

甲基重氮烷阳离子(CH_3N_2^+)与 DNA 碱基的甲基化反应

李澜^{①*}, 瞿志豪^①, 王竑^①, 李宗和^{②*}

① 上海应用技术学院, 上海 200235;

② 北京师范大学化学学院, 北京 100875

* 联系人, E-mail: lilansit@yahoo.com.cn, lizonghe@eyou.com

收稿日期: 2007-08-20; 接受日期: 2008-06-19

上海市教育委员会(批准号: yyy-07015)资助项目

摘要 在 B3LYP/6-31G**和 MP2/6-311G**水平上, 计算了终致癌物甲基重氮烷阳离子(CH_3N_2^+)在气相和水溶剂中与四种 DNA 碱基上 10 个亲核位发生甲基化过程的反应机理. 结果表明: 在气相和溶剂中, 终致癌物 CH_3N_2^+ 对碱基上相应亲核位的甲基化反应过程, 活化能都比较小(<33.5 kJ/mol), 是容易进行的放热反应. 所以, 二甲基亚硝酸胺一旦形成终致癌物, 则很容易与碱基形成癌变物.

关键词

CH_3N_2^+

碱基

甲基化

1 引言

亚硝酸胺类化合物是广泛地存在于食品和药物中的一类化学致癌物. 在生物酶的作用下经过一系列代谢过程会形成重氮烷阳离子, 如二甲基亚硝酸胺会形成终致癌物甲基重氮烷阳离子(CH_3N_2^+)^[1], 吡咯烷亚硝酸胺代谢为终致癌物重氮氢氧化物、重氮烷阳离子和氧鎓离子^[2], 它们本质上都是亲电的阳离子, 与生物体作用的主要部位是生物分子中的负电荷中心, 如碱基上的亲核位置^[3], 作用结果形成稳定的烷基取代物(癌变物), 使遗传信息发生改变, 最终导致生物体发生癌变.

Singer和Grunberger^[4]对核酸烷基化过程的实验进行了总结, 认为大多数亚硝酸胺类化合物的致癌性与其代谢产物对DNA碱基的烷基化有关. 而且, 生物体内DNA碱基上不同亲核位烷基化百分比的实验结果表明: 鸟嘌呤的N7位是首要的烷基化位置, O11位也可以形成烷基化产物, 且O11位的烷基化会导

致大的致癌性. 实验^[3,5,6]也报道了重氮烷阳离子或羟基重氮烷离子对碱基亲核位烷基化的过程. 理论上关于重氮烷阳离子烷基化DNA碱基的工作也有很多报道, 如Vincent和Radom^[7]用*ab initio*方法研究了脂肪族和芳香族重氮烷离子与碱基的烷基化反应, Reynolds和Thomson^[8]用同样的方法对二乙基亚硝酸胺可能形成的致癌物进行计算, 他们都认为, 亚硝酸胺类化合物的致癌性主要归因于所形成的重氮烷阳离子对DNA碱基分子的烷基化过程; Mohammad和Hopfinger^[9]曾用MINDO/3和CNDO/2这两类从头计算方法, 研究了重氮烷阳离子与碱基的化学反应, 预期鸟嘌呤N7或O11位是最具有反应活性的烷基化位置; Kism和Lebreton^[10]用MNDO方法, 在RHF/4-31G级别上计算了DNA甲基化的 π 极化效应. 认为在DNA的甲基化模型化过程中, 核苷的 π 极化效应有非常重要的决定性作用; Pullman和Armbruster^[11]曾在气相下研究了胞嘧啶N3和O7位上甲基化的

趋向问题. 以上大多数的理论计算都是基于半经验级别上, 且没有考虑到反应条件的影响. 众所周知, 类似重氮烷基这样的阳离子在气相下极不稳定, 其理论计算的势能面与实际势能面相差甚远, 必须考虑溶剂化效应, 才能给出更接近实际反应的结果. 在文献[12]中, 我们曾详细讨论了由二甲基亚硝胺(NDMA)代谢为终致癌物甲基重氮烷阳离子(CH_3N_2^+)的整个过程. 作为对NDMA致癌性的后续研究, 并基于以上实验和理论背景, 本文讨论 CH_3N_2^+ 与碱基上不同亲核位进行甲基化反应的机理、能量性质, 并给出了各甲基化通道的反应活性, 所有的反应都考虑了溶剂化效应.

2 计算方法

应用Gaussian03 量子化学程序包, 采用密度泛函DFT中的B3LYP[13,14]方法, 在 6-31G** 基组下对所有甲基化反应涉及的反应物、复合物、过渡态、产物进行了几何构型优化的计算. 并用MP2[15-17]方法和 6-311G** 基组, 对B3LYP方法得到的所有能量驻点作了进一步更可靠的几何结构优化计算, 所有的能量驻点都作了频率分析. 为了考虑溶剂对反应的影响, 选择连续介质模型(PCM)[18-25] (计算水平: B3LYP/6-31G**), 在水溶剂(介电常数 $\epsilon = 78.39$, 298.15K)的条件下, 对反应途径上的各驻点做了优化及频率分析. 对于过渡态, 在振动频率分析的基础上, 根据Fukui的IRC理论[26,27], 在同样的方法和基组下分别从过渡态的唯一虚振动模式的正方向和反方向出发, 用Morokuma的数值方法[28]计算了内禀反应坐标IRC势能曲线, 讨论了各类碱基不同亲核位上甲基化的反应机理, 所有的工作都是在PIV-2G微机上完成的.

3 结果与讨论

3.1 四种碱基上的亲核位

四种 DNA 碱基的基本骨架见图 1, 图上标出了各元素的相对位置. 考虑碱基上各原子的 Mulliken 电荷分布的计算结果, 并结合实验中所得到的烷基化产物[4], 判断出DNA碱基上可能的 10 个亲核位分别是(如图 1 所示): 腺嘌呤(adenine)上 N1, N3, 和 N7 位; 鸟嘌呤(guanine)上 N3, N7 和 O11 位; 胞嘧啶(cytosine)上 N3 和 O7 位; 胸腺嘧啶(thymine)上 O7 和

O8 位.

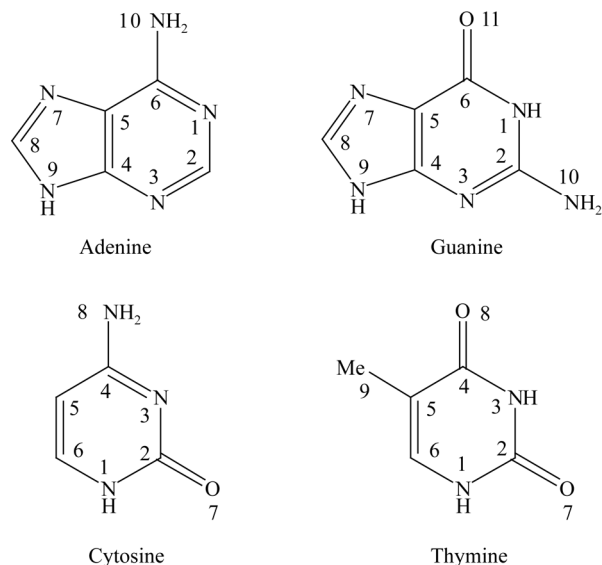
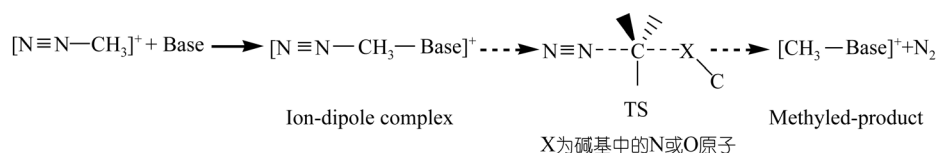


图 1 四种碱基的构型

3.2 碱基甲基化反应各驻点的结构性性质

甲基重氮烷阳离子(CH_3N_2^+)与四种碱基上 10 个亲核位的甲基化反应全部遵循 $\text{S}_{\text{N}}2$ 反应机理. 图 2 给出了此甲基化反应过程的示意图. 其过程为 CH_3N_2^+ 与碱基先形成离子-偶极复合物(ion-dipole complex), 离子-偶极复合物经中心 C 原子为 sp^2 杂化, 形成平面型的 CH_3 -的过渡态(TS, 见示意图 2), 并从其背面脱去一分子 N_2 , 最后形成稳定的甲基化产物. 在反应中, 认为离子-偶极复合物和过渡态上甲基组取向和甲基化产物中的取向一致, 所以反应过程的构型计算保持 C_s 对称性. 并且, 在 B3LYP/6-31G** 基础上, 更高级别的 MP2/6-311G** 计算过程, 其结果不改变甲基化反应的机理.

以考虑溶剂化效应(B3LYP/6-31G** 计算水平)的计算结果为例, 表 1 给出了水溶剂中甲基化反应所形成的离子-偶极复合物和过渡态的重要的键参数(分别是 N-C(Me) 的距离和 C (Me)-Site 的距离), 并标出了各过渡态的唯一虚频. 由表 1 可以看出, 离子-偶极复合物中, 碱基 N 亲核位上, C(Me)-Site 的距离在 2.85~3.10Å 之间, 对 O 亲核位, C(Me)-Site 间的距离

图 2 CH_3N_2^+ 与碱基甲基化的反应过程示意图表 1 水溶剂中形成的离子-偶极复合物和过渡态的反应键参数及过渡态的频率(B3LYP/6-31G**, 键长: Å, 虚频: cm^{-1})

碱基	亲核位	离子-偶极复合物		过渡态		
		N-C(Me)	C (Me)-Site	N-C(Me)	N-C(Me)	虚频
腺嘌呤	N1	3.01476	1.44623	2.39505	1.70130	469.158 <i>i</i>
	N3	2.86199	1.45976	2.38211	1.70220	467.326 <i>i</i>
	N7	3.07509	1.43182	2.36343	1.71878	473.585 <i>i</i>
鸟嘌呤	N3	3.05712	1.44549	2.35766	1.74363	492.580 <i>i</i>
	N7	2.90940	1.44338	2.36229	1.70576	467.152 <i>i</i>
	O11	2.83016	1.44021	2.24234	1.74705	482.407 <i>i</i>
胞嘧啶	N3	3.05108	1.42932	2.38352	1.71778	475.880 <i>i</i>
	O7	2.76354	1.44255	2.26767	1.70114	483.500 <i>i</i>
	O7	2.65669	1.45176	2.17764	1.79905	486.318 <i>i</i>
胸腺嘧啶	O7	2.65669	1.45176	2.17764	1.79905	486.318 <i>i</i>
	O8	2.86712	1.43947	2.18461	1.78560	485.460 <i>i</i>

在 2.65~2.85 Å 的范围内. 过渡态 TS 中, N 亲核位上 C(Me)-Site 的距离基本相同, 变化范围在 2.35~2.40 Å, O 亲核位上 C(Me)-Site 间的距离在 2.17~2.27 Å 之间. 对过渡态(见表 1)和离子-偶极复合物的频率计算结果表明, 三种计算级别下, 各过渡态有唯一的虚频, 所有中间体(离子-偶极复合物)有全为正的频率.

3.3 碱基甲基化反应的能量性质

为了说明 CH_3N_2^+ 对碱基甲基化反应的能量性质, 以腺嘌呤为例, 图 3 给出了其不同亲核位甲基化反应的势能剖面示意图(水溶剂中, 单位: kJ/mol). 并定义: 产物与反应物的相对能量差值为反应能 ΔE ; 离子-偶极复合物与反应物的相对能量差值定义为稳定化能(记作 ΔE_{comp}), 表示碱基亲核位俘获阳离子的能力; ΔE_{TS} 代表反应的活化能, 是过渡态和离子-偶极复合物的相对能量差. 其他碱基甲基化反应势能面示意图类似图 3, 不再重复列出. 由图 3 可以看出, 腺嘌呤的三个亲核位的甲基化过程均有较大的反应能 ΔE . 在表 2 中给出了考虑溶剂化效应时, 各碱基甲基化过程得到的相应 ΔE_{comp} 、 ΔE_{TS} 和 ΔE 的相对值. 结合在气相和溶剂中计算的结果(两种方法和基组下),

CH_3N_2^+ 对所有亲核位的甲基化反应都有相对大的反应能 ΔE , 表明此烷基化是容易进行的放热反应. 而且, 值得指出的是, 在气相条件下的反应能比水溶剂中更大. 应用表 2 的能量性质, 对碱基上亲核位的烷基化能力进一步分析. 气相和水溶剂下的计算结果表明: 鸟嘌呤 N7 位和 O11 位上的 ΔE_{comp} 值相接近(气相 B3LYP 方法: -158.07 和 -161.48 kJ/mol; 气相 MP2 方法: -153.65 和 -152.63 kJ/mol. 水溶剂: -40.13 和 -39.79 kJ/mol), 说明鸟嘌呤 N7 位和 O11 位俘获阳离子的能力相似. 在气相和水溶剂中, N7 位和 O11 位上活化能 ΔE_{TS} (气相 B3LYP 方法: 12.19 和 15.60 kJ/mol; 气相 MP2 方法: 12.50 和 13.10 kJ/mol. 水溶剂: 17.56 和 20.07 kJ/mol) 也接近. 鸟嘌呤上 N7 和 O11 位的 ΔE_{comp} 和 ΔE_{TS} 值分析说明, 这两个亲核位俘获阳离子能力和甲基化反应活性相似. 而且, 大的稳定化能和相对小的活化能, 也表明鸟嘌呤 N7 和 O11 位是容易被烷基化的亲核位, 与其烷基化百分比实验结果一致. 在表 2 中, 胞嘧啶 N3 位的 ΔE_{comp} (气相 B3LYP 方法: -158.33 kJ/mol; 气相 MP2 方法: -143.95 kJ/mol; 水溶剂: -39.54 kJ/mol) 和 ΔE_{TS} 值(气相 B3LYP

方法: 31.86 kJ/mol; 气相 MP2 方法: 21.15 kJ/mol; 水溶剂: 22.90 kJ/mol)接近鸟嘌呤 O11 位上相应的稳定化能和活化能值, 但实验上给出胞嘧啶的甲基化能力比鸟嘌呤的要弱得多. 在腺嘌呤中, 三个亲核位 N1、N3 和 N7 都是嘧啶 N 原子, 预期有相似的反应活性. 由图 3 可以看出, 这三个亲核位的稳定化能值 ΔE_{comp} (气相 B3LYP 方法: -78.06 kJ/mol, -67.79 kJ/mol, -83.92 kJ/mol; 气相 MP2 方法: -86.15 kJ/mol, -68.70 kJ/mol, -85.44 kJ/mol; 水溶剂: -14.30 kJ/mol, -13.84 kJ/mol, -18.98 kJ/mol)相差不大, 与实验上得到三个亲核位烷基化产物的百分比接近的结果一致^[4]. 其中, N3 位具有最小的活化能 ΔE_{TS} (气相 B3LYP 方法: 2.06 kJ/mol; 气相 MP2 方法: 3.02 kJ/mol; 水溶剂: 13.97 kJ/mol). 另外, 溶剂化效应的计算结果表明: 所有的复合物都有相对大的溶剂化效应(从气相约 160 kJ/mol 到水溶剂中的 40 kJ/mol, 见表 2), 而对于过渡态, 溶剂化效应不是很明显(在 32 kJ/mol 以内, 见表 2). 结合计算过程, 我们认为: 在稳定的复合物中, 其分子中所形成氢键在水溶剂中被加强, 所以有明显的溶剂化效应. 对结构相对松散的过渡态, 气相和水溶剂分子内氢键的作用不是很明显, 导致过渡态中溶剂化效应相对较小.

由表 2 也说明: 在各碱基甲基化的不同反应通道上, 活化能 ΔE_{TS} 都比较小(气相 B3LYP 方法: <31.90

kJ/mol; 气相 MP2 方法: <30.50 kJ/mol; 溶剂中: <33.50 kJ/mol), 所有反应都有相对大的反应能 ΔE , 即 CH₃N₂⁺对碱基的甲基化过程属于容易进行的放热反应.

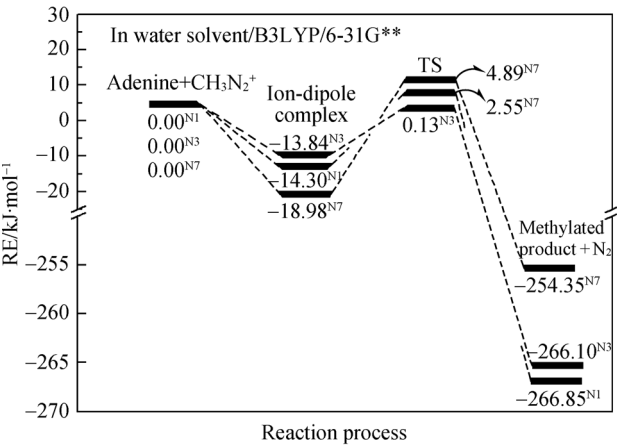


图 3 CH₃N₂⁺与腺嘌呤甲基化反应的势能面示意图(单位: kJ/mol)

以上分析表明: 当亚硝胺类化合物一旦形成亲电的终致癌物, 而生物分子中的负电荷中心又很丰富, 这就很容易使生物分子烷基化, 形成癌变物, 破坏生物体的遗传信息, 使机体产生癌变. 因此, 对亚硝胺类化合物引起的致癌, 应该在终致癌物形成之前采取阻断措施, 这有待进一步作相关的研究.

表 2 CH₃N₂⁺与碱基亲核位形成的离子-偶极复合物、过渡态、和甲基化产物的相对能(单位: kJ/mol)

碱基	亲核位	ΔE_{comp}			ΔE_{TS}			ΔE		
		气相中	气相/MP2	溶剂中	气相中	气相/MP2	溶剂中	气相中	气相/MP2	溶剂中
腺嘌呤	N1	-78.06	-86.15	-14.30	8.15	8.34	16.85	-351.19	-365.65	-266.85
	N3	-67.79	-68.70	-13.84	2.06	3.02	13.97	-349.67	-369.66	-266.10
	N7	-83.92	-85.44	-18.98	19.47	12.22	23.87	-323.18	-332.17	-254.35
鸟嘌呤	N3	-145.54	-172.69	-12.58	11.08	30.41	24.08	-289.73	-306.25	-233.70
	N7	-158.07	-153.65	-40.13	12.19	12.50	17.56	-324.75	-389.08	-280.85
	O11	-161.48	-152.63	-39.79	16.46	13.10	22.07	-380.26	-321.98	-210.55
胞嘧啶	N3	-158.33	-143.95	-39.54	31.86	21.15	22.90	-370.36	-386.87	-283.11
	O7	-143.99	-141.41	-36.78	3.69	4.09	15.50	-350.25	-357.58	-240.27
	O7	-73.85	-73.88	-16.05	15.57	19.27	29.22	-232.24	-238.22	-159.89
胸腺嘧啶	O8	-95.35	-77.27	-20.65	30.10	17.64	32.19	-237.17	-255.19	-165.24

4 结论

在 B3LYP/6-31G**和 MP2/6-311G**水平上, 计算了气相和水溶剂中 CH_3N_2^+ 阳离子与四种 DNA 碱基 10 个亲核位发生甲基化反应的机理. 结果表明: 鸟嘌呤 N7 位和 O11 位是容易被甲基化的亲核位, 与

实验结果相一致; 终致癌物 CH_3N_2^+ 阳离子对四种碱基的甲基化过程, 有较小的反应活化能, 是容易进行的放热反应. 综上所述, 亚硝胺化合物一旦形成亲电的终致癌物, 其很容易与 DNA 结合, 导致遗传信息改变.

参考文献

- Lee V M, Keefer L K, Archer M C. An evaluation of the roles of metabolic denitrosation and α -hydroxylation in the hepatotoxicity of N-nitrosodimethylamine. *Chem Res Toxicol*, 1996, 9(8): 1319—1324[DOI]
- Wang M Y, Pramod U, Trieu T D, Leo E B, Stephen S H. Lactols in hydrolysates of DNA treated with α -acetoxy-N-nitrosopyrrolidine or crotonaldehyde. *Chem Res Toxicol*, 1998, 11, 1567—1573[DOI]
- Miller J A, Miller E C. Ultimate Chemical Carcinogens as Reactive Mutagenic Electrophiles. In *origins of Human Cancer*, Book B, Gold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Press, 1977. 605—627
- Singer B, Grunberger D. *Molecular Biology of Mutagens and Carcinogens*. New York: Plenum Pres, 1983. 161—183
- Loeppky R N, Michejda C J. Nitrosamines and Related N-Nitroso Compounds Chemistry and Biochemistry, ACS Symposium Series, Vol. 553. Washington DC, 1994. 279—289
- Glaser R, Choy G S. Importance of the anisotropy of atoms in molecules for the representation of electron density distributions with Lewis structures. A case study of aliphatic diazonium ions. *J Am Chem Soc*, 1993, 115(6): 2340—2347[DOI]
- Vincent M A, Radom L. An *ab initio* study of the methane- and benzene-Diazonium ions. *J Am Chem Soc*, 1978, 100, 3306—3311[DOI]
- Reynolds C, Thomson C A. A theoretical study of N-nitrosamine metabolites: Possible alkylating species in carcinogenesis by N,N'-dimethyl nitrosamine. *Int J Quant Chem*, 1986, 30, 751—762[DOI]
- Mohammad S N, Hopfinger A J. Chemical reactivity of a methyl diazonium ion with nucleophilic centers of DNA bases. *J theor Biol*, 1980, 87(2): 401—419[DOI]
- Kism N S, Lebreton P R. UV photoelectron and *ab initio* quantum mechanical evaluation of nucleotide ionization potentials in water-counterion environments: π polarization effects on DNA alkylation by carcinogenic methylating agents. *J Am Chem Soc*, 1996, 118(15): 3694—3707[DOI]
- Pullman A, Armbruster A M. On the affinity of cytosine towards electrophiles. *Theor Chim Acta*, 1977, 45, 249—256[DOI]
- Li L, Zhang Aihua, Li Zonghe. Theoretical study of reaction mechanism for subsequent carcinogenic metabolites by nitrosodimethylamine. *J Mole Struct(Theochem)*, 2006, 759, 239—243
- Becke A D. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Phys Rev*, 1988, 38, 3098—3100[DOI]
- Lee C, Yang W, Parr R G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys Rev B*. 1988, 37, 785—789[DOI]
- Head-Gordon M, Pople J A, Frisch M J. MP2 energy evaluation by direct methods. *Chem Phys Lett*. 1988, 153(6): 503—509[DOI]
- Saebo S, Almlof J. Avoiding the integral storage bottleneck in LCAO calculations of electron correlation. *Chem Phys Lett*. 1989, 154(1): 83—89[DOI]
- Frisch M J, Head-Gordon M, Pople J A. A direct MP2 gradient method. *Chem Phys Lett*. 1990, 166(3): 275—280[DOI]
- Miertus S, Scrocco E, Tomaso J. Electrostatic interaction of a solute with a continuum. A direct utilization of *ab initio* molecular potentials for the prevision of solvent effects. *Chem Phys*, 1981, 55(1): 117—129[DOI]
- Miertus S, Tomaso J. Approximate evaluations of the electrostatic free energy and internal energy changes in solution processes. *Chem Phys*, 1982, 65(2): 239—245[DOI]
- Cossi M, Barone V, Cammi R, Tomasi J. *Ab initio* study of solvated molecules: a new implementation of the polarizable continuum model. *J Chem Phys Lett*, 1996, 255, 327—335[DOI]
- Cances M T, Mennucci V, Tomaso J. A new integral equation formalism for the polarizable continuum model: Theoretical back-

- ground and applications to isotropic and anisotropic dielectrics. J Chem Phys, 1997, 107(8): 3032—3041 [\[DOI\]](#)
- 22 Barone V, Cossi M, Tomaso J. A new definition of cavities for the computation of solvation free energies by the polarizable continuum model. J Chem Phys, 1997, 107(8): 3210—3221 [\[DOI\]](#)
- 23 Cossi M, Barone V, Tomaso J. *Ab initio* study of ionic solutions by a polarizable continuum dielectric model. J Chem Phys Lett, 1998, 286, 253—263 [\[DOI\]](#)
- 24 Barone V, Cossi M, Tomaso J. Geometry optimization of molecular structures in solution by the polarizable continuum model. J Comp Chem, 1998, 19(4): 404—417 [\[DOI\]](#)
- 25 Mennucci B, Mennucci B. Analytical derivatives for geometry optimization in solvation continuum models. I . Theory. J Chem Phys, 1998, 109(1): 249—259
- 26 Gonzalez C and Schlegel H B. An improved algorithm for reaction path following. J Chem Phys, 1989, 90(4): 2154—2159 [\[DOI\]](#)
- 27 Gonzalez C and Schlegel H B. Reaction path following in mass-weighted internal coordinates. J Phys Chem, 1990, 94(14): 5523—5527 [\[DOI\]](#)
- 28 Ishida K, Morokuma K, Komornichi A. The intrinsic reaction coordinate. An *ab initio* calculation for $\text{HNC} \rightarrow \text{HCN}$ and $\text{H}^+ + \text{CH}_4 \rightarrow \text{CH}_5^+$. J Chem Phys, 1977, 66 (5): 2153—2164 [\[DOI\]](#)