 某些环境化学物质的毒性往往被低估了.

五氯酚、威百亩等有机农药和含铜、锌等无机农药皆被用作通用杀虫剂或木材保护剂, 两者在许多农田和木材保护处理场所附近的土壤和水体以及在普通人群的体液和组织中, 均发现同时共存. 本文将以五氯酚、威百亩等有机农药和含铜、锌等无机农药

为两大类代表性环境污染物的, 简述复合环境污染物的协同毒性研究方面的进展.

1 氯代酚类和二硫代氨基甲酸类有机农药

1.1 五氯酚(PCP)及其主要致癌代谢物

五氯酚(Pentachlorophenol, PCP)是一种重要的工农业生物杀灭剂, 主要用于木材保护. 在中国南方地区和其他发展中国家, PCP 还被用于杀灭水螺以预防血吸虫病, 如在我国的洞庭湖区域, 曾经大量使用 PCP, 造成严重水体污染, 表面水 PCP 的含量达到 103.7 $\mu\text{g/L}$. PCP 在世界范围的应用及其相当的稳定性使其成为广泛存在的环境污染物. 事实上, PCP 已在体液如血液、尿液、乳汁中检测到, 在那些非职业性暴露者的组织中也检测到 PCP 的存在^[1-3]. PCP 最大的暴露源是食物链中经过 PCP 处理的木材制品. 人类对于 PCP 的暴露也可源自六氯苯等广泛存在的环境污染物的代谢物^[1-3].

英文引用格式: Zhu B Z, Fan R M, Sheng Z G. Mechanism of synergistic toxicity between organic pesticides and copper/zinc-containing inorganic pesticides (in Chinese). Chinese Sci Bull (Chinese Ver), 2011, 56: 2111-2118, doi: 10.1360/972011-507

PCP 是一种高致癌物质, 长期慢性暴露于 PCP 的小鼠表现出肝脏肿瘤、血管内皮瘤和嗜铬细胞瘤^[4]. 最近有报告在大鼠中出现了恶性间皮瘤和鼻咽癌^[5]. 在人群中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控污染物, 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).

在人体细胞以及大鼠等啮齿类动物的在体实验均发现 PCP 可被肝细胞微粒体的细胞色素酶 P450 氧化脱氯形成四氯氢醌(TCHQ)^[3,6]. TCHQ 还可进一步由四氯半醌自由基(TCSQ·)氧化成四氯苯醌(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. 然而, 一般认为 $O_2^{\cdot-}$ 本身不能直接攻击 DNA, 而是当其变成 H_2O_2 并和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 $O_2^{\cdot-}$ 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]:

$\cdot OH$ 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 $\cdot OH$ 的产生机理, 最被广泛接受的是以上提到的过渡金属离子催化的 Fenton 反应^[2,3]. 然而, 最近我们发现, H_2O_2 和 PCP 的代谢产物之一四氯苯醌(TCBQ)能通过不依赖于金属离子的途径产生 $\cdot OH$ ^[2,3,8-11]; 我们还发现 TCBQ 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的分解和烷氧自由基的形成^[12,13]. 上述机理可部分解释 PCP 等其他多

卤芳香类杀虫剂的致癌性.

虽然 PCP 本身对 DNA 不显示任何反应活性, 但其主要代谢物 TCHQ 在离体的 DNA、多种细胞系以及小鼠的肝脏中均显示可造成 DNA 链的断裂^[14-18]. TCHQ 还可导致 V79 细胞 HPRT 中心的微核形成及变异^[19], 在 V79 细胞和小鼠中还发现形成了 8-羟基-2-脱氧鸟苷^[17,20]. 在肿瘤细胞中 TCHQ 可诱导形成加合物和缺嘌呤/缺嘧啶位点^[21].

1.2 威百亩及其他二硫代氨基甲酸盐类农药

氨基甲酸盐类化合物是最常用的农药之一, 其中, 二硫代氨基甲酸盐类农药是其中的一大类, 被广泛用作杀菌剂、杀虫剂; 此外, 它们在造纸业、橡胶、塑料行业中, 也被用作防腐剂、黏合剂和促进剂. 在一些化学反应中它们也经常作为催化剂和螯合剂而存在^[22-24].

威百亩(Metam Sodium, *N*-甲基二硫代氨基甲酸钠)和二硫化秋兰姆(福美双)是最为常见的二硫代氨基甲酸盐类化合物, 它们单独或与金属的配合物(如福美铁、代森锰、福美锌、代森锌、甲基代森锌、代森等)是常用的杀虫剂, 在世界范围内大量使用, 年均消耗量高达 25000~35000 吨^[24-30]. 研究表明, 这些二硫代氨基甲酸盐类杀虫剂可以诱发哺乳动物帕金森疾病^[31-33].

威百亩主要用作熏蒸剂. 威百亩稀释喷洒后, 可快速分解生成甲基异硫氰酸甲酯和硫化氢, 其中甲基异硫氰酸甲酯被认为是威百亩分解后的活性杀菌产物, 它可与生物分子中的胺基和巯基发生反应, 从而发挥其杀菌作用^[25]. 研究表明, 威百亩在动物体内主要代谢为甲基异硫氰酸甲酯. 由于甲基异硫氰酸甲酯与体内生物大分子结合形成某种复合物, 从而在代谢结束后, 有小部分甲基异硫氰酸甲酯残留于体内. 因此, 甲基异硫氰酸甲酯的这种结合作用和残留

图 1 五氯酚在生物体内的主要醌类代谢产物

效应不可避免地会对生物体产生潜在的影响^[25]。

神经内分泌系统被认为是威百亩或其代谢物在生物体内的一个重要靶器官。有数据显示,威百亩可引起神经内分泌系统紊乱,如头疼、眩晕、疲劳和出汗等。但具体的毒性机制目前还不清楚,我们推测这种神经毒性效应可能与二硫代氨基甲酯类农药与金属离子结合的特性有关。二硫代氨基甲酯类农药能够络合铜离子,从而抑制其与酶活性位点的结合(如超氧化物歧化酶 SOD 和多巴胺- β -羟化酶)^[25]。许多研究表明,二硫代氨基甲酸盐能使得生物细胞内铜和锌浓度增加,并进而产生铜(锌)-诱导的神经系统紊乱^[34-40]。吡咯烷二硫代氨基甲酸盐(PDTC)与 Cu(II)的配合物会不同程度地引起小鼠脑皮层星形细胞内氧化应激,通过激活一系列的信号通路而促使细胞凋亡。此外,还有研究发现,锌是 PDTC-诱导牛脑内皮细胞死亡的主要因素,且 PDTC-诱导的细胞内锌浓度蓄积能通过调节胚胎海马趾源细胞的信号通路的方式影响细胞的增殖能力。由上可知,二硫代氨基甲酸盐导致的神经细胞损伤可能依赖于铜、锌等金属离子的参与^[34-40]。

美国环保署将威百亩列为 2B 类农药^[25]。尽管国际癌症研究协会在早期的研究中并没有找到威百亩具有致癌性的确凿证据,但最近美国环保署在因特网上刊登的一份报告表明,威百亩能导致小鼠和大鼠体内恶性血管肿瘤的发生。但是其致癌机理仍然不清楚^[26]。

在土壤中,约 92%的威百亩在数小时内就会分解成甲基异硫氰酸甲酯。因此,一般认为不会对生态环境产生影响,也不会以残留的方式通过食物链对人类健康造成危害^[25]。但是,1991 年萨克拉门托河发生的威百亩污染事件使人们重新认识到威百亩对环境 and 人类健康的影响。在这一事件中,由于火车失控,导致约有 19000 加仑的威百亩倾入萨克拉门托河^[25]。Koo 等人^[41]的研究表明,从污染点上游加利福尼亚州的邓斯缪尔到加州沙斯塔湖约 40 英里的水域受到严重污染,大多数的水生生物都受污致死。在沙加缅度河进入沙斯塔湖约 2 km 的范围内,浮游动物减少了将近 99.9%,浮游植物体内的叶绿素下降了 80%。我们最近研究发现,威百亩有可能与土壤和水体中的金属离子特别是铜和锌发生协同毒性作用,推测这可能是威百亩对水环境生物体造成危害的原因。

美国环保署调查表明,在 1995 年,威百亩在美国

的使用量约为 3 万吨,使用量在 EPA 指定的常规农药中位居第三^[25]。在我国随着农业机械化的不断发展,威百亩作为可与机械配套使用的杀虫、杀菌剂在我国浙江、山东、河南、安徽等地区被广泛使用。由于此前通常与机械配套使用的甲基溴会破坏和消除高层大气中的臭氧层,根据《蒙特利尔议定书哥本哈根修正案》,在发达国家甲基溴已经被禁止使用,在发展中国家也将于 2015 年停止使用^[25]。因此,作为甲基溴的替代物,预计威百亩在今后的使用量将会大大增加。

2 含铜、锌等重金属的无机农药

2.1 铜及含铜化合物

含铜化合物广泛应用在工农业生产中,用作杀菌剂、食品添加剂及材料保护剂,其中用作木材保护剂的含铜化合物有砷铬酸铜、铜-8-羟基喹啉、环烷酸铜、季铵铜铵、季铵铜、碱性铜季铵和氨溶柠檬酸铜等。砷铬酸铜(CCA)目前在美国用于处理约 80% 的木材产品,是一种潜在的环境污染物^[42-45]。铜-8-羟基喹啉(CuHQ)是唯一被美国木材保护协会列为可用于处理与食品相关木材的保护剂。有关 CuHQ 的致变异反应的研究很少且无定论。如在小鼠和大鼠的经口染毒实验中未发现致癌毒性,而注射给药则显示某种程度的致癌性。还有 3 种第二代不含砷的含铜木材保护剂分别是铜烷基铵化合物系(ACQ)、铜硼唑化合物系(CA)和环己基重氮二恶双合铜系(Cu(HDO)),其中 CA 和 ACQ 有望成为美国木材保护剂的主流。最近,广泛用于金属络合剂的邻菲咯啉(OP)也逐渐作为环境友好的木材保护剂被使用^[46]。

尽管铜是人体的必需元素,但同时也是一种有毒金属。高摄入铜的浓度通常超过 15 $\mu\text{mol/L}$,有时可高达 150 $\mu\text{mol/L}$,其中很大一部分为游离的铜离子,病例主要见于饮用了受污染的自来水或从事矿业活动的人群或火山附近的居民。在患有阿尔茨海默氏病(Alzheimer's Disease)的患者的大脑组织中,铜的浓度可高达 790 $\mu\text{mol/L}$,是健康人的 5.5 倍^[47]。铜在患有某些疾病的患者中会累积,从而加重肝脏负担导致肝损伤^[48,49]。Wilson 氏病、自发性铜中毒病和印第安儿童肝硬变病就是长期慢性摄入过量铜造成的疾病,患者血清铜的浓度是健康人的 5~8 倍。LEC 大鼠肝脏中过量积累铜会形成肝癌。流行病学调查也显示血清中铜浓度和乳腺癌发展存在 U 型关

系. 但是 IARC 组织尚未对含铜化合物对人体的致癌毒性进行评价.

2.2 锌及含锌化合物

含锌化合物也广泛应用在工农业生产中, 用作杀菌剂及材料保护剂^[50-53], 其中用作植物杀菌剂的含锌化合物有福美锌、噻唑锌、代森锌等. 福美锌可用于小麦拌种, 可提高小麦等农作物的产量; 噻唑锌是噻二唑类有机锌杀菌剂, 对柑桔溃疡病有较好的防治效果; 代森锌主要防治马铃薯、番茄免疫病、草莓灰霉病. 异辛酸锌被广泛用作木材保护剂^[50]. 另外, 羟基吡啶硫酮的锌盐经常作为抗皮脂溢药(治疗头皮屑)应用于香波和化妆品以及工业如船舶业、防腐剂行业中^[53].

由于人和动植物体内络合态的锌能增强超氧化物酶的活力, 并且对过氧化物酶的活力有调节作用, 因此, 锌是动植物生长发育及维持正常生理功能所必需的微量元素之一, 广泛存于动物组织中, 对动物生长发育、免疫功能、生殖能力、创伤愈合等方面有着重要影响^[54,55]. 尽管锌是人体的必需元素, 与铜相似, 过量的锌对人体也是有害的. 在患有阿尔茨海默氏病的病人脑组织, 锌的浓度可高达 1055 $\mu\text{mol/L}$, 是健康人的 3 倍^[47]. 然而, 有关锌毒性的确切分子作用机制至今尚不十分清楚.

3 有机和无机环境污染物之间的相互作用

五氯酚、威百亩等有机农药和含铜、锌等无机农药皆被用作通用杀虫剂或材料保护剂, 两者在许多农田和木材保护处理场所附近的土壤和水体以及在普通人群的体液和组织中, 均发现同时共存. 虽然关于五氯酚、威百亩等有机农药和含铜、锌等无机农药各自的毒性研究很多, 但是两者的复合毒性却鲜有报道.

3.1 PCP/含铜化合物在细菌模型中的协同细胞毒性

为了研究 PCP 和含铜化合物之间的复合毒性, 我们首先采用大肠杆菌作为模型生物, 通过生长抑制和克隆形成能力实验, 考察了它们之间是否产生协同毒性. 我们发现, 在大肠杆菌模型中, PCP 和硫酸铜在单独使用均无毒性的浓度下, 同时使用时则体现了协同的毒性作用. PCP/Cu 导致的毒性不仅依赖于络合剂/铜的比例还取决于络合剂的性质. 在络

合剂/铜的摩尔比在 0.5~2 之间时, PCP/Cu 导致的毒性可显著地被一些亲脂性的金属络合剂如邻菲罗啉(1,10-phenanthroline, OP)和 8-羟基喹啉增强; 而亲水性的络合剂不能增强反而可起显著的保护作用^[56,57].

在众多的亲脂性络合剂中, OP 体现出最强的增强作用, 因此我们重点研究了 PCP 和 Cu(II)(OP)_2 络合物之间的相互作用. 我们发现 PCP 和 Cu(OP)_2 同时存在时对大肠杆菌可产生比 PCP/Cu 组合更强的协同毒性作用. 同样, 其他的一些多氯酚和带正电荷的铜的络合物也显示出类似的协同毒性作用. 与此形成鲜明对比的是, PCP 和带负电荷的铜的络合物如 Cu(II)(BPS)_2 (BPS: bathophenanthrolinedisulfonate)并未表现出协同作用. 需要特别指出的是, Cu(II)(OP)_2 与 Cu(II)(BPS)_2 的化学结构十分相似, 只是所带净电荷数不同: Cu(II)(OP)_2 带两个正电荷, 而 Cu(II)(BPS)_2 带两个负电荷^[56-59].

3.2 Cu(II)(OP)_2 和 PCP 之间形成三元络合物的光谱学证据

利用紫外-可见和电子自旋共振光谱仪对 PCP 和 Cu(OP)_2 之间的相互作用进行研究, 发现 Cu(II)(OP)_2 和 PCP 同时存在时, 紫外-可见光谱图中有一个新的吸收峰形成; 相应地, 也发现了一个新的 ESR 信号. 光谱学数据表明, 两者同时存在的时候形成了一种新的三元络合物^[58]. 而添加 EDTA、麦角硫因、二氢硫辛酸和其他可与铜较强结合的络合剂时会导致此三元络合物的消失.

3.3 三元络合物在有机相和水相中的分布

Cu(II)(OP)_2 和 PCP 之间的相互作用可进一步通过检测在有机相和水相中的分布来考察. 我们发现单独的带正电荷的 Cu(II)(OP)_2 复合物不会分布到有机相中. 然而, 有 PCP 存在时, Cu(II)(OP)_2 就非常容易地转移到有机相中, 主要是以 PCP 和 Cu(II)(OP)_2 形成的三元络合物的形式. 该三元络合物在有机相中的最大吸收峰是 490 nm. 此中性三元络合物比 Cu(II)(OP)_2 阳离子更具有亲脂性. 由于 PCP 属一元弱酸, 因此两者形成的三元络合物组成可能是 $[\text{PCP}]_2[\text{Cu(II)(OP)}_2]$. 亲脂性的三元络合物的形成可增强其转移至有机相的几率, 从而也将增加有机相中铜的含量. 该推论由相分布实验得到了证实. PCP 和 Cu(II)(OP)_2 同时存在时比 Cu(II)(OP)_2 单独存

在时进入正辛醇相的铜的量大大增加: 没有 PCP 时, 只有少于 1% 的铜进入正辛醇相, 而在 PCP 存在时有 97% 的铜离子进入到正辛醇相. 因此, 亲脂性三元络合物的形成很可能是将铜转移至有机相的动力, 也促进了细胞对铜离子和 PCP 的吸收和累积^[58]. 以上现象不仅局限于 PCP 和 Cu(II)(OP)_2 , PCP 与 Fe(III)-(OP)_3 也有类似的作用^[60].

最近, 我们发现威百亩不仅与微量铜离子作用可产生协同毒性, 而且与微量锌离子作用也可产生协同毒性. 其协同毒性作用机制也是由于形成了亲脂性威百亩金属加合物, 促进了细胞对金属离子和威百亩的吸收和累积.

综上所述, 此类有机和无机污染物之间的相互作用和亲脂性加合物形成而导致的协同毒性作用, 可能是普遍存在于有机和无机污染物之间的一种共同毒性作用机制. 这一假设是否成立, 尚有待进行进一步的实验和理论研究. 另外, 目前尚不知上述发现的细胞内分子作用机理如何(图 2), 是否适用于哺乳动物细胞, 是否能在哺乳动物上重现?

我们推测, 如图 2 所示, 在细胞外, 亲水性的铜-1,10-邻菲罗啉络合物 Cu(II)-OP_2 (在此作为一个典型的含铜化合物代表, 带两个正电荷) 和五氯酚 PCP (在此作为一个典型的有机农药代表, 带一个负电荷) 反应形成了亲脂性的三元加合物 $(\text{PCP})_2\text{Cu(II)OP}_2$ (反应 (1)); 由于该加合物具有亲脂性的特性, 所以可以穿过细胞膜 (2). 在细胞内, 该三元加合物 $(\text{PCP})_2$ -

Cu(II)OP_2 有可能解离形成五氯酚和二价 Cu(II)OP_2 络合物. Cu(II)OP_2 可与蛋白、核酸和脂质等细胞内的配体 (CL) 形成新的三元加合物 CL-Cu(II)-OP (3). 这样在所形成的二价铜离子的加合物 CL-Cu(II)-OP 和一价铜离子加合物 CL-Cu(I)-OP 之间的氧化还原过程可以消耗细胞内的还原剂如抗坏血酸和还原型谷胱甘肽, 亦可氧化含巯基的蛋白, 使其变性或失活, 同时能生成超氧阴离子自由基和过氧化氢等活性氧物种 (ROS) (4). 这些活性氧物种然后再进一步在铜离子的结合位点上或位点附近产生活性更强的羟基自由基, 从而造成关键的细胞靶点被破坏 (5), 最后导致细胞死亡 (6). 在肝细胞内解离形成的五氯酚 PCP 则可被微酶体的细胞色素 P450 氧化脱氯形成四氯氢醌 (TCHQ) (i). TCHQ 还可进一步由四氯半醌自由基 (TCSQ $\cdot$) (ii) 氧化成四氯苯醌 (TCBQ) (iii). 这三种醌类结构的化合物可发生氧化还原反应, 该过程亦可产生大量的活性氧, 导致进一步的氧化应激反应 (ii 和 iii). 该过程可进一步与铜离子的氧化还原过程产生协同作用. 另外, 四氯半醌自由基 (TCSQ $\cdot$) (iv) 和四氯苯醌 (TCBQ) (v) 也可能与蛋白、核酸和脂质等细胞内靶点发生共价结合形成相应加合物, 造成关键的细胞靶点被破坏, 最后导致细胞死亡 (vi). 除以上途径外, 亲脂性的三元加合物 $(\text{PCP})_2\text{Cu(II)OP}_2$ 也可穿过线粒体膜进入线粒体, 从而导致线粒体的破坏 (I), 最后导致细胞死亡 (II). 上述各途径有可能产生协同作用, 从而导致协同细胞毒性作用.

图 2 有待验证的五氯酚和含铜化合物协同细胞毒性的作用机理示意图

此类复合环境污染协同毒性作用机理的研究不仅可了解五氯酚、威百亩等有机农药和含铜、锌等无机农药的协同毒性作用机制,而且为研究其他相关的有机(如溴代阻燃剂 3,3',5,5'-四溴双酚 A, 羟基吡啶硫酮及 8-羟基喹啉类物质)和无机(其他金属离子如铬、锰、铁、钴、镍和镉)环境污染可能的协同毒

性的测试、生物效应标记及健康评价提供一定的基础. 同时它也可为我国环境保护、食品安全及农药安全评价提供重要的科学依据,并可能对患有阿尔茨海默氏病、Wilson 氏病、自发性铜中毒病和印第安儿童肝硬变病等由铜、锌过量造成疾病的患者和使用含铜避孕装置的人有特别的意义.

参考文献

- 1 IARC. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Occupational exposures in insecticide application, and some pesticides. Pentachlorophenol, 1991, 53: 371-402
- 2 Zhu B Z, Shan G Q. Potential mechanism for pentachlorophenol-induced carcinogenicity: A novel mechanism for metal-independent production of hydroxyl radicals. *Chem Res Toxicol*, 2009, 22: 969-977
- 3 朱本占. 新型羟基自由基产生分子机理的研究: 五氯酚的可能致癌机制. *科学通报*, 2009, 54: 1673-1680
- 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
- 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
- 6 Renner G, Mucke W. Transformations of pentachlorophenol. Part I: Metabolism in animals and man. *Toxicol Environ Chem*, 1986, 11: 9-29
- 7 Halliwell B, Gutteridge J M C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Oxford University Press, 2007
- 8 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
- 9 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
- 10 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
- 11 Jia S, Zhu B Z, Guo L H. Detection and mechanistic investigation of halogenated benzoquinone induced DNA damage by photoelectrochemical DNA sensor. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 397: 2395-2400
- 12 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
- 13 Zhu B Z, Shan G Q, Huang C H, et al. Metal-independent decomposition of hydroperoxides by halogenated quinones: Detection and identification of a quinone ketoxy radical. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 11466-11471
- 14 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
- 15 Dahlhaus M, Almstadt E, Henachke P, et al. Oxidative DNA lesions in V79 cells mediated by pentachlorophenol metabolites. *Arch Toxicol*, 1996, 70: 457-460
- 16 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
- 17 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
- 18 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
- 19 Jansson K, Jansson V. Induction of micronuclei in V79 Chinese hamster cells by tetrachlorohydroquinone, a metabolite of pentachlorophenol. *Mutat Res*, 1992, 279: 205-208
- 20 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. *Mutation Res*, 1995, 329: 29-36
- 21 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

- 22 Thorn G D, Ludwig R A. The Dithiocarbamates and Related Compounds. Amsterdam: Elsevier Publishing Co., 1962
- 23 Environmental Health Criteria. World Health Organization, Vammal, 1988
- 24 Anonymous. Some carbamates, thiocarbamates, and carbazides. IARC Monogr, 1976, 12: 1–282
- 25 Pruett S B, Myers L P, Keil D E. Toxicology of metam sodium. J Toxicol Environ Health B Crit Rev, 2001, 4: 207–222
- 26 Anonymous. Methyl Isothiocyanate (MITC)—Wood Preservative. U.S. Environmental Protection Agency, 1998. www.epa.gov/pesticides/citizens/methylf.htm.
- 27 Anonymous. Quantities of Most Commonly Used Conventional Pesticides in U.S. Agricultural Crop Production. U.S. Environmental Protection Agency, 1999. www.epa.gov/oppbead1/95pestsales/Tables/Table8LJ.htm.
- 28 Tilton F, La Du J K, Tanguay R L. Sulfhydryl systems are a critical factor in the zebrafish developmental toxicity of the dithiocarbamate sodium metam (NaM). Aquat Toxicol, 2008, 90: 121–127
- 29 Tilton F, Tanguay R L. Exposure to sodium metam during zebrafish somitogenesis results in early transcriptional indicators of the ensuing neuronal and muscular dysfunction. Toxicol Sci, 2008, 106: 103–112
- 30 Haendel M A, Tilton F, Bailey G S, et al. Developmental toxicity of the dithiocarbamate pesticide sodium metam in zebrafish. Toxicol Sci, 2004, 81: 390–400
- 31 Meco G, Bonifati V, Vanacore N, et al. Parkinsonism after chronic exposure to the fungicide maneb (manganese ethylene-bis-dithiocarbamate). Scand J Work Environ Health, 1994, 20: 301–305
- 32 Zhou Y, Shie F S, Piccardo P, et al. Proteasomal inhibition induced by manganese ethylene-bis-dithiocarbamate: Relevance to Parkinson's disease. Neurosci, 2004, 128: 281–291
- 33 Chou A P, Maidment N, Klintonberg R, et al. Ziram causes dopaminergic cell damage by inhibiting E1 ligase of the proteasome. J Biol Chem, 2008, 283: 34696–34703
- 34 Allain P, Krari N. Diethyldithiocarbamate and brain copper. Res Commun Chem Patho Pharmacol, 1993, 80: 105–112
- 35 Tonkin E G, Valentine H L, Milatovic D M, et al. *N,N*-diethyldithiocarbamate produces copper accumulation, lipid peroxidation, and myelin injury in rat peripheral nerve. Toxicol Sci, 2004, 81: 160–171
- 36 Calviello G, Filippi G M, Toesca A, et al. Repeated exposure to pyrrolidine-dithiocarbamate induces peripheral nerve alterations in rats. Toxicol Lett, 2005, 158: 61–71
- 37 Valentine H L, Amarnath K, Amarnath V, et al. Dietary copper enhances the peripheral myelinopathy produced by oral pyrrolidine dithiocarbamate. Toxicol Sci, 2006, 89: 485–494
- 38 Chen S H, Liu S H, Liang Y C, et al. Death signaling pathway induced by pyrrolidine dithiocarbamate-Cu²⁺ complex in the cultured rat cortical astrocytes. Glia, 2000, 31: 249–261
- 39 Kim C H, Kim J H, Xu J, et al. Pyrrolidine dithiocarbamate induces bovine cerebral endothelial cell death by increasing the intracellular zinc level. J Neurochem, 1999, 72: 1586–1592
- 40 Chung K C, Park J H, Kim C H, et al. Novel biphasic effect of pyrrolidine dithiocarbamate on neuronal cell viability is mediated by the differential regulation of intracellular zinc and copper ion levels, NF-B, and MAP kinases. J Neurosci Res, 2000, 59: 117–125
- 41 Koo D, Goldman L, Baron R. Irritant dermatitis among workers cleaning up a pesticide spill: California 1991. Am J Ind Med, 1995, 27: 545–553
- 42 Schultz T P, Nicholas D D. A brief overview of non-arsenical wood preservative systems. In: Goodell B, Nicholas D D, Schultz T P, eds. Wood Deterioration and Preservation: Advances in Our Changing World. ACS Symposium Series. Washington, DC: American Chemical Society, 2003. 420–432
- 43 Fields S. Caution-children at play: How dangerous is CCA? Environ Health Perspect, 2001, 109: A262–A269
- 44 Kluger J. Toxic playgrounds. Time Magazine, 2001, 158: 48–49
- 45 Anonymous. American Wood Preservers' Association Standards 2001. Cranbury, TX: American Wood Preserver's Association, 2001
- 46 Schultz T P, Nicholas D D. Development of environmentally-benign wood preservatives based on the combination of organic biocides with antioxidants and metal chelators. Phytochemistry, 2002, 61: 555–560
- 47 Bush A I. Drug development based on the metals hypothesis of Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis, 2008, 15: 223–240
- 48 Ozcelik D, Ozaras R, Gurel Z, et al. Copper-mediated oxidative stress in rat liver. Biol Trace Elem Res, 2004, 96: 209–216
- 49 Pourahmad J, O'Brien P J. A comparison of hepatocyte cytotoxic mechanisms for Cu²⁺ and Cd²⁺. Toxicology, 2000, 143: 263–273
- 50 Rimmer D A, Johnson P D, Bradley S D. Determination of organo-zinc based fungicides in timber treatments employing gas chromatographic analysis with mass selective detection and/or inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy. J Chromatogr A, 2001, 928: 209–216
- 51 Vermeulen L A, Reinecke A J, Reinecke S A. Evaluation of the fungicide manganese-zinc ethylene bis(dithiocarbamate) (mancozeb) for sublethal and acute toxicity to *Eisenia fetida* (Oligochaeta). Ecotoxicol Environ Saf, 2001, 48: 183–189

- 52 Nebbia C, Dacasto M, Soffietti M G, et al. Inhibition of hepatic xenobiotic metabolism and of glutathione-dependent enzyme activities by zinc ethylene-bis-dithiocarbamate in the rabbit. *Pharmacol Toxicol*, 1993, 73: 233–239
- 53 Cai L, Li X K, Song Y, et al. Essentiality, toxicology and chelation therapy of zinc and copper. *Curr Med Chem*, 2005, 12: 2753–2763
- 54 Grunnet K S, Dahllöf I. Environmental fate of the antifouling compound zinc pyrithione in seawater. *Environ Toxicol Chem*, 2005, 24: 3001–3006
- 55 Fosmire G J. Zinc toxicity. *Am J Clin Nutr*, 1990, 51: 225–227
- 56 Zhu B Z, Shechtman S, Chevion M. Synergistic cytotoxicity between pentachlorophenol and copper in a bacterial model. *Chemosphere*, 2001, 45: 463–470
- 57 Zhu B Z, Chevion M. Copper-mediated toxicity of 2,4,5-trichlorophenol: Biphasic effect of neocuproine, a copper(I)-specific chelator. *Arch Biochem Biophys*, 2000, 80: 267–273
- 58 Zhu B Z, Chevion M. Mechanism of synergistic toxicity of pentachlorophenol and copper(II)-1,10-phenanthroline complexes: The formation of lipophilic ternary complexes. *Chem-Biol Interaction*, 2000, 129: 249–261
- 59 Zhu B Z. Lethal interaction and formation of lipophilic ternary complex between 2,4,5-trichlorophenol and Cu(II)-bis(1,10-phenanthroline) complex. *Chem Res Toxicol*, 2001, 14: 222–227
- 60 Levy S, Shechtman S, Zhu B Z, et al. Synergism between the toxicity of chlorophenols and iron complexes. *Environ Toxicol Chem*, 2007, 26: 218–224

Mechanism of synergistic toxicity between organic pesticides and copper/zinc-containing inorganic pesticides

ZHU BenZhan, FAN RuiMei & SHENG ZhiGuo

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

Current knowledge on the toxicity of chemicals comes primarily from studies conducted on individual chemicals at relatively high concentrations. However, throughout their lifetimes, people are more commonly exposed to a range of chemicals at low concentrations. From a public health perspective, a major concern is whether toxicity could result from the interaction of two or more chemicals. Both organic pesticides (such as pentachlorophenol and metam sodium) and copper- and zinc-containing inorganic compounds are used as general biocides and wood preservatives. They are commonly found together in the soil and ground water near the wood-preserving and wood-disposing facilities, and in bodily fluids and human tissue. Recently, we have found that combinations of pentachlorophenol and copper, each at non-toxic concentrations, resulted in an enhanced cytotoxic effect, via a synergistic mechanism, in a bacterial model. Similar synergistic effects were observed with metam sodium and copper or zinc. This synergism, observed for organic and inorganic biocides, was found to be related to the formation of lipophilic complexes, which facilitate metal transport into bacterial cells. We propose that interactions between organic and inorganic biocides, and the formation of lipophilic complexes, that lead to a synergistic toxicity, may serve as a new mechanism for toxicity. This hypothesis needs to be further investigated, both experimentally and theoretically.

synergistic toxicity, lipophilic complexes, pentachlorophenol, metam sodium, copper- and zinc-containing biocides

doi: 10.1360/972011-507