

1, 3-丁二烯与 DNA 交联机理的研究^{*}

——代谢产物在 DNA 大沟股间交联反应的 AM1 计算

周志刚

戴乾圆 钟儒刚

(北京大学环境科学中心, 北京 100871) (北京工业大学癌化学与生物工程中心, 北京 100022)

摘要 采用 AM1 方法计算了环境致癌物 1, 3-丁二烯(BD)的代谢产物 1, 2-环氧-3, 4-丁烯(EB)和 1, 2, 3, 4-二环氧丁烷(DEB)与 DNA 腺嘌呤和胞嘧啶烷化反应过程速率控制步骤的活化能, 以及 DEB 在 DNA 大沟侧与不同序列 DNA 片断生成烷化股间横向交联产物的结构和能量。结论认为: 用烷化反应的难易程度难以解释 DEB 的致突性比 EB 约大 100 倍的实验事实; 强致突的 DEB 可与碱基发生 2 次烷化反应, 生成 DNA 交联产物; 而 EB 则不能交联, 这可能为 2 者基因毒性差异巨大的分子机制; 同时 DEB 在 DNA 大沟侧可与多种不同的 DNA 序列发生股间横向交联, 对比在小沟侧只与 2 种序列交联, 此发生股间横交联几率的差异合理地解释了 DEB 致突的碱基选择性。

关键词 1, 3-丁二烯, 致癌作用, 致突作用, 股间交联, 双区理论, AM1.

Studies on Carcinogenic Mechanism of 1, 3-Butadiene^{*}

——Computating Metabolites of 1, 3-Butadiene Interstrand Cross-linking with DNA by AM1

Zhou Zhigang

(The Center of Environmental Science, Peking Univ., Beijing 100871, China)

Dai Qianhuan Zhong Rugang

(The Engineering Center of Chemistry and Biology of Beijing Polytechnic Univ., Beijing 100022, China)

Abstract The alkylating reaction of 1, 2-Epoxy-3, 4-Butene (EB) and 1, 2, 3, 4-DiEpoxy-Butane (DEB), the metabolites of rodent carcinogenic 1, 3-Butadiene, with Adenine and Cytosine and interaction with fragment of DNA have been computed. The results show that it is difficult to explain the fact that the mutagenicity of DEB is 100 times greater than that of EB by the ability of alkylation, and also show that DEB can interstrand cross-link with DNA through two times alkylating reactions, but EB cannot. So, this difference may contribute to the significant different carcinogenicity of two agents. Meanwhile, it is known that DEB can interstrand cross-link with many sequences of DNA in major groove vs. two in minor groove. This increases opportunities of interstrand cross-link with DNA. This difference may be the reason of base selection of DEB mutation. The deformation of some cross-linked DNA may also contribute to this selection in some degree.

Keywords 1, 3-Butadiene, carcinogenesis, mutagenesis, cross-linking with DNA, Di-region theory, AM1

近年来的流行病学调查表明, 作为工业单
体原料和环境污染物的 1, 3-丁二烯(BD)能显
著提高接触该化合物人群各种淋巴瘤和血癌的
发病率^[1]。动物实验显示, BD 可引发多种肿
瘤^[2]。基于此, 1992 年国际癌症研究机构
(IARC) 将 BD 列为第 2A 类致癌物。分子生物
学研究表明, BD 需经细胞色素 P450 和过氧水
合酶(EH)的代谢活化生成一系列活化产物直

接烷化 DNA 而发生致癌作用^[3]。其中 DEB 是
强致突剂, 可直接引发细胞突变; 而 EB 和
Diol EB 的致突活性很低, 其直接致癌性尚无定
论, 有待于进一步研究。

^{*} 国家自然科学基金资助项目 (Project Supported by National Natural Science Foundation of China): 29377269
周志刚: 男, 32 岁, 博士生, 工程师
收稿日期: 1998-10-07

DEB 是双官能烷化剂,可与相邻 DNA 碱基发生烷化反应,生成 DNA 交联产物,但其加成模式与结构未得到确定.为此,本实验室利用分子轨道理论,系统地计算了 EB 和 DEB 与 DNA 碱基的烷化反应和可能的交联模式,对 EB 和 DEB 与腺嘌呤和胞嘧啶的烷化反应及与 DNA 可能的横向交联模式即 EB 和 DEB 在 DNA 大沟一侧烷化模式的 AM1 计算结果进行讨论.以期更深入地认识外源物基因毒性的分子机制.

1 模型和计算方法

在实验中,DEB 可在 DNA 鸟嘌呤的 N-1、N² 和 N-7、腺嘌呤的 N-1、N⁶ 和 N-7 以及胞嘧啶的 N⁴ 处烷化.其中 N-1 烷化产物不稳定,很快经 Dimroth 重排为更稳定的 N²(或 N⁶)烷化物^[4,5].N-7 烷化的产物半衰期也较短,易于经去嘌呤过程,脱除烷化碱基,经正常的修复机制使 DNA 修复;也有可能经电子重排,促进 N¹上 H 解离,造成 G→A 转换.环外 G-N²(A-N⁶或 C-N⁴)烷化的产物较稳定,半衰期较长,故此,本文以 A-N⁶和 C-N⁴上的烷化反应为模型,计算了 EB 和 DEB 与其发生的烷化反应过程.在计算时,对所有反应物、过渡态结构及产物均进行了全几何构型优化和简并振动

力常数的计算,确认结构的合理性,并用内禀反应坐标(IRC)确认诸相关结构之间的联系.由于计算是在同种反应物的同类反应之间进行的,电子相关能在结果比较大中大部分互抵,在计算中均未考虑电子组态的相互作用.

进一步以 DNA 片断 5'-AT-3'、5'-AG-3'、5'-TA-3'、5'-GA-3'和 5'-CG-3'为模型,计算了 DEB 分别与它们烷化生成链间横向交联产物可能模式的结构.由于受程序计算能力的限制,只能选取含 2 对碱基对的 DNA 片断进行计算.

本计算使用 MOPAC 6.3 软件,在 P-200PC 机上完成.分子初始结构建立和计算后分子结构显示、分析和作图均采用 Alchemy 软件,其中 DNA 结构数据取自 Hypercube 公司的核酸数据库.

2 计算结果与讨论

2.1 烷化反应计算

采用 AM1 方法计算了腺嘌呤 N⁶和胞嘧啶 N⁴原子经 S_N2 机理与 EB 和 DEB 反应的速率控制步骤的活化能(过渡态能量与反应物基态能量差值),以考查 EB 和 DEB 不同位置碳原子烷化鸟嘌呤 N²和胞嘧啶 N⁴原子的反应性,结果见表 1.

表 1 DEB 和 EB 烷化腺嘌呤 N ⁶ 和胞嘧啶 N ⁴ 反应的速率控制步骤的活化能/kJ·mol ⁻¹		
序号	反应	活化
	DEB 的 C ¹ 与腺嘌呤的烷化反应	220.9
	DEB 的 C ² 与腺嘌呤的烷化反应	232.4
	DEB 的 C ¹ 位烷化腺嘌呤后 C ⁴ 又与第二个腺嘌呤烷化	205.1
	DEB 的 C ¹ 位烷化腺嘌呤后 C ³ 又与第二个腺嘌呤烷化	216.7
	DEB 的 C ² 位烷化腺嘌呤后 C ⁴ 又与第二个腺嘌呤烷化	211.7
	DEB 的 C ¹ 与胞嘧啶的烷化反应	224.1
	DEB 的 C ¹ 位烷化腺嘌呤后 C ⁴ 又与胞嘧啶烷化	202.3
	DEB 的 C ¹ 位烷化胞嘧啶后 C ⁴ 又与胞嘧啶烷化	212.9
	DEB 的 C ² 位烷化腺嘌呤后 C ⁴ 又与第二个胞嘧啶烷化	225.4
	EB 的 C ¹ 与腺嘌呤的烷化反应	224.4
	EB 的 C ² 与腺嘌呤的烷化反应	224.4
	EB 的 C ¹ 与胞嘧啶的烷化反应	228.6

由表 1 看出, 较易反应的 DEB 的 C¹ 原子和 EB 的 C¹ 原子分别与腺嘌呤和胞嘧啶的环外氮原子发生烷化反应时(分别对应于反应 、 、 和), 速率控制步骤的活化能相差不大, 说明 DEB 和 EB 与腺嘌呤和胞嘧啶的环外氨基的反应性相当. 对比 DEB 与腺嘌呤第一次烷化反应(反应 和) 的活化能和发生一次烷化后又与腺嘌呤进行第二次烷化反应(反应 、 和) 的活化能看出, 第二次烷化反应较第一次略易进行; 同时也看出与胞嘧啶发生第二次烷化反应(反应 、 和) 的活化能和相对应的与腺嘌呤发生第二次烷化反应(反应 和) 的活化能相差不大. 这些结果说明, 用致癌代谢产物与 DNA 碱基烷化反应的难易程度难以解释 DEB 的基因毒性远远大于 EB(100 倍左右) 的实验事实^[7]; 双官能烷化剂 DEB 发生一次烷化反应后, 易于再发生一次烷化反应, 在 DNA 空间结构张力许可的情况下, 在 DNA 大沟一侧可以与两相邻腺嘌呤碱基、胞嘧啶碱基或腺嘌呤和胞嘧啶碱基烷化生成 DNA 交联产物; 而 EB 只能烷化一次, 不能发生交联作用. 此为 2 者的本质区别. 为了进一步考查 DEB 在 DNA 双螺旋结构中形成股间横向交联的情况, 本文以实际 DNA 片断为模板, 计算了 DEB 在 DNA 大沟一侧与 DNA 碱基经烷化反应形成的股间横向交联模式.

2.2 烷化交联模式计算

分别计算了 DEB 与 DNA 片断 5'-AT-3'、5'-AG-3'、5'-TA-3'、5'-GA-3' 和 5'-CG-3' 生成股间 dA-N⁶-DEB(1,4)-N⁶-dA、dA-N⁶-DEB(1,3)-N⁶-dA、dA-N⁶-DEB(1,4)-N⁴-dC、dA-N⁶-DEB(1,3)-N⁴-dC 和 dC-N⁴-DEB(1,4)-N⁴-dC 烷化交联产物的分子模型, 计算得到的结构如图 1 所示. 各 DNA 片断及 DEB 烷化交联产物的重要结构参数列于表 2.

由计算结果看出, DEB 于 DNA 的大沟一侧在互补链间相邻的腺嘌呤的 N⁶ 和嘧啶的 N⁴ 原子之间的反应, 生成的股间烷化产物的结构不尽相同. 与 DNA 序列为 5'-AT-3' 的片断形成 dA-N⁶-DEB(1,4)-N⁶-dA (见图 1a) 和 dA-

N⁶-DEB(1,3)-N⁶-dA (见图 1b) 交联结构、与 5'-AG-3' 片断形成的 dA-N⁶-DEB(1,4)-N⁴-dC

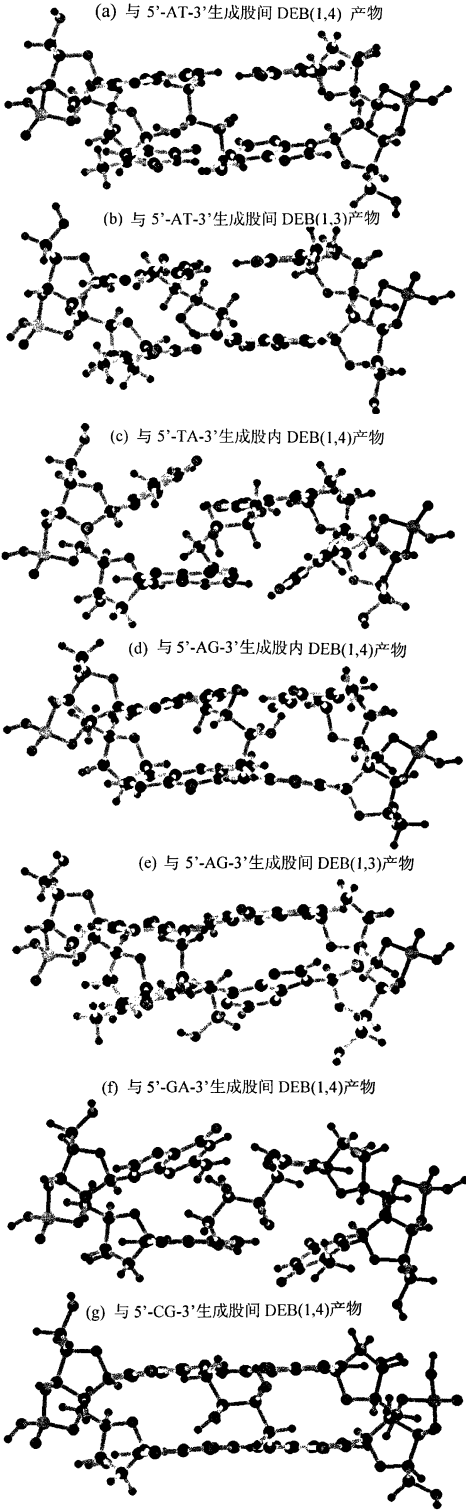


图 1 烷化交联产物的结构

(见图 1d) 和 $\text{dA-N}^6\text{-DEB}(1, 3)\text{-N}^4\text{-dC}$ (见图 1e) 交联结构和与 5'-CG-3' 片断形成的 $\text{dC-N}^4\text{-DEB}(1, 4)\text{-N}^4\text{-dC}$ (见图 1g) 和 $\text{dC-N}^4\text{-DEB}(1, 3)\text{-N}^4\text{-dC}$ 交联结构形态均处于稳定状态, 加成后 DNA 链结构变形小, 这些结构中的 2 对互补碱基基本处于一平面, 结合表 2 数据, 可以看到彼此仍有效地形成氢键; DNA 基本空间结构仍得以保持, 骨架变形小, 仍能保持原有的二级、三级结构特征. 与 DNA 这些序列烷化形成股间交联时, 均以生成 DEB(1, 4) 结构更稳定.

对于 DNA 序列为 5'-TA-3' 和 5'-GA-3' 的片断, 由于环外氮原子的距离较远(0.43nm 和 0.52nm), 生成 DEB(1, 3) 加合物比较困难, 生成的 DEB(1, 4) 加合物(见图 1c 和图 1f) 结构变形较大, 2 对互补碱基明显偏离原平面, 已不能有效地形成氢键; 尽管 DNA 骨架也有一定的变形, 但没有破坏 DNA 双螺旋基本结构.

由此看到, DEB 在 DNA 大沟一侧与碱基发生烷化反应时, 可与 5 种不同的 DNA 序列发生股间交联, 呈现交联的多样化. 对比 DEB 在 DNA 小沟一侧烷化反应, 只易与 5'-GC-3'

和 5'-CG-3' 2 种 DNA 序列发生股间交联(结果另文发表). 尽管在两边与碱基发生烷化反应的活性和几率没有实质的差异, 但是在两边发生股间交联的几率却出现了显著的差异(大约为 5 : 2). 在实验中发现, 尽管 DEB 烷化 DNA 的主要产物中鸟嘌呤和腺嘌呤烷化物的产率基本一致, 但是 AT 碱基对处发生的突变几率却大于 CG 碱基对处发生的突变, 即 DNA 大沟一侧 DEB 烷化加成比 DNA 小沟一侧 DEB 烷化加成更易引起突变^[6].

由于股间横向交联的形成, 在修复过程中, 难以通过单碱基或单链的修复使 DNA 得以修复; 虽可通过切除含交联部分的 DNA 双螺旋片断的修复过程进行修复, 由于需要切除 2 条互补链, 没有原互补作模板进行 DNA 修复, 难以复原 DNA, 从而易于造成 DNA 移码、缺失、重排及姊妹染色体交换等突变, 甚至引起染色体断裂. 而 EB 等与 DNA 形成的单官能加合物, 可以经去嘌呤作用, 通过切除单链上的烷化碱基, 在互补链的模板作用下完成 DNA 修复, 降低了烷化剂引起的突变.

在有限的 DEB 致突变基因测序实验中^[6], 可

表 2 各 DNA 片断和 DEB 烷化交联产物的重要结构参数

DNA 片断	DEB 交联位置	$\Delta H^{1)}$ / kJ · mol ⁻¹	$L_{N-N}^{2)}$ / nm		$L^{3)}$ 氢键原子 / nm		$L_{N^1-N^1}^{4)}$ / nm		倾角 / 度	
					上碱基对	下碱基对	主链	互补链	上对碱基	下对碱基
5'-AT-3'	模板链		0.324	0.302, 0.324,	0.297, 0.330		0.370	0.352	3.9	4.7
5'-AT-3'	C ¹ , C ⁴	346.0	0.486	0.297, 0.320,	0.297, 0.350		0.420	0.465	5.1	5.0
5'-AT-3'	C ¹ , C ³	320.8	0.332	0.303, 0.347,	0.306, 0.351		0.419	0.424	8.1	3.9
5'-TA-3'	模板链		0.431	0.293, 0.312,	0.293, 0.312		0.439	0.425	3.8	4.2
5'-TA-3'	C ¹ , C ⁴	230.9	0.368	0.306, 0.328,	0.305, 0.363		0.556	0.558	22.9	34.7
5'-AG-3'	模板链		0.333	0.295, 0.318,	0.311, 0.322 0.303		0.374	0.368	1.9	2.1
5'-AG-3'	C ¹ , C ⁴	344.5	0.418	0.302, 0.370,	0.321, 0.342 0.307		0.421	0.423	7.0	1.5
5'-AG-3'	C ¹ , C ³	294.9	0.300	0.299, 0.333,	0.313, 0.326 0.303		0.423	0.369	11.4	7.3
5'-GA-3'	模板链		0.524	0.301, 0.305, 0.300	0.295, 0.316		0.369	0.394	0	2.2
5'-GA-3'	C ¹ , C ⁴	259.6	0.506	0.300, 0.310, 0.301	0.411, 0.367		0.529	0.484	34.6	30.0
5'-CG-3'	模板链		4.22	0.305, 0.313, 0.300	0.315, 0.317, 0.306		0.442	0.420	2.4	2.8
5'-CG-3'	C ¹ , C ⁴	295.9	4.86	0.310, 0.316, 0.304	0.304, 0.316 0.302		0.452	0.451	0	1.2

1) ΔH (计算得到的反应焓) = 计算得到的产物的生成焓总和与反应物的生成焓总和之差;
2) 发生交联反应的相邻碱基环外氮原子间距;
3) 互补碱基对形成氢键的氮-氮(氧)原子间距子间距, 三数值分别为: 中间氢键间距、大沟边氢键间距和小沟边氢键间距;
4) 同链相邻碱基中间氢键氮原子间距, 主链相对于指定的 DNA 片断.

以看到, 尽管 A-T 突变显著增加, 但所增加的突变的类型绝大部分为移码或缺失. 在另一些实验中也证明双官能烷化剂常常引起 DNA 缺失、重排及姊妹染色体交换等突变, 如 1996 年 Sjöblom 的一项实验表明: DEB 可引起生殖细胞染色体微核化, 而 BD、EB 和 DiolEB 则不能使染色体微核化^[8]. 而微核化的主要原因是染色体断裂. 这说明上述推理的合理性.

另外, DEB 在 DNA 大沟侧与 5'-T A-3' 和 5'-G A-3' 序列生成的股间横向交联结构变形较大, 易于被修复酶所识别而引发修复机制切除交联碱基, 如前所述引起突变. 对比在小沟侧生成的股间横向交联结构均变形很小, 不易为酶所识别, 在复制时阻止双链打开, 表现为细胞毒性, 这也可能是两侧突变产生差异的原因之一.

BD 对不同的动物显示不同的致癌性, 这可能是由于不同的动物体内 P450 酶的浓度和活性不同, 代谢活化 BD 的能力不同, 同样也可以影响 EB 的进一步代谢活化为 DEB; 并且由于细胞核内 P450 酶的浓度较低, BD 和 EB 进入核内后不能有效地被代谢活化, 可能也是其致癌性较低的原因.

3 结论

经 AM1 计算 BD 的代谢产物 EB 和 DEB 与 DNA 碱基的烷化反应和在 DNA 大沟侧与不同序列股间横向交联的模式, 结果得出两产物与碱基烷化反应活性没有本质差异, 但强致突的 DEB 能与 DNA 发生股间横向交联, 而 EB 不能. 这可能为两者基因毒性差异巨大的细胞分子机制. 以 DEB 在 DNA 两侧发生股间横向交联的序列种类数量的不同合理地阐述了其致突实验结果的碱基选择性; 大沟交联结构的变形可能对致突有一定的贡献. 从而认为

双官能化合物与 DNA 发生股间横向交联, 是其强致突性的本质原因, 这对于 '双区理论' 的进一步应用和实验研制研究工作具有重要意义^[9].

参 考 文 献

- 1 International Agency for Research on Cancer (ARC) 1, 3-butadiene. In Occupational Exposures to Mists and Vapors from Strong Inorganic Acids and Other Industrial Chemicals. IARC, 1992, **54**(1): 237 ~ 285
- 2 Melnick R L, Huff J, Chou B J, Miller R A. Carcinogenicity of 1, 3-butadiene in B6C3F1 mice at low exposure concentrations. Cancer Res., 1990, **50**(20): 6592 ~ 6599
- 3 Malvoisin E, Roberfroid M. Hepatic microsomal metabolism of 1, 3-butadiene. Xenobiotica, 1982, **12**(2): 137 ~ 144
- 4 Segal A, Mate U, Solomon J J. In vitro Dimroth rearrangement of 1-(2-carboxyethyl) adenine to N⁶-(2-carboxyethyl) adenine in single-stranded calf thymus DNA. Chem Biol Interact., 1979, **28**(3): 333 ~ 344
- 5 Solomon J J, Mukai F, Fedyk J, Segal A. Reactions of propylene oxide with 2'-deoxynucleosides and in vitro with calf thymus DNA. Chem Biol Interact., 1988, **67**(2): 275 ~ 294
- 6 Ann-Marie Steen, Kathy G Meyer, Leslie Recio. Analysis of *hprt* mutations occurring in human TK6 lymphoblastoid cells following exposure to 1, 2, 3, 4-diepoxybutane. Mutagenesis, 1997, **12**(2): 61 ~ 67
- 7 Cochran E J, Skopek T R. Mutagenicity of butadiene and its epoxide metabolites: I. Mutagenic potential of 1, 2-epoxybutene, 1, 2, 3, 4-diepoxybutane and 3, 4-epoxy-1, 2-butanediol in cultured human lymphoblasts. Carcinogenesis, 1994, **15**(4): 713 ~ 717
- 8 Tiina Sjöblom, Jaana Lahdetie. Micronuclei are induced in rat spermatids in vitro by 1, 2, 3, 4-diepoxybutane but not by 1, 2-epoxy-3-butene and 1, 2-dihydroxy-3, 4-epoxybutane. Mutagenesis, 1996, **11**(5): 525 ~ 528
- 9 戴乾圆. 化学致癌剂及化学致癌机理的研究. 多环芳烃致癌性能的定量分子轨道模型——双区理论. 中国科学(B 辑), 1979, (10): 964 ~ 977