

• 研究论文 •

3,5-二甲基-亚硝基哌嗪代谢物对 DNA 烷化作用的理论研究

刘婷婷 赵丽娇* 钟儒刚

(北京工业大学生命科学与生物工程学院 北京 100022)

摘要 用从头计算法在 MP2/6-311+G(d,p)水平上对 3,5-二甲基-亚硝基哌嗪(DMNP)及其类似物经代谢生成 DNA 烷化剂的机理进行了研究. 探讨了 N'原子上取代基的变化对 DMNP 代谢物生成 α -位和 γ -位两个烷化中心的影响, 解释了两个烷化中心的生成活性与化合物的致癌性之间的关系. 结果表明, α -位和 γ -位代谢物越容易生成活泼亲电中间体, 其母体化合物的致癌活性越高. 但如果有一个烷化中心丧失活性, 就会明显减弱化合物的致癌活性. 因此, DMNP 类化合物的致癌性取决于其 α -位和 γ -位的协同烷化作用, 在评价 DMNP 的致癌强度时需同时考虑两个烷化中心的烷化能力以及二者之间的关系.

关键词 N-亚硝基哌嗪; 致癌机理; 烷化活性; 从头计算

Theoretical Studies on the Mechanism of DNA Alkylation by the Metabolites of 3,5-Dimethyl-1-nitrosopiperazine

Liu, Tingting Zhao, Lijiao* Zhong, Rugang

(College of Life Science & Bioengineering, Beijing University of Technology, Beijing 100022)

Abstract *Ab initio* computations were carried out at MP2/6-311+G(d,p) level to study the mechanism of the formation of DNA alkylation agents from the metabolism of 3,5-dimethyl-1-nitrosopiperazine (DMNP) and its derivatives. The influence of the substituent groups of the N' atom was investigated in the formation of the two alkylation centers on the α - and γ -positions of the DMNP metabolites. The relationship between the formational activities of the two active centers and the carcinogenic potency of the parent compounds was also explained. The results show that the parent compounds are inclined to exhibit higher carcinogenic activity when their α -position and γ -position metabolites are easier to produce the active electrophilic intermediates. However, if one alkylation center is blocked, the carcinogenic potency of the compounds is decreased obviously. Therefore, the carcinogenicity of DMNP was supposed to depend on the synergetic alkylation of the α - and the γ -positions. It is necessary to consider the alkylating activity of these two alkylation centers and the relationship between them in the appraisalment of the carcinogenicity of DMNP.

Keywords N-nitrosopiperazine; carcinogenic mechanism; alkylation activity; *ab initio*

亚硝基哌嗪是一类致癌性环状 N-亚硝基化合物 (N-nitroso compounds, NNCs), 能引发鼻腔、食道、肺、胃等器官的癌变^[1~4], 有关亚硝基哌嗪的致癌作用机理是分子毒理学、癌症防治、环境保护等领域中的热点问题. 亚硝基哌嗪是前体致癌剂, 经代谢活化后发挥其致

癌作用, 研究^[5~8]表明发生在 NNCs 碳链上的酶促氧化羟基化作用是其致癌性代谢活化的关键步骤, 侧链上的 α -位碳原子在混合功能氧化酶 P450 的作用下而氧化羟基化, 生成碳正离子导致 DNA 碱基的损伤^[9]. 但是, 该“ α -位单官能烷化”观点在定量解释 NNCs 的构效关系

* E-mail: zhaolijiao@bjut.edu.cn

Received March 13, 2008; revised September 26, 2008; accepted December 29, 2008.

国家自然科学基金(No. 20672011)、北京市自然科学基金(No. 8072006)和北京市属市管高等学校人才强教计划资助项目.

时却出现了问题, Lijinsky 等^[10]对 3,5-二甲基-亚硝基哌嗪(DMNP)的一系列衍生物的研究表明 N'原子上取代基的改变会导致其致癌活性的显著差异, 而这种现象在定性和定量两个方面均难以用单官能团烷化观点进行解释. 越来越多的实验证据^[11~14]表明非 α -位的代谢活化在亚硝胺致癌机理中具有不可忽视的作用. 本实验室曾以双区理论^[15]为基础, 对包括 60 种环状亚硝胺在内的 153 种 NNCs 的结构与致癌活性关系进行了定量模式辨认^[16], 提出 NNCs 诱发癌症的必要条件为代谢生成 α -位和非 α -位两个亲电活性中心从而导致 DNA 互补碱基交联的“双官能团烷化”观点. 此后采用从头算的方法对甲基亚硝基哌嗪类化合物的第二活性区与 DNA 碱基烷化的机理进行了研究^[17,18], 计算结果表明哌嗪环上 N 原子和 N'取代基上氧原子的邻基参与作用明显提高了 DMNP 类化合物代谢物的亲电反应活性, 证明了 DMNP 上代谢产生 γ -位亲电活性中心对致癌作用的重要性.

1 计算方法

DMNP 生成 α -位和 γ -位两个亲电活性中心的机理如图 1 所示: α -位碳原子在细胞色素 P450 的作用下氧化羟基化后, 经烷基重氮碱(alkyldiazonium bases)最终代谢生成的碳正离子为第一活性中心; γ -位碳原子在 P450 和磺酸转移酶的作用下生成磺酸酯, 然后在邻基参与作用下形成一个带正电荷的环状中间体为第二活性中心. 其中, α -羟基代谢物生成偶氮氢氧化物和 γ -磺酸酯代谢物生成环状中间体的过程(图 2)为形成双官能团亲电烷化中心的关键步骤. 采用 Møller-Pleset 微扰理论^[19]对 DMNP 及其四种类似物(图 3)的 α -位和 γ -位两个亲电中心生成的机理进行了研究, 在 MP2/6-311+G(d,p)水平上对其关键步骤中的所有反应物和中间体进行了全几何结构优化, 使用 QST3^[20]方法搜索反应过渡态; 在相同水平上计算各驻点的振动频率, 确认所得到的构型是无虚频的稳定点或具有一个虚频的过渡态; 计算内禀反应坐标(IRC)以确定过渡态是连接反应物和中间体的最

低能量途径. 所有计算均利用 Gaussian 03 程序包^[21]在 Intel SR870BH2 服务器上完成.

2 结果与讨论

计算得到的 DMNP 生成 α -位烷化中心反应关键步骤的过渡态的几何结构如图 4 所示, 其反应物、过渡态和中间体的主要结构参数列于表 1(其它四种化合物的 α -位反应过程与 DMNP 类似). 在反应过程中, 处于氢键作用距离范围内的质子 H(9)借助于氢键作用由 O(10)向 O(8)转移, 同时 O(8)逐渐与 O(10)接近; 当达到反应过度态时, 二者之间的距离为 0.242 nm, 此时 H(9)已经较为接近 O(8). 同时 O(8), H(9)和 O(10)三个原子接近于共直线, 并且与 N(7), N(1)和 C(2)原子近似共平面; N(1)和 C(2)原子的间距增加到 0.170 nm, 表现出 N—C 键断裂的趋势. 可以看出, 该步骤是一个“非同步的协同反应”^[22], 即质子转移和键 N(1)—C(2)的断裂是在同一个过程发生的, 但是质子转移涉及整个反应过程, 而键的断裂是在反应过程中的一个短阶段内完成的.

表 1 MP2/6-311+G(d,p)水平上计算得到的 DMNP 生成 α -位烷化中心反应关键步骤的反应物、过渡态(TS^a)和中间体的主要结构参数[键长: nm, 键角: (°)]

Table 1 Main structural parameters of the reactant, transition state (TS^a) and intermediate of DMNP on the key step of the formation of α -alkylation center obtained from MP2/6-311+G(d,p) calculations [bond length in nm, bond angle in (°)]

	Reactant	TS ^a	Intermediate
O(8)—O(10)	0.265	0.242	0.361
O(10)—H(9)	0.094	0.145	0.272
H(9)—O(8)	0.196	0.102	0.095
N(1)—C(2)	0.148	0.170	0.283
O(8)—H(9)—O(10)	127.6	156.2	155.8
O(8)—N(7)—N(1)—C(2)	-12.6	-1.3	-19.2
N(1)—N(7)—O(8)—H(9)	-7.4	3.4	2.5

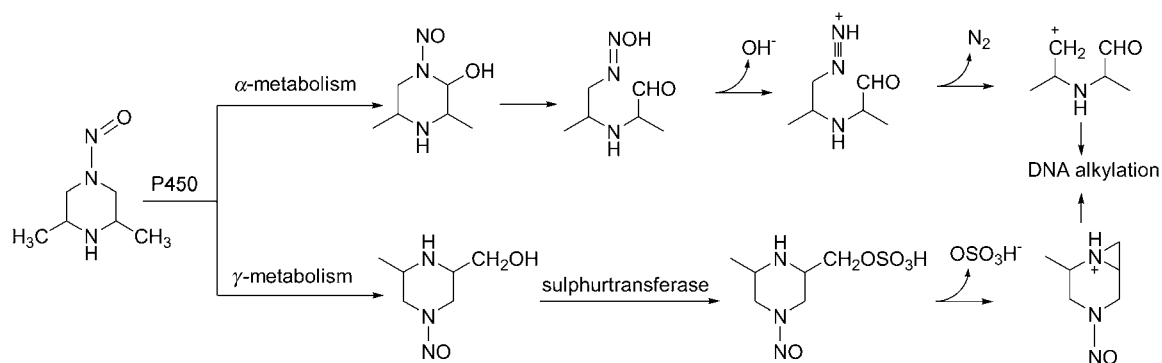


图 1 DMNP 生成 α -位和 γ -位烷化中心的反应机理

Figure 1 The mechanism for the formation of the α - and γ -position alkylation centers on DMNP

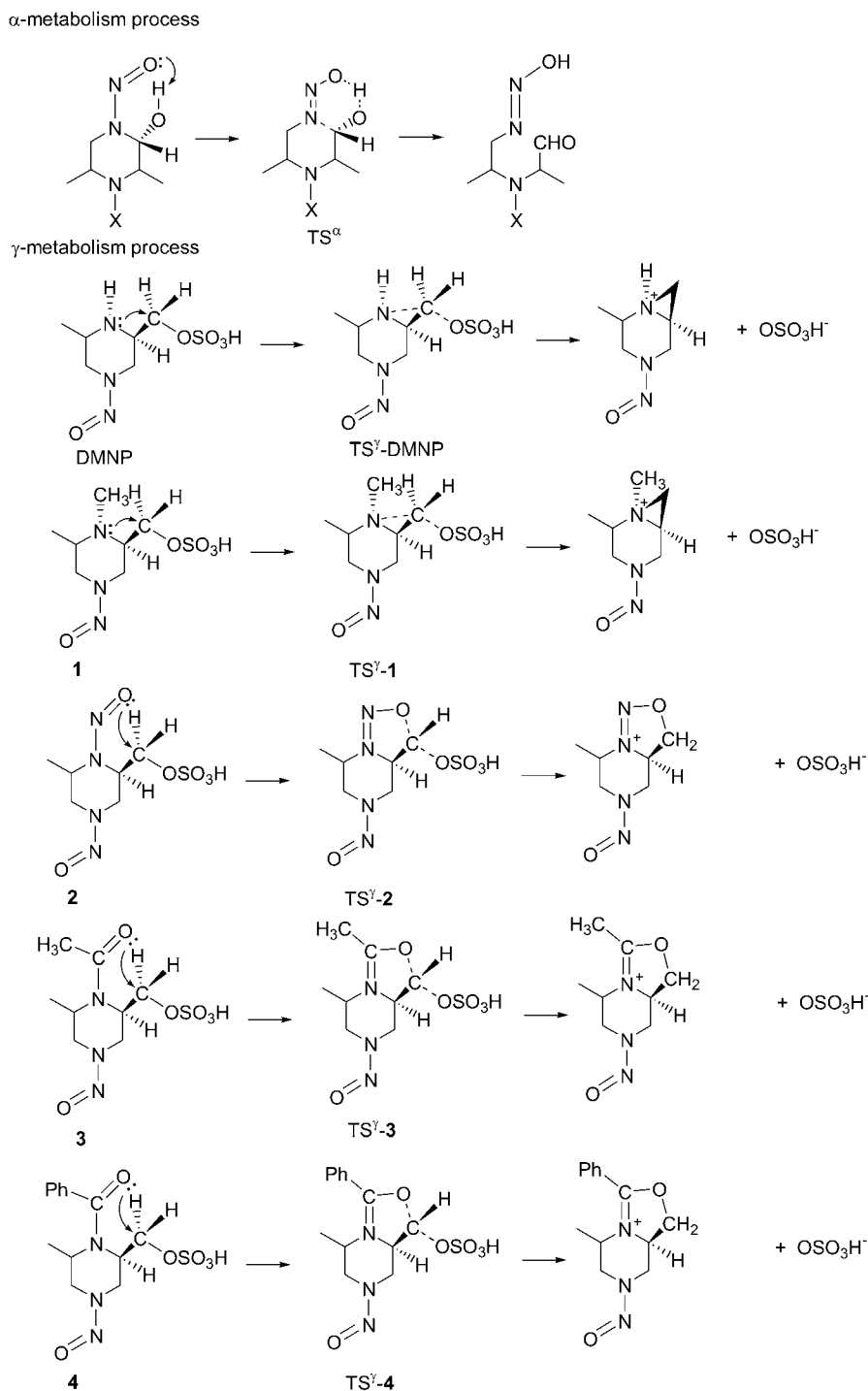


图 2 DMNP 代谢物生成 α -位和 γ -位烷化中心的反应机理

Figure 2 The mechanism of the formation of α - and γ -position alkylation centers on the metabolites of DMNP

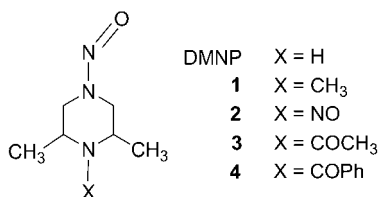


图 3 DMNP 及其衍生物的分子结构

Figure 3 The molecular structures of DMNP and its derivatives

五种化合物在邻基参与作用下生成 γ -位烷化中心反应关键步骤的过渡态的几何结构如图 5 所示, 其反应物、过渡态和中间体的主要结构参数列于表 2. 化合物 2~4 中, 哌嗪环上 N' 原子所连接的亚硝基(或羰基)上的氧原子处于邻近 γ -位甲基碳原子的位置, 有利于氧原子上的孤对电子进攻 γ -碳原子. 在邻基参与过程中, 氧原子逐渐接近碳原子, 同时硫酸根逐渐离去, 形成具有五元环结构的中间体. 以 TS ^{γ} -2 为例, O(16)—C(11)和

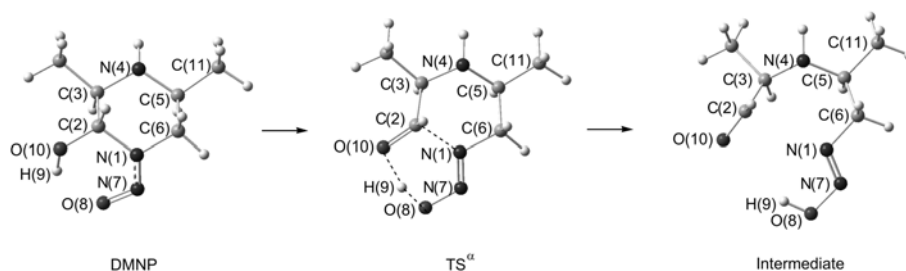


图4 MP2/6-311+G(d,p)水平上计算得到的 α -位烷化中心生成过程中的反应物、过渡态和中间体的分子结构

Figure 4 The molecular structures of the reactant, transition state and intermediate in the formation of α -position alkylation center obtained from MP2/6-311+G(d,p) calculations

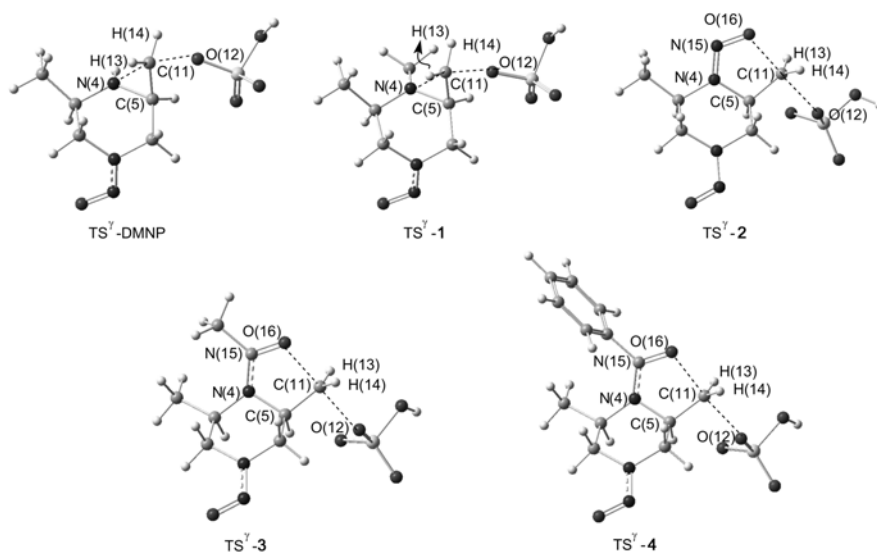


图5 MP2/6-311+G(d,p)水平上计算得到的 γ -位烷化中心生成过程中的过渡态分子结构

Figure 5 The molecular structures of the transition states in the formation of γ -position alkylation center obtained from MP2/6-311+G(d,p) calculations

C(11)—O(12)的键长分别为 0.193 和 0.199 nm, 比反应物中的键长分别减少了 27%和增长了 37%, 接近于 C(11)—O(12)键断裂和 O(16)—C(11)键形成的状态; 角 O(16)—C(11)—O(12)为 176.3° , 说明三个原子趋于共线. 在孤对电子的进攻下, 甲基碳原子构型发生翻转, 从四面体结构的近似 sp^3 杂化[二面角 C(5)—C(11)—H(13)—H(14)为 -125.8°]逐渐伸展, 到达过渡态时甲基碳原子采取不等性 sp^2 杂化[二面角 C(5)—C(11)—H(13)—H(14)为 -177.1°], 最后翻转完成又恢复为 sp^3 杂化[二面角 C(5)—C(11)—H(13)—H(14)为 130.4°]. 中间体的几何参数显示, 二面角 O(16)—N(15)—N(4)—C(5) 和 N(4)—C(5)—C(11)—O(16)分别为 1.9° 和 5.5° , 说明参与成环的五个原子基本处于同一个平面. 对于化合物 DMNP 和 **1**, 甲基碳原子则是在哌嗪环上氮原子的孤对电子进攻下发生构型翻转的, 最终形成具有三元环结构的中间体. 计算得到的化合物 DMNP 和 **1** 邻基参与过程过渡态的几何结构如图 5 中 TS^γ-DMNP 和 TS^γ-1 所

示. 由于三元环结构的张力较大, 使得与之相连的哌嗪环不能像五元环中间体那样保持原来稳定的椅式构型而发生明显的扭曲.

表 3 列出了计算得到的五种化合物 α -位和 γ -位亲电烷化中心生成过程中反应关键步骤的活化能 E_a^α 和 E_a^γ , 中间体醛基 C 原子的 mulliken charge 以及半数致瘤量 TD₅₀ 和致癌活性等级(carcinogenic potential classification, CPC). DMNP 的 E_a^α 和 E_a^γ 分别为 87.85 和 165.28 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, 当其 N'上的氢被不同基团取代时, E_a^α 和 E_a^γ 都会发生相应的变化. 化合物 **1** 中, 其 N'上被甲基取代, 与母体化合物 DMNP 相比, 其 E_a^α 升高了 8.71 kJ/mol , E_a^γ 降低了 25.32 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, TD₅₀ 值显示其致癌活性比 DMNP 稍低; 但由于 α -位活性降低阻碍第一烷化中心的生成, 同时 γ -位活性升高促进第二烷化中心的生成, 二者相互抵消, 所以按照 CPC 分类化合物 **1** 和 DMNP 的致癌活性仍属于同一级别. 化合物 **2** 与其母体 DMNP 相比, E_a^α 降低了 9.03 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, E_a^γ 亦非常显著地降低了

表 2 MP2/6-311+G(d,p)水平上计算得到的 DMNP 生成 γ -位烷化中心反应关键步骤的反应物, 过渡态(TS^y)和中间体的主要结构参数[键长: nm, 键角/二面角: (°)]

Table 2 Main structural parameters of the reactant, transition state (TS^y) and intermediate of the DMNP on the key step of the formation of γ -alkylation center obtained from MP2/6-311+G(d,p) calculations [bond length in nm, bond angle and dihedral angle in (°)]

Compound	Reactant	TS ^y	Intermediate	
2	O(16)—C(11)	0.265	0.193	0.147
	C(11)—O(12)	0.145	0.199	0.275
	O(16)—C(11)—O(12)	170.1	176.3	175.7
	C(5)—C(11)—H(13)—H(14)	-125.8	-177.1	130.4
	O(16)—N(15)—N(4)—C(5)	14.0	5.4	1.9
	N(4)—C(5)—C(11)—O(16)	29.6	13.2	5.5
DMNP	N(4)—C(11)	0.240	0.186	0.147
	C(11)—O(12)	0.144	0.205	0.388
	N(4)—C(11)—O(12)	144.5	159.7	59.8
	C(5)—C(11)—H(13)—H(14)	-123.3	-165.6	-154.1

表 3 DMNP 生成 α -和 γ -位中间体的活化能, TD₅₀, CPC 以及中间体醛基 C 原子的 Mulliken charge

Table 3 Activation energy of the formation of α - and γ -intermediates, TD₅₀, CPC of DMNP, and the mulliken charge on the aldehydic C atom of the intermediates

Compound	E_a^α /(kJ·mol ⁻¹)	E_a^γ /(kJ·mol ⁻¹)	TD ₅₀ ^a /(mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	CPC ^b	Mulliken charge
DMNP	87.85	165.28	0.12	+++	0.060
1	96.56	139.96	0.15	+++	0.095
2	78.82	103.20	0.09	++++	0.064
3	73.90	103.94	—	+++	-0.071
4	91.81	109.88	9.66	+	-0.147

^aThe data set was collected from Carcinogenic Potency Database (CPDB) of the National Cancer Institute and National Toxicology Program of USA. ^bPotent carcinogenic activity (++++), marked (+++), certain (++) , slight (+), and non (—).

62.08 kJ·mol⁻¹, 可见化合物 **2** 中 N' 上的亚硝基取代大大促进了第二活性中心的生成. 因此, 由于两个烷化中心的反应活性同时提高, 化合物 **2** 的致癌活性比 DMNP 显著提高, TD₅₀ 值仅为 0.09 mg·kg⁻¹·d⁻¹, CPC 分类达到了四级(强烈致癌).

化合物 **3** 与化合物 **2** 相比, 二者的 E_a^α 和 E_a^γ 均非常接近, 但化合物 **3** 的致癌活性等级却比 **2** 低一级. 导致这种差异的原因是 NNCs 在经历 α -位代谢时, 除了生成碳正离子(第一烷化中心)而代谢活化之外, 还可能发生醛基 C 原子被进一步氧化生成羧酸后代谢脱毒. 从表 3 中间体醛基 C 原子的 mulliken charge 可以看出, 化合物 **3** 醛基 C 原子的电负性远大于化合物 **2**, 因此前者更容易被氧化生成羧酸从而代谢脱毒, 较后者具有较低的致癌活性. 据此推断 N' 原子上取代基的改变可能影响代谢途中产生的偶氮氧化物中间体的稳定性, 导致亚硝基哌嗪一方面经历生成烷化中心的代谢活化途径, 另一方面经历氧化成酸的代谢脱毒途径, 从而影响烷化中心的生成活性. 化合物 **4** 的 E_a^γ 与化合物 **2** 和 **3** 接近, 其 E_a^α 虽然比较低, 但其中间体醛基 C 原子的电负性明显高于其它四种化合物, 导致烷化中心难于生成, 成为其致癌活

性大幅度降低的可能原因之一. 另外, 在考虑外源化学致癌物质(或药物)与生物大分子的相互作用时, 通常近似地认为致癌物质在体内的运输环境是油水相间的多层体系^[23], 因此, 化合物 **4** 中强疏水性基团苯环的存在不利于其在体内运输, 这亦是导致化合物 **4** 的致癌活性明显低于其它四种化合物的一个原因.

3 结论

计算结果表明, DMNP 代谢生成 α -位和 γ -位两个烷化中心是其具有致癌活性的必要条件, N' 原子上取代基的结构影响烷化中心的活性, 烷化活性越高致癌强度越高, 其中任何一个烷化中心的活性降低, 化合物的致癌强度也降低. α -位代谢生成的活泼中间体上醛基 C 原子的电负性亦是影响致癌强度的重要因素, 电负性较高会促进 C 原子进一步氧化生成羧酸而导致化合物脱毒, 阻碍 α -位烷化中心的生成, 使致癌活性降低. 总之, 在评价 DMNP 的致癌活性时, 需同时考虑 α -位和 γ -位两个活性中心的烷化能力以及二者之间的关系. 这一结果从理论上解释了不同结构的 N-亚硝基哌嗪类化合物之间致癌活性存在明显差异的现象, 为深入阐明其结构与致癌

活性关系提供了理论依据。

References

- 1 Lijinsky, W.; Knutsen, G. M.; Reuber, M. D. *Carcinogenesis* **1983**, *4*, 1165.
- 2 Pai, S. R.; Shirke, A. J.; Gothoskar, S. V. *Carcinogenesis* **1981**, *2*, 175.
- 3 Borzsonyi, M.; Torok, G.; Pinter, A.; Surjan, A.; Nadasdi, L.; Roller, P. *Cancer Res.* **1980**, *40*, 2925.
- 4 Tricker, A. R.; Kalble, T.; Preussmann, R. *Cancer Lett.* **1991**, *59*, 165.
- 5 Elespuru, R. K.; Lijinsky, W. *Cancer Res.* **1976**, *36*, 4099.
- 6 Rao, T. K.; Young, J. A.; Lijinsky, W.; Epler, J. L. *Mutat. Res.-Fund. Mol. M.* **1978**, *57*, 127.
- 7 Murphy, S. E. *Chem. Res. Toxicol.* **1993**, *18*, 1973.
- 8 Jalas, J. R.; Hecht, S. S.; Murphy, S. E. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18*, 95.
- 9 Magee, P. N.; Barnes, J. M. *Cancer Res.* **1967**, *10*, 163.
- 10 Singer, S. S.; Singer, G. S.; Saavedra, J. E.; Reuber, M. D.; Lijinsky, W. *Cancer Res.* **1981**, *41*, 1034.
- 11 Loeppky, R. N.; Ye, Q. P.; Goelzer, P.; Chen, Y. *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, *15*, 470.
- 12 Dennehy, M. K.; Loeppky, R. N. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18*, 556.
- 13 Kroeger-Koepke, M. B.; Schmiedekamp, A. M.; Michejda, C. J. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 3301.
- 14 Roohi, H.; Deyhimi, F.; Ebrahimi, A. *J. Mol. Struct.-Theochem* **2001**, *543*, 299.
- 15 Dai, Q. H. *Di-region Theory*, Science Press, Beijing, **2000** (in Chinese).
(戴乾圜, 双区理论, 科学出版社, 北京, **2000**.)
- 16 Dai, Q. H.; Zhong, R. G. *Sci. China, Ser. B* **1988**, *32*, 776 (in Chinese).
(戴乾圜, 钟儒刚, 中国科学 B 辑, **1988**, *32*, 776.)
- 17 Zhong, R. G.; Dai, Q. H. *Chin. Sci. Bull.* **1997**, *42*, 933 (in Chinese).
(钟儒刚, 戴乾圜, 科学通报, **1997**, *42*, 933.)
- 18 Zhao, L. J.; Zhong, R. G.; Dai, Q. H. *Chem. J. Chin. Univ.* **2006**, *27*, 2386 (in Chinese).
(赵丽娇, 钟儒刚, 戴乾圜, 高等学校化学学报, **2006**, *27*, 2386.)
- 19 Scott, A. P.; Radom, L. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 16502.
- 20 Pawar, D. M.; Noe, E. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1485.
- 21 Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Zakrzewski, V. G.; Montgomery, J. A. Jr.; Stratmann, R. E.; Burant, J. C.; Dapprich, S. J.; Millam, M.; Daniels, A. D.; Kudin, K. N.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Tomasi, J.; Barone, V.; Cossi, M.; Cammi, R.; Mennucci, B.; Pomelli, C.; Adamo, C.; Clifford, S.; Ochterski, J.; Petersson, G. A.; Ayala, P. Y.; Cui, Q.; Morokuma, K.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Gomperts, R.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Gonzalez, C.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Andres, J. L.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. *Gaussian 03*, Pittsburgh, PA, Gaussian Inc., **2003**.
- 22 Zhong, R. G.; Zhao, Y. F.; Dai, Q. H. *Chin. Sci. Bull.* **1998**, *43*, 725 (in Chinese).
(钟儒刚, 赵玉芬, 戴乾圜, 科学通报, **1998**, *43*, 725.)
- 23 Gatlik-Landwojtowicz, E.; Aeaenismaa, P.; Seelig, A. *Biochemistry* **2006**, *45*, 3020.

(A0803132 Zhao, C.)