

氢键对羟基自由基与鸟嘌呤 反应影响的理论研究

王英辉¹, 薛浩明², 马斌², 李宗璇³, 马亚婷², 马蕾¹, 魏思敏⁴

(1. 长安大学理学院, 2. 建筑工程学院, 3. 公路学院, 西安 710064;

4. 陕西中医药大学, 陕西中药资源产业化省部共建协同创新中心, 咸阳 712083)

摘要 羟基自由基($\cdot\text{OH}$)是一种有代表性的活性氧物质(ROS), 可与DNA分子反应导致DNA损伤. 研究结果表明, $\cdot\text{OH}$ 与鸟嘌呤(G)反应具有氢键依赖特性, 反平行三链中G碱基氢键环境与已报道的体系不同, 且更复杂, 可能导致反平行三链中 $\cdot\text{OH}$ 与G碱基衰变反应不同. 基于此, 本文选取反平行三链碱基对GGC为模型, 通过结构分析、最高占据轨道计算、构建C4, C5, C8加成和夺氨基氢(-H2)反应吉布斯自由能面等研究了氢键对G与 $\cdot\text{OH}$ 反应的影响. 结果显示, $\cdot\text{OH}$ 可与第三条链中的G碱基通过直接夺氢反应生成中性自由基G(-H2); C8加成自由基在 O_2 参与时易生成8-oxoG, 能垒低于夺氢路径, 为主反应通道, 但夺氢路径可与之竞争; 此外, 离子对中间体稳定性受氢键影响, 在GGC碱基对中, 羟基化自由基比离子对中间体更稳定.

关键词 羟基自由基; 氢键; 反平行三链DNA; 加成反应; 夺氢反应

中图分类号 O641

文献标志码 A

doi: 10.7503/cjcu20240208

Theoretical Studies of Effect of Hydrogen Bond on Reaction of Hydroxyl Radicals and Guanine

WANG Yinghui^{1*}, XUE Haoming², MA Bin², LI Zongxuan³,

MA Yating², MA Lei¹, WEI Simin^{4*}

(1. School of Science, 2. School of Civil Engineering,

3. School of Highway, Chang'an University, Xi'an 710064, China;

4. Co-construction Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine Resources Industrialization by Shaanxi & Education Ministry, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712083, China)

Abstract Hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) is a representative reactive oxygen species (ROS) with high oxidation potential, and could lead to the indiscriminate chemical modification on DNA causing oxidative damage. Interestingly, it has documented that the reaction of $\cdot\text{OH}$ and guanine (G) reveals hydrogen bond-dependent fashion. Due to the highly

收稿日期: 2024-04-23. 网络首发日期: 2024-05-13.

联系人简介: 王英辉, 男, 博士, 副教授, 主要从事理论计算方面的研究. E-mail: wangyinghui@chd.edu.cn

魏思敏, 女, 博士, 副教授, 主要从事纳米载药体系构建方面的研究. E-mail: weismiccas@163.com

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 22103007, 82274353)、陕西省青年科技新星项目(批准号: 2023KJXX-063)、陕西省重点研发计划项目(批准号: 2024SF-YBXM-517, 2024SF-YBXM-426)、西安市科技计划项目(批准号: 22GXFW0153)、陕西中医药大学2023年度科技创新人才体系建设计划项目(批准号: 2023-LJRC-03)、大学生创新创业训练计划项目(批准号: S202310710221)和陕西省自然科学基金基础研究计划项目(批准号: 2024JC-YBQN-0586)资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 22103007, 82274353), the Science and Technology Youth Stars Project of Shaanxi Province, China (No. 2023KJXX-063), the Key Research and Development Plan of Shaanxi Province, China (Nos. 2024SF-YBXM-517, 2024SF-YBXM-426), the Xi'an Science and Technology Plan Project, China (No. 22GXFW0153), the Science and Technology Innovation Talent System Construction Plan of Shaanxi University of Chinese Medicine, China (No. 2023-LJRC-03), the Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students, China (No. S202310710221) and the Natural Science Foundation of Shaanxi Province, China (No. 2024JC-YBQN-0586).

specific binding of triplex forming oligonucleotide (TFO) to target duplex DNA leading to various surroundings of G, it makes triplex DNA as a prototype model to be examined. Inspired by this, by selecting the building block of antiparallel triplex DNA-GGC motif as the substrate, a comprehensive theoretical investigation was performed to illuminate the influence of hydrogen bond on the obscure reaction of $\cdot\text{OH}$ and G by structural analysis, HOMO calculation and mapping the energy profiles for both addition and hydrogen abstraction reactions. Results reveal that the G located in TFO is more susceptible to the attack of $\cdot\text{OH}$. In GGC base pair, the neutral radical $\text{G}(-\text{H}_2)\cdot$ could be formed by direct H-abstraction, where the participation of explicit water is adverse to H-abstraction from N2 of G. The electrophilic attack of $\cdot\text{OH}$ to C8 of G resulting in 8-oxoG is the most favorable course due to the lowest energy barrier in comparison with H-abstraction pathway. And the stability of ion-pairs appears to significantly influence by hydrogen bond, which is less stable than the hydroxylated radicals different with free G. These results show clearly that the hydrogen bonds guide the reaction flux of $\cdot\text{OH}$ and G.

Keywords Hydroxyl radical; Hydrogen bond; Antiparallel triplex DNA; Addition reaction; Hydrogen abstraction reaction

羟基自由基($\cdot\text{OH}$)是一种有代表性的活性氧(ROS)物质,具有强氧化性[2.4 V(*vs.* NHE)],可通过新陈代谢、炎症、电离辐射等内源或外源性途径产生,已在化学、生物医学和大气与环境科学等领域被广泛关注^[1,2].在生物学上, $\cdot\text{OH}$ 可与蛋白质、氨基酸和DNA等生物分子以接近溶剂扩散速率发生反应而引起氧化性损伤,从而导致细胞损伤造成细胞功能受损^[3].DNA作为遗传信息载体极易与 $\cdot\text{OH}$ 反应导致DNA氧化损伤,已有研究表明,近50%的损伤由 $\cdot\text{OH}$ 与DNA核酸碱基反应引起^[1];如果这些损伤不被及时移除,可能会导致癌症、关节炎和帕金森综合症等疾病.而在4个DNA碱基中,鸟嘌呤(G)氧化还原电势最低[1.29 V(*vs.* NHE)],最容易被氧化,因此,研究 $\cdot\text{OH}$ 与G碱基的反应对理解由 $\cdot\text{OH}$ 氧化损伤引起的疾病具有重要意义^[4-6].

目前,通过实验及理论模拟等手段对 $\cdot\text{OH}$ 与自由G碱基反应的研究已有大量报道^[7-22].1983年,O'Neill等^[7]用脉冲辐解方法对该反应进行了研究,发现G碱基与 $\cdot\text{OH}$ 主要反应路径为C4, C5和C8加成.随后,Candeias和Steenken^[9]研究表明, $\cdot\text{OH}$ 与G碱基分别在C4和C5位点加成生成 $\text{G}(\text{C}4-\text{OH})\cdot$ 和 $\text{G}(\text{C}5-\text{OH})\cdot$,在C8位点加成形成 $\text{G}(\text{C}8-\text{OH})\cdot$,其中,C4和C5加成为主要反应路径(约占60%~70%); $\text{G}(\text{C}4-\text{OH})\cdot$ 和 $\text{G}(\text{C}5-\text{OH})\cdot$ 会通过脱水反应形成中性自由基 $\text{G}(-\text{H}1)\cdot$,而进一步氧化 $\text{G}(\text{C}8-\text{OH})\cdot$ 会生成氧化应激产物7,8-二氢-8-氧鸟嘌呤(8-oxoG).Sevilla等^[12]研究表明, $\text{G}(\text{C}4-\text{OH})\cdot$ 和 $\text{G}(\text{C}5-\text{OH})\cdot$ 脱水并不会直接形成 $\text{G}(-\text{H}1)\cdot$,而是首先形成亚稳态的离子对中间体($\text{G}^{\cdot+}+\text{OH}^-$),其脱质子形成 $\text{G}(-\text{H}1)\cdot$.有趣的是,Chatgililoglu等^[23]认为, $\cdot\text{OH}$ 与G的主要反应并非加成,而是从氨基夺氢反应;并进一步指出 $\cdot\text{OH}$ 从G碱基夺氢首先生成 $\text{G}(-\text{H}2)\cdot$,其通过异构化作用转化为更稳定的 $\text{G}(-\text{H}1)\cdot$,速率为 $2.3\times 10^4\text{ s}^{-1}$.然而,Greenberg和Su等^[17]研究表明,在微秒时间尺度, $\text{G}(-\text{H}2)\cdot$ 不会转化为 $\text{G}(-\text{H}1)\cdot$.

已有少量研究表明,由于碱基堆积、溶剂可及性和氢键等影响, $\cdot\text{OH}$ 和G碱基在DNA环境中反应与自由G碱基完全不同.如在双链DNA中,C8加成路径比重升高,表现为氧化应激产物8-oxoG含量显著增加,为自由G碱基的20倍^[24];G-四链体环境也可改变 $\cdot\text{OH}$ 与G碱基的反应路径,使用 $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{H}_2\text{O}_2$ 氧化G-四链体DNA发现,约50%螺亚胺二乙内酰脲(Sp)生成,表明C8加成路径很重要^[25].反应机理研究表明,在G-四链体环境中,虽然C4/C5加成反应路径被抑制,但从氨基夺氢生成 $\text{G}(-\text{H}2)\cdot$ 反应路径可与C8加成路径竞争,导致反应路径的巨大差异源于G所处氢键环境不同^[20].显然,阐明氢键对 $\cdot\text{OH}$ 与G碱基反应的影响对全面理解 $\cdot\text{OH}$ 与DNA反应具有重要意义.

三链DNA是一种重要的非B型DNA,可能会影响DNA复制并导致遗传性和后天性疾病^[26-29].三链形成序列(TFO)在目标双链大沟中通过Hoogsteen氢键结合后形成.由于TFO链与目标双链的特异性结合,导致三链DNA中G碱基的氢键环境显著变化^[30].其中,在反平行三链中,富含嘌呤的TFO与目标双链中均嘌呤链通过反Hoogsteen氢键结合形成GGC与AAT平面;而平行三链中,在微酸性环境中,

TFO中的胞嘧啶(C)会被部分质子化,被质子化的TFO与目标双链通过Hoogsteen氢键结合形成C(H⁺)GC和TAT平面.显然三链结构单元[C(H⁺)GC和GGC]可作为模型用于研究氢键对G与·OH反应的影响.因此,我们^[21]选取C(H⁺)GC作为模型研究了其与·OH的反应,从动力学角度,·OH与C(H⁺)GC中G碱基反应主要路径为从氨基夺氢生成G(-H2)·反应,但需要有水参与(无势垒),C8加成路径可与之竞争,能垒为26.8 kJ/mol;而从热力学角度,·OH与C(H⁺)GC中G反应生成更稳定的氧化应激产物8-oxoG,其在C(H⁺)GC环境中比G(-H2)·稳定315.9 kJ/mol.与C(H⁺)GC碱基对相比,GGC平面中G碱基数量更多,G碱基所处氢键环境更复杂,可能导致反应位点和路径不同.然而并没有关于·OH与反平行三链反应的报道,反应机理仍不清楚.

基于此,本文以反平行三链DNA碱基对GGC为模型,使用密度泛函理论(DFT)揭示了氢键对·OH与G碱基反应的影响.通过计算最高占据轨道(HOMO)并结合反平行三链结构分析,首先确定初始反应位点,随后构建生成G(-H2)·和8-oxoG可能路径的吉布斯自由能面,确定主反应通道,并通过自旋密度和自然键轨道(NBO)分析证实相关中间体的特征.研究结果阐明了·OH与G碱基在GGC碱基对中氢键依赖的反应机理,期望能为理解·OH引发的DNA氧化损伤提供新的视角.

1 计算方法

为了揭示氢键对G碱基与·OH反应的影响,直接选取反平行三链碱基对GGC作为模型进行计算(图1),并未考虑碱基对间的 π - π 堆积作用;且将G碱基C9位和C碱基N1位用甲基取代,该处理不会对G碱基相关反应产生影响.不同反应路径中涉及物质的电子结构优化在M06-2X/6-31++G(*d,p*)理论水平上进行,溶剂化效应采用极化连续介质模型(IEFPCM)模拟.M06-2X泛函可处理存在弱相互作用的体系^[31],近期已被用于处理DNA氧化损伤相关问题,且M06-2X泛函与IEFPCM模型结合已被证实可以取得与实验接近的结果^[32-37].计算中采用相同理论水平通过振动频率分析确认反应物、产物和过渡态,过渡态有且仅有一个虚频,反应物和产物无虚频;通过反应途径内禀坐标理论(IRC)确认优化得到的过渡态正确关联反应物和产物.为了得到更精确的能量,在IEFPCM/M06-2X/6-31++G(*d,p*)理论水平上进行单点能计算,吉布斯自由能面使用的能量为单点能与频率分析中得到的吉布斯自由能校正值求和.HOMO和自旋密度在IEFPCM/M06-2X/6-31++G(*d,p*)理论水平上计算得到.所有计算均使用Gaussian 16程序包进行^[38].

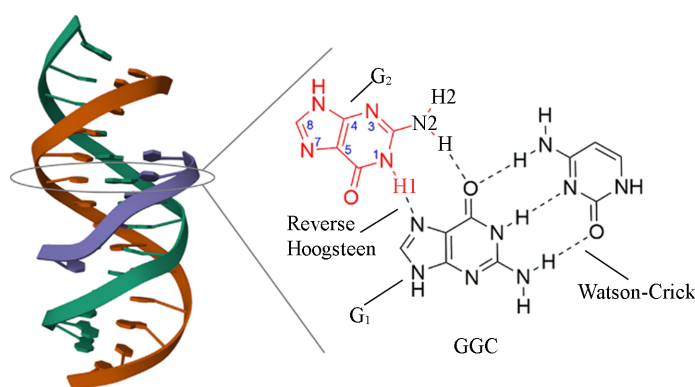


Fig. 1 Structure of triplex DNA and GGC motif

2 结果与讨论

如图1所示,在GGC碱基对平面中包含两个G碱基(G₁和G₂),因此需要确定·OH与其作用时初始的反应位点.由于GGC平面是由富含嘌呤的TFO通过反Hoogsteen氢键与目标双链中的均嘌呤链结合形成,导致目标双链中G碱基(G₁)被TFO保护,溶剂分子和·OH只能从原目标双链小沟处接近;而第三条链中G碱基(G₂)完全暴露于溶剂中,可能导致TFO中的G碱基(G₂)更容易受到·OH进攻作为初始反

应位点. 为了进一步确认该结论, 计算了GGC碱基对的HOMO. 如图2所示, 在GGC碱基对中, HOMO完全集中在第三条链中G碱基(G_2)上, 表明在GGC平面中 G_2 碱基优先与 $\cdot\text{OH}$ 反应, 与结构分析结果一致.

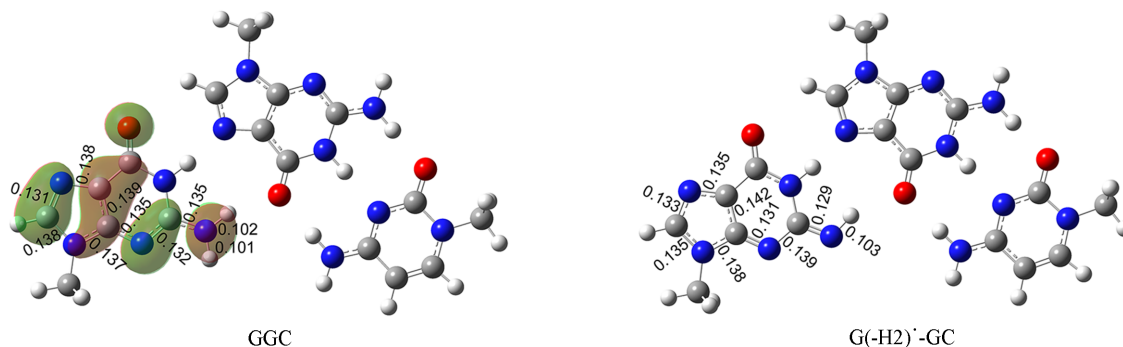


Fig. 2 Optimized geometries of GGC and $G(-\text{H}_2)\cdot\text{-GC}$, the HOMO of GGC obtained at IEFPCM/M06-2X/6-31++G(*d, p*) level of theory

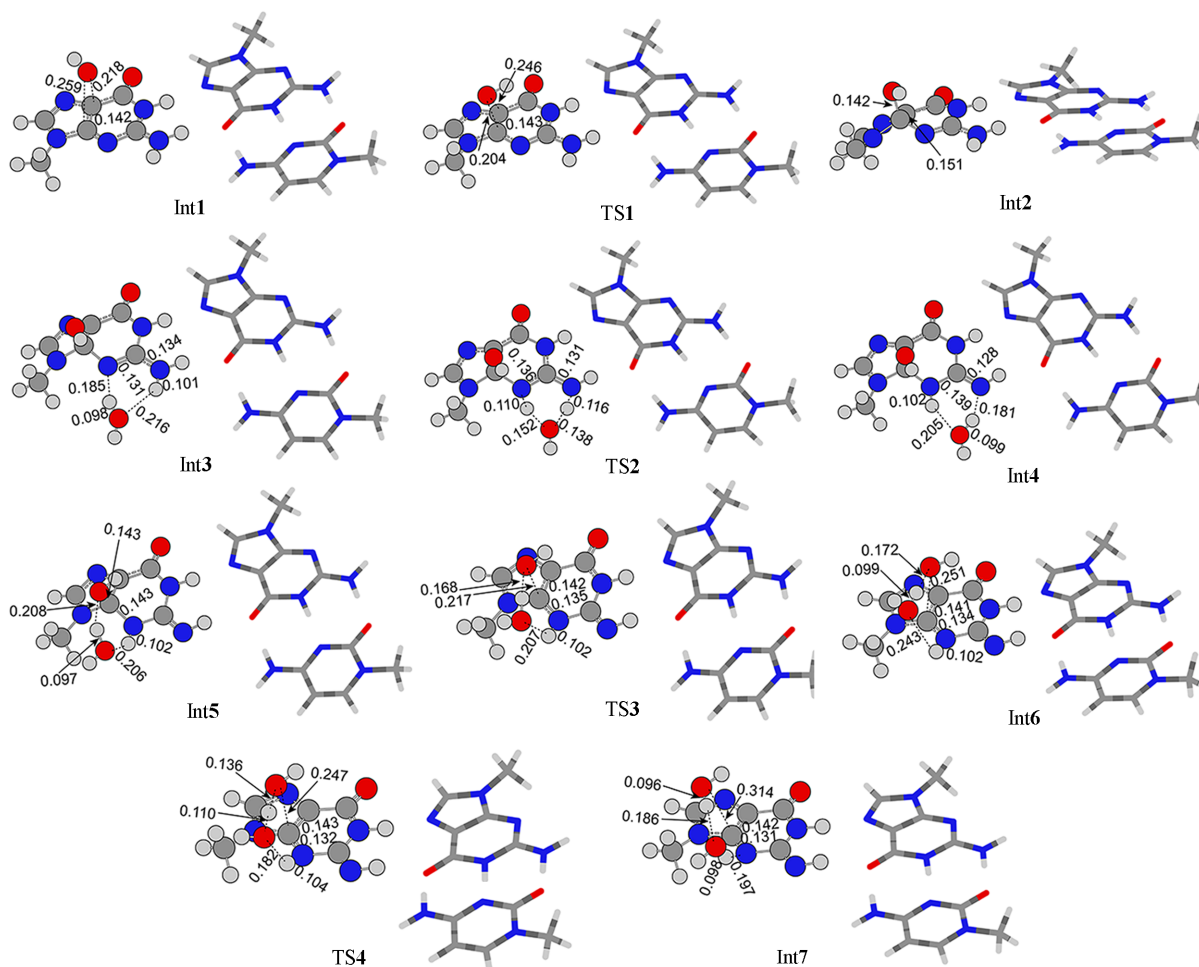
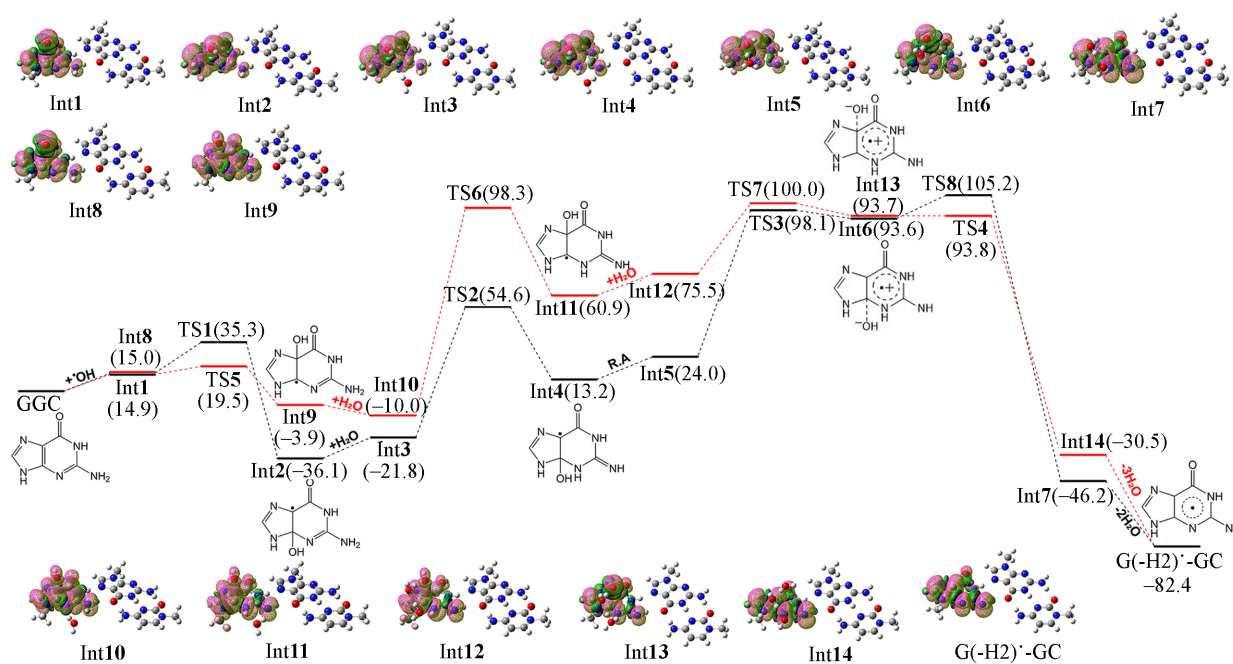
Oxygen, nitrogen, carbon and hydrogen atoms are denoted with red, blue, gray and white balls, respectively. The unit of bond distance is nm.

已有研究表明, $\cdot\text{OH}$ 与G碱基可能在C4, C5和C8位置发生加成反应, 或从环外氨基(NH_2)夺氢^[9,23]. 其中, 导致不同损伤产物最重要的中间体为鸟嘌呤中性自由基和8-oxoG. 因此, 为了阐明氢键对 $\cdot\text{OH}$ 与G碱基反应的影响, 主要预测了 $\cdot\text{OH}$ 通过加成/消除反应和夺氢反应形成中性自由基以及通过C8加成生成8-oxoG反应的吉布斯自由能面, 其中, 反平行三链碱基对GGC、 $\cdot\text{OH}$ 、氧气(O_2)和两个水分子记为能量零点. 优化的GGC和鸟嘌呤中性自由基 $G(-\text{H}_2)\cdot$ 和 $G(-\text{H}_1)\cdot$ 结构如图2和图S1(见本文支持信息)所示.

2.1 C4/C5加成及随后的衰变反应

首先, 探讨了 $\cdot\text{OH}$ 与GGC碱基对中 G_2 在C4和C5位通过加成/消除反应生成中性自由基的可能, 优化得到的吉布斯自由能面及相关物质结构见图3、图4和图S2(见本文支持信息). 从图4和图S2可见, C4和C5加成/消除路径开始于 $\cdot\text{OH}$ 对 G_2 中 $\text{C}_4=\text{C}_5$ 双键亲电配位形成Int1和Int8; 在Int1中, $\cdot\text{OH}$ 中的O与C4和C5的距离分别为0.259和0.218 nm, 比 $\text{C}-\text{O}$ 共价键长, C_4-C_5 键长为0.142 nm, 比GGC碱基对中稍长(0.139 nm), 表明在Int1中, $\cdot\text{OH}$ 与G碱基以非共价作用结合, 未生成C4羟基加合物, 且 $\text{C}_4=\text{C}_5$ 双键被部分活化, 计算的自旋密度显示出相同的趋势(图3), 部分自旋密度位于 G_2 碱基上; $\cdot\text{OH}$ 配位过程为去稳定化过程, 需吸热14.9 kJ/mol. 形成的Int8结构与Int1基本相同, 相对能量相差0.1 kJ/mol, 表明在C4和C5加成/消除路径中, 初始形成的配位化合物相同, 与GC碱基对中类似^[15], 不同于G-四链体DNA和 $\text{C}(\text{H}^+)\text{GC}$ 碱基对^[20,21], 这可能源于在GGC碱基对中 G_2 暴露程度与GC碱基对类似. 为了形成羟基化产物Int2和Int9, 配合物(Int1或Int8)中的 $\cdot\text{OH}$ 需进一步靠近 G_2 碱基中的C4或C5位点形成过渡态TS1和TS5; 在TS1中, $\cdot\text{OH}$ 中的O与C4和C5的距离分别为0.204和0.246 nm, 而TS5中分别为0.255和0.192 nm, 与形成不同位点羟基化产物趋势一致, $\text{C}_4=\text{C}_5$ 双键均被拉长至0.143 nm, 表明 $\cdot\text{OH}$ 与 G_2 碱基相互作用加强; $\cdot\text{OH}$ 与C4和C5加成反应分别放热51.0和18.9 kJ/mol, 反应能垒分别为20.4和4.5 kJ/mol, 表明 $\cdot\text{OH}$ 更倾向于C5加成, 但生成的 $\text{G}(\text{C}_4-\text{OH})\cdot$ 更稳定. 计算得到的C4和C5羟基化产物Int2和Int9为蝴蝶状的非平面结构, 与早期报道的自由G碱基结果一致^[12], 且自旋密度已全部位于 G_2 平面上; 其中, $\text{O}(\cdot\text{OH})\cdots\text{C}_4$ 和 $\text{O}(\cdot\text{OH})\cdots\text{C}_5$ 距离分别为0.142和0.145 nm, 为典型的 $\text{C}-\text{O}$ 单键, C_4-C_5 键分别被拉长至0.151和0.149 nm, 进一步表明羟基化产物已形成. 计算得到的反应热力学性质与Sevilla等^[12]前期关于 $\cdot\text{OH}$ 在显性水环境中与G碱基反应结果一致; 反应能垒高于自由G碱基、GC碱基对及G-四链体DNA^[12,15,18,20], 但低于平行三链DNA碱基对 $\text{C}(\text{H}^+)\text{GC}$ 中G碱基^[21], 这可能源于G碱基C4/C5位点在不同氢键环境中所带电荷不同.

关于自由G碱基的研究结果显示, 羟基化自由基会经过离子对中间体生成 $\text{G}(-\text{H}_1)\cdot$ ^[12]. 然而,



在GGC碱基对中, G₂碱基H1与目标双链中G₁碱基N7原子配位, H1位于Hoogsteen氢键中, 导致H1与羟基之间的水网络难以形成, 阻碍亚稳态的离子对中间体脱H1. 此外, 通过优化G₂(-H1)·-GC碱基对构型发现, 脱G₂碱基中H1使碱基对构型发生巨大变化(图S1), 在G₂(-H1)·-GC中G₂(-H1)·沿着碱基对平面旋转180°, 且只有N2—H与目标双链中G₁碱基O6间存在氢键作用, 在有碱基堆积作用时, 如此大的构型变化将被抑制. 因此, 即使在GGC环境中计算得到的G(-H1)·比G(-H2)·稳定1.0 kJ/mol, 但只研究了离子对中间体脱N2—H生成G(-H2)·的可能. 此处, 计算得到的中性自由基稳定性顺序与近期报道的G-四链体不同, 在G-四链体中, G(-H2)·为更稳定的中性自由基^[39], 但与自由G碱基和C(H⁺)GC碱基对一致^[11,21].

与自由G碱基不同, 羟基化自由基G(C4—OH)·和G(C5—OH)·去羟基之前, 会在水分子(H₂O)帮助下, 通过氢转移(HT)反应将G₂碱基上N2—H2转移至N3, 该过程将促进羟基化产物脱水^[20]. 水的引入会使Int2活化, H₂O配位至N3原子吸热14.3 kJ/mol, 形成的Int3稳定性更低, 且N2—H2键长从0.100 nm稍微拉长至0.101 nm. 该过程与近期报道的G-四链体和C(H⁺)GC碱基对中羟基化产物氢转移过程类似^[20,21]. 令人意外的是, H₂O配位至G(C5—OH)·中N3原子放热6.1 kJ/mol, 形成的配合物Int10更稳定, 可能导致随后的氢转移能垒升高, 与前期报道的结果不同. Int3和Int10作为HT反应物, 通过TS2和TS6生成氢转移中间体, 能垒分别为76.4和108.3 kJ/mol, 形成的Int4和Int11更不稳定, 相对于Int3和Int10, 反应分别吸热35.0和70.9 kJ/mol. 在该模型中, 外加水中一个O—H与羟基化产物中N2—H2, C2和N3形成六元环, 以减小环张力, 使HT反应能垒降低; 该结论通过计算无水参与的HT反应被证实, 在无水模型中, N2—H2, C2和N3形成四元环, 能垒分别为196.2和210.1 kJ/mol(图S3和图S4, 见本文支持信息).

氢转移中间体Int4和Int11分别吸热10.8和14.6 kJ/mol, 经重排或加水重排形成易于去羟基的中间体Int5和Int12; 在Int5中, 质子化的N3及OH基团通过H₂O连接, N3—H与H₂O中的O距离为0.206 nm, H₂O中的H与OH基团中的O距离为0.208 nm, C4—O距离为0.143 nm, C4—C5键长为0.151 nm; 而在Int12中, 两个外加水首先通过氢键连接, 其作为质子桥, 可将转移至N3原子的质子传输至OH基团, 与之键合形成H₂O, 质子桥与N3—H及OH基团中的O距离分别为0.200和0.191 nm, C5—O和C4—C5键长分别为0.144和0.149 nm; 外加H₂O显示出与氢转移中间体弱相互作用, 与计算的自旋密度结果一致, 大部分自旋密度集中于G₂上. Int5和Int12在水分子帮助下经过TS3和TS7形成OH离去中间体Int6和Int13, 该过程分别吸热69.6和18.2 kJ/mol, 能垒分别为74.1和24.5 kJ/mol. TS3中的C4—O和TS7中的C5—O键分别拉长至0.217和0.181 nm, 表现出离去的趋势, OH基团中的O与外加H₂O中的H距离缩短至0.168和0.171 nm, C4—C5键长缩短至0.142和0.143 nm, 表现出双键的性质; 随着反应的进行, Int6中的C4...O和Int13中的C5...O距离被进一步拉长至0.251和0.217 nm, OH基团与G₂碱基表现为更弱的作用, 自旋密度分布显示出相同的结果. Int6和Int13均展现出离子对的特征, 表现为自旋密度分布与鸟嘌呤自由基阳离子(G⁺)类似(图S5, 见本文支持信息), 且Int6和Int13中OH基团上负电荷分别由-0.270和-0.268 lel增加至-0.428和-0.441 lel, 相应的G₂碱基上正电荷分别由0.233和0.150 lel增大至0.357和0.355 lel(表1), 与Sevilla等^[12]报道的结果一致. 需要指出的是, 虽然形成的离子对中间体Int6和Int13相对能量基本相同, 但是由于Int13中包含2个外加H₂O, 而Int6中只有1个, 导致Int6和Int13结构不同. 此处, 计算得到的离子对中间体比羟基化自由基G(C4—OH)·和G(C5—OH)·更不稳定, 相对稳定能分别相差129.7和97.6 kJ/mol, 与自由G碱基中离子对中间体比

Table 1 Charge distribution of Int5, Int6, Int12 and Int13 obtained at IEFPCM/M06-2X/6-31++G(d, p) level

Int	Charge distribution/lel		
	OH group	G ₂	Extra water
5	-0.270	0.233	0.004
6	-0.428	0.357	-0.040
12	-0.268	0.150	-0.002
13	-0.441	0.355	-0.035

G(C4—OH) \cdot 和G(C5—OH) \cdot 稳定5.9和20.9 kJ/mol不同.

Int6和Int13能量较高,且G₂碱基上所带正电荷增加,使其具有G \cdot 的性质,因此其倾向于脱质子形成相对稳定的中性自由基G(-H2) \cdot .在Int6和Int13中,外加H₂O的排布及氢键方向与质子转移方向一致,因此,只需分别克服11.6和0.1 kJ/mol的能垒,经过TS4和TS8便可生成H₂O配位的G(-H2) \cdot (Int7和Int14),离子对中间体脱质子反应分别放热139.8和124.2 kJ/mol,从动力学和热力学角度都容易发生.在过渡态TS4和TS8中,N3—H键分别拉长至0.104和0.105 nm,外加H₂O中氧与N3—H距离分别缩短至0.182和0.167 nm,外加H₂O中的H与OH基团中的O距离分别缩短至0.136和0.130 nm,且处于质子桥中外加H₂O的O—H键拉长,N3—H通过外加H₂O形成的质子桥向脱去的OH基团转移的趋势,证实了上文对于外加H₂O作用的讨论;在Int7和Int14中,N3—H完全脱离N3束缚,表现为N3 \cdots H距离进一步分别拉长至0.197和0.192 nm,脱去的羟基得到一个H形成水分子.生成的Int7和Int14可解离释放中性自由基G(-H2) \cdot 和2/3个水分子,并分别放热36.2和51.9 kJ/mol.

综上, \cdot OH与GGC碱基对中G₂碱基通过C4/C5加成路径生成G(-H2) \cdot 为放热反应,决速步骤为水参与的N2—H2转移至N3反应,这与报道的 \cdot OH与G-四链体和C(H⁺)GC碱基对中C4/C5加成反应不同^[20,21],在以上两个体系中,C4加成路径决速步骤为去羟基生成离子对中间体反应,而C5加成路径为N2—H转移反应,该差异可能源于G碱基所处氢键环境不同,导致相应中间体的稳定性不同.此外,通过比较决速步骤能垒发现,在GGC碱基对中, \cdot OH通过C4加成路径生成G(-H2) \cdot 更容易进行,与文献[20,21]报道的在G-四链体和C(H⁺)GC碱基对中C5加成路径更容易进行不同.

2.2 夺N2—H2生成G(-H2) \cdot 反应路径

\cdot OH与G碱基也可通过直接夺氢反应生成中性自由基^[23],因此,也考察了 \cdot OH从G₂碱基夺氢的可能.与C4/C5加成反应类似,首先考虑 \cdot OH与反应位点N2—H2的配位作用.结果如图5(A)和(B)所

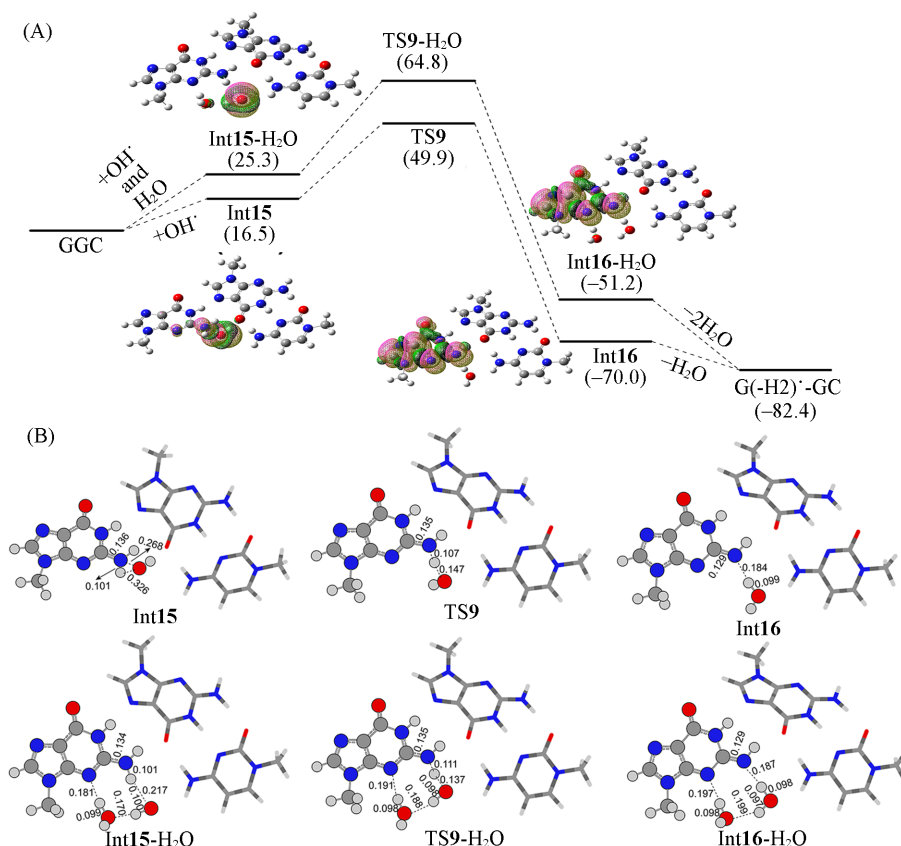


Fig. 5 Spin density and relative energy(kJ/mol) for related species along with hydrogen abstraction obtained at IEFPCM/M06-2X/6-31++G(d,p) and IEFPCM/M06-2X/6-311++G(d,p) level, respectively(A), optimized geometries for related species along with hydrogen abstraction obtained at IEFPCM/M06-2X/6-31++G(d,p) level(B)

示, $\cdot\text{OH}$ 会与 GGC 碱基对中 G_2 碱基配位形成配合物 Int15; 在 Int15 中, $\cdot\text{OH}$ 位于 GGC 平面下方, $\cdot\text{OH}$ 中 O 与 N2 及 H2 距离分别为 0.268 和 0.326 nm, 显示出极弱的相互作用, 与文献[20]报道的 G-四链体 DNA 中 G 碱基 N2—H2 与 $\cdot\text{OH}$ 形成的配合物稍有不同; 与计算的自旋密度结果一致[图 5(A)]; 从吉布斯自由能面看该过程吸热 16.5 kJ/mol, 与 G-四链体中相应过程类似. 随着反应进行, $\cdot\text{OH}$ 与 H2 距离逐渐减小且靠近 GGC 平面, 当 $\cdot\text{OH}$ 中 O 与 H2 距离为 0.147 nm, C2—N2—H2—O($\cdot\text{OH}$) 二面角为 93.5°, 形成过渡态 TS9; 且 N2—H2 距离稍微增大至 0.107 nm, C2=N2 键长由 0.136 nm 稍微缩短至 0.135 nm, 其能量比 Int15 高 33.4 kJ/mol. 经过 TS9 后, H2 继续靠近 $\cdot\text{OH}$ 中的 O, 当 O($\cdot\text{OH}$)—H2 距离为 0.099 nm 时形成水配位夺氢产物 Int16; N2 与 H2 距离为 0.184 nm, C2—N2—H2—O($\cdot\text{OH}$) 二面角为 174.0°, C2=N2 键长缩短至 0.129 nm. Int16 表现出比 Int15 更强的稳定性(86.5 kJ/mol), 表明 $\cdot\text{OH}$ 夺 H2 反应放热 12.4 kJ/mol 即可得到纯的 G(-H2) \cdot .

溶剂水的参与会促进 $\cdot\text{OH}$ 从 G 碱基夺氢^[20], 因此, 该反应也在 H_2O 参与时被模拟. H_2O 的引入可使 $\cdot\text{OH}$ 与 GGC 接近于共平面, C2—N2—H2—O($\cdot\text{OH}$) 二面角为 151.6°; 在形成的配合物 Int15- H_2O 中, 外加水中的 H 与 G_2 碱基 N3 配位, 距离为 0.181 nm, $\cdot\text{OH}$ 与 H2 配位, O($\cdot\text{OH}$) \cdots H2 距离为 0.217 nm; 与无水模型类似, 配合物形成过程吸热 25.3 kJ/mol. 在水参与的 $\cdot\text{OH}$ 夺 H2 反应过渡态 TS9- H_2O 中, C2—N2—H2—O($\cdot\text{OH}$) 二面角为 94.5°, $\cdot\text{OH}$ 趋向于移动至 GGC 平面下方, 与无水模型不同, O($\cdot\text{OH}$) \cdots H2 距离缩短至 0.137 nm, N2—H2 键稍微拉长至 0.111 nm, H2 表现为离去的趋势; 相对于 Int15- H_2O , 该反应能垒为 39.5 kJ/mol, 水的加入使 $\cdot\text{OH}$ 夺氢反应能垒增大, 与文献[20,21]报道的 G-四链体和 C(H⁺)GC 碱基对中 $\cdot\text{OH}$ 直接夺氢结果不同. 在 2 H_2O 配位的中性自由基 Int16- H_2O 中, N2—H2 键已断裂, O($\cdot\text{OH}$)—H2 键形成, N2 \cdots H2 距离为 0.187 nm, O($\cdot\text{OH}$)—H2 键长为 0.098 nm; 与无水模型类似, C2=N2 键长由 0.135 nm 缩短至 0.129 nm. 水参与的 $\cdot\text{OH}$ 夺 H2 反应也为放热反应, 相对于 Int15- H_2O 放热 76.5 kJ/mol. 与无水模型类似, Int16- H_2O 解离水分子放热 31.2 kJ/mol.

综上, $\cdot\text{OH}$ 与 GGC 碱基对中 G_2 碱基反应生成 G(-H2) \cdot 的主要路径为直接夺氢路径, 无水和有水参与过程的能垒分别为 33.4 和 39.5 kJ/mol; C4 路径可能与直接夺氢路径竞争, 通过该路径生成 G(-H2) \cdot 要经过 $\cdot\text{OH}$ 加成、N2—H2 转移、OH 离去、H 转移及水解离等反应, 其中, N2—H2 转移为决速步骤, 能垒为 76.4 kJ/mol.

值得注意的是, 在 C4 和 C5 加成路径中, 对于 OH 离去及离子对中间体脱质子反应, 在优化得到的反应物、产物和过渡态结构中, OH 基团和外加 H_2O 主要位于 GGC 碱基对平面上方, 强调了溶剂可及性; 虽然在反平行三链中, 位于 TFO 中的 G_2 碱基 C4 和 C5 原子暴露于溶剂中, 可确保溶剂的进入, 通过 C4 加成路径生成 G(-H2) \cdot 可行. 然而, 在真实的 DNA 环境中, 除溶剂的可及性, 还需要考虑碱基对之间的 π - π 堆积作用; 在 DNA 双链中, $\cdot\text{OH}$ 与 G 碱基反应会使碱基对变形, 这种变形会影响反应中间体的稳定性, 并使反应能垒增大^[18]; 因此, 可以预测在反平行三链中, 生成 G(-H2) \cdot 主要反应路径应为直接夺氢, C4/C5 加成路径会被抑制.

2.3 C8 加成生成 8-oxoG 反应路径

在自由 G 碱基中, C8 加成为次要反应路径(18%)^[9], 但在 DNA 环境中, C8 加成路径比重增加. 因此, 探索了 GGC 碱基对中 $\cdot\text{OH}$ 与 G_2 反应生成 8-oxoG 的可能.

如图 6 和图 7 所示, 该反应由 $\cdot\text{OH}$ 亲电攻击 N7=C8 双键开始, 在初始形成的加合物 Int17 中, O($\cdot\text{OH}$) \cdots C8(G_2) 及 H($\cdot\text{OH}$) \cdots N7(G_2) 距离分别为 0.264 和 0.231 nm, 表现为弱的非共价结合, 计算的自旋密度主要集中在 $\cdot\text{OH}$ 上, 也证实了该结论, N7=C8 键键长从 0.131 nm 轻微拉长至 0.132 nm, 趋向于被活化; 该过程需吸热 16.3 kJ/mol. 与 C4 和 C5 加成类似, Int17 中的 $\cdot\text{OH}$ 会继续接近 G_2 碱基 C8 原子, 经过过渡态 TS10 后形成 C8 羟基化产物 Int18. 在 TS10 中, O($\cdot\text{OH}$) \cdots C8(G_2) 距离减小到 0.228 nm, 表明 GGC 碱基对与 $\cdot\text{OH}$ 相互作用增强; N7=C8 继续被拉长至 0.133 nm, 进一步被活化. 在 Int18 中, O($\cdot\text{OH}$) \cdots C8(G_2) 距离为 0.140 nm, 表明 C—O 键形成, N7=C8 距离变为 0.145 nm, 已无双键性质, 表明 C8 羟基化过程已完成, 计算的自旋密度与 C4/C5 羟基化产物类似, 自旋密度主要位于 G_2 碱基; 能量

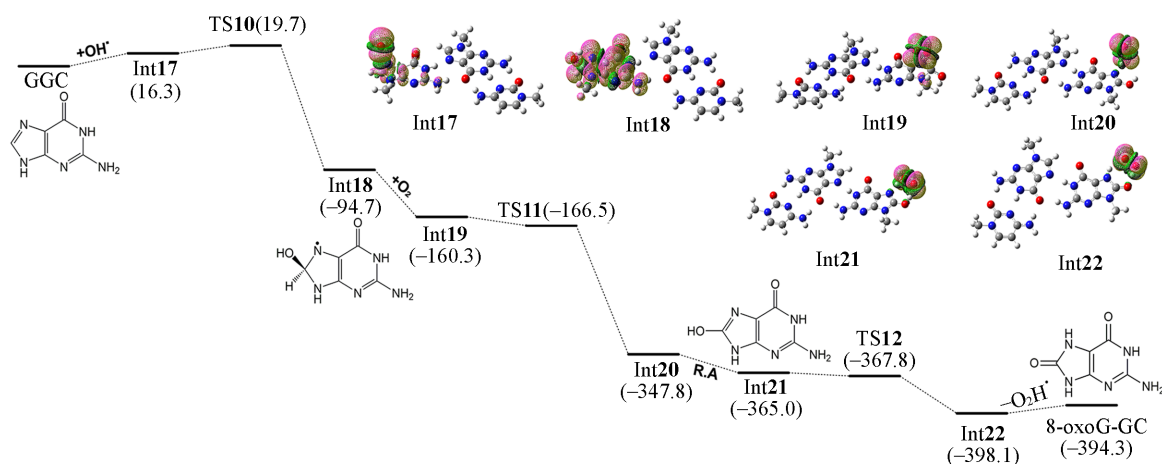


Fig. 6 Spin density and relative energy(kJ/mol) for related species along with C8 pathway obtained at IEFPCM/M06-2X/6-31++G(d,p) and IEFPCM/M06-2X/6-31++G(d,p) level, respectively

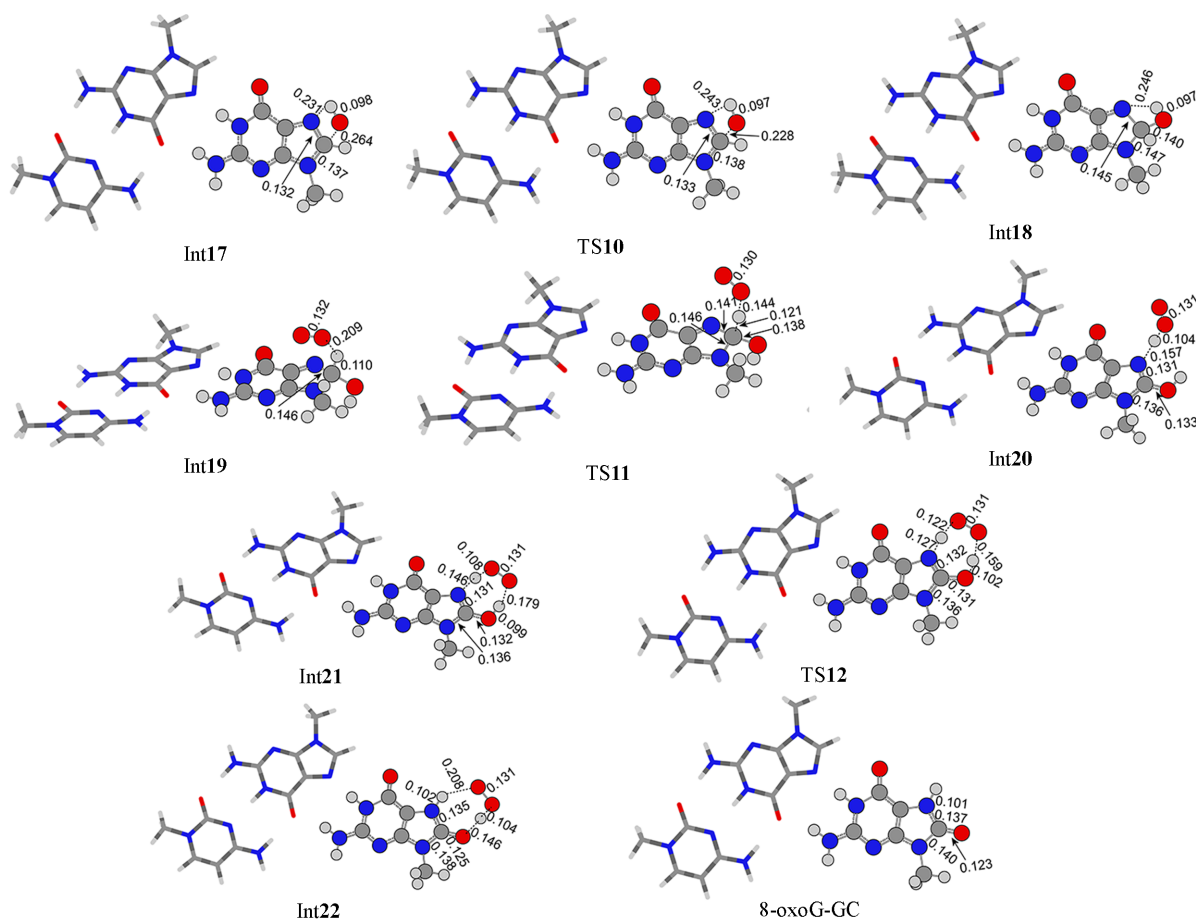


Fig. 7 Optimized geometries for related species along with C8 pathway obtained at IEFPCM/M06-2X/6-31++G(d,p) level

计算显示, C8加成反应能垒较低, 相对于Int17仅为3.4 kJ/mol, 放热111.0 kJ/mol.

虽然形成的C8羟基化自由基(Int18)较稳定, 但当氧气(O₂)从C8—OH背面靠近时, 可形成更加稳定的配位中间体Int19, 该过程放热65.6 kJ/mol, 与G-四链体中类似, 但在C(H⁺)GC碱基对中该过程吸热16.3 kJ/mol^[20,21]. 在Int19中, C8—H键长为0.110 nm, C8—H与O₂中O距离为0.209 nm, 表现为弱相互作用, N7—C8键长为0.146 nm, 有单键性质, 自由基已集中于N7, C8原子和O₂上. Int19经过TS11较易形成脱氢产物Int20, 能垒为负值(-6.2 kJ/mol), 放热高达187.5 kJ/mol, 该反应特征与近期

报道的G-四链体和平行三链一致^[20,21],也符合自由G碱基中G(C8—OH)·与O₂反应很快的结果(4×10⁹ s⁻¹)^[9].在TS11中,O₂中的O与C8—H距离缩短至0.144 nm,C8—H键长增大至0.121 nm,C8—H键被活化且H向O₂转移,N7—C8键进一步缩短至0.141 nm;在Int20中,C8—H键断裂,H已完全转移至O₂分子上,形成·HO₂,其更靠近N7原子,距离为0.157 nm;自旋密度计算也证实自由基已转移至HO₂基团,形成烯醇式的8-oxoG(8-OH-G).

因为8-OH-G在溶液中不稳定,需通过异构化形成更稳定的酮式构型8-oxoG.Int20并不是合适的异构化反应物,其中,·HO₂需要重排至合适位置,使H(·HO₂)原子与N7(G₂)配位,O与羟基中的H形成氢键,距离分别为0.146和0.179 nm;·HO₂的作用类似于C4/C5加成路径中的外加H₂O,充当质子桥角色,使羟基上的H转移至N7原子;该重排反应放热17.2 kJ/mol.形成的Int21经过TS12便可产生·HO₂配位的8-oxoG(Int22).在TS12中,羟基中O—H键拉长至0.102 nm,O(·HO₂)与羟基H距离缩短至0.159 nm,·HO₂中H位于N7(G₂)和O(·HO₂)之间,距离分别为0.127和0.122 nm,表现出羟基H离去且N7质子化的趋势.在Int22中,N7—H键形成,键长为0.102 nm,羟基H转移至O₂形成O—H键,C8—O距离缩短至0.125 nm,表明C=O形成.·HO₂帮助的异构化过程极易发生,能垒为-2.8 kJ/mol,且放热33.1 kJ/mol.自旋密度计算也证实了·HO₂在异构化反应中的催化作用.需要指出的是,Int22为·HO₂配位的8-oxoG-GC,需要与·HO₂解离才能形成纯的8-oxoG-GC(图6),·HO₂解离需吸热3.8 kJ/mol.

计算结果显示,在GGC碱基对中,生成8-oxoG需经过C8加成、O₂帮助的脱氢及·HO₂帮助的异构化等反应,其中,C8加成反应为决速步骤,能垒为3.4 kJ/mol.C8加成路径能垒小于直接夺氢路径(33.4 kJ/mol),表明在GGC碱基对中,主要反应路径应为C8加成生成8-oxoG,但是直接夺氢反应可能与其竞争导致G(-H2)·生成.此外,由于碱基堆积对于直接夺氢和C8加成路径影响很小,该结论也可推广至真实的反平行三链DNA中.因此,反平行三链DNA与·OH反应后可能会导致8-oxoG及由中性自由基衰变导致的产物,与前期报道的G-四链体DNA类似^[20].

应该注意的是,计算中溶剂效应使用IEFPCM模型模拟,显性水分子与IEFPCM模型结合会取得与实验更接近的结果;因此,在显性水分子存在时,对C4,C5和C8路径中的决速步骤进行模拟.根据文献[34],在反应位点附近的水分子会对相关反应产生影响;基于该结论,结合反平行三链DNA晶体结构,并且为了节省计算资源,在G₂碱基O6,N7及N2附近添加3个水分子(图S6,见本文支持信息).从计算结果看,显性水分子的加入对C4路径决速步骤能垒及吸热量影响不大,但对于C5和C8路径决速步骤能垒和反应吸放热量影响较大.C5路径中能垒及吸热量都变小,C8路径中能垒变大,放热量变小,具体见本文支持信息表S1.显然,要获得更精确的能量或研究·OH与反平行三链的反应,可能需要使用显性水分子+IEFPCM模型处理溶剂化效应.

3 结 论

通过选取反平行三链结构单元GGC碱基对为模型研究了氢键对·OH与G碱基反应的影响.结果表明,氢键对·OH与G碱基反应位点、反应中间体稳定性及反应路径有很大影响.在反平行三链中,TFO中的G碱基作为初始反应位点,且由于氢键对H1的保护,在GGC碱基对中更易生成G(-H2)·,而非更稳定的G(-H1)·;C4,C5和C8加成自由基稳定性顺序为C8>C4>C5,和自由G碱基、G-四链体及C(H⁺)GC碱基对中相同,但形成的离子对中间体稳定性远低于羟基化产物;·OH与GGC碱基对中G₂碱基主反应通道为C8加成路径,但直接夺氢路径可能与其竞争,与G-四链体类似,但与平行三链DNA不同.在C4/C5加成路径中溶剂H₂O分子的参与可降低反应能垒,但在夺氢路径中外加H₂O分子不利于反应发生;在C8加成路径中O₂极大促进了8-oxoG的生成.研究结果揭示了G碱基与·OH氢键依赖的衰变反应,有望为澄清·OH引起的DNA氧化损伤机理提供有价值信息,也可为解释非B型DNA容易成为氧化损伤热点区域等问题提供理论依据.

支持信息见 <http://www.cjcu.jlu.edu.cn/CN/10.7503/cjcu20240208>.

参 考 文 献

- [1] Fleming A. M., Burrows C. J., *Chem. Soc. Rev.*, **2020**, 49(18), 6524—6528
- [2] Halliwell B., Adhikary A., Dingfelder M., Dizdaroglu M., *Chem. Soc. Rev.*, **2021**, 50(15), 8355—8360
- [3] Cadet J., Douki T., Ravanat J. L., *Free Radical Bio. Med.*, **2010**, 49(1), 9—21
- [4] Chatgililoglu C., Ferreri C., Krokidis M. G., Masi A., Terzidis M. A., *Free Radical Res.*, **2021**, 55(4), 384—404
- [5] Fleming A. M., Burrows C. J., *Free Radical Bio. Med.*, **2017**, 107, 35—52
- [6] Chatgililoglu C., Ferreri C., Terzidis M. A., *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, 40(3), 1368—1382
- [7] O'Neill P., *Radiat Res.*, **1983**, 96(1), 198—210
- [8] Fleming A. M., Muller J. G., Ji I. S., Burrows C. J., *Org. Biomol. Chem.*, **2011**, 9(9), 3338—3348
- [9] Candeias L. P., Steenken S., *Chem. Eur. J.*, **2000**, 6(3), 475—484
- [10] Jena N. R., Mishra P. C., *J. Phys. Chem. B*, **2005**, 109(29), 14205—14218
- [11] Chatgililoglu C., Caminal C., Guerra M., Mulazzani Q. G., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, 44(37), 6030—6032
- [12] Kumar A., Pottiboyina V., Sevilla M. D., *J. Phys. Chem. B*, **2011**, 115(50), 15129—15137
- [13] Chatgililoglu C., D'Angelantonio M., Kciuk G., Bobrowski K., *Chem. Res. Toxicol.*, **2011**, 24(12), 2200—2206
- [14] Abolfath R. M., Biswas P. K., Rajnarayanam R., Brabec T., Kodym R., Papiez L., *J. Phys. Chem. A*, **2012**, 116(15), 3940—3945
- [15] Li M. J., Diao L., Liao X. F., Kou L., Lu W. C., *J. Phys. Org. Chem.*, **2015**, 28(6), 437—444
- [16] Milhoj B. O., Sauer S. P. A., *Chem. Eur. J.*, **2015**, 21(49), 17786—17799
- [17] Zheng L. W., Dai X. J., Su H. M., Greenberg M. M., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2020**, 59(32), 13406—13413
- [18] Yamabe S., Tsuchida N., Yamazaki S., *J. Phys. Chem. B*, **2020**, 124(8), 1374—1382
- [19] Lespade L., Bercion S., *Chem. Phys.*, **2022**, 554, 111386
- [20] Wang Y., Wei S., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2023**, 25(23), 16126—16134
- [21] Wang Y., Wei S., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2024**, 26(6), 5683—5692
- [22] Grüber R., Aranda J., Bellili A., Tuñón I., Dumont E., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2017**, 19(22), 14695—14701
- [23] Chatgililoglu C., D'Angelantonio M., Guerra M., Kaloudis P., Mulazzani Q. G., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, 48(12), 2214—2217
- [24] Harms-Ringdahl P. S. A. M., *Radiat. Res.*, **1999**, 151, 605—616
- [25] Fleming A. M., Burrows C. J., *Chem. Res. Toxicol.*, **2013**, 26(4), 593—607
- [26] Dalla Pozza M., Abdullrahman A., Cardin C. J., Gasser G., Hall J. P., *Chem. Sci.*, **2022**, 13(35), 10193—10215
- [27] Song Y. J., Feng L. Y., Ren J. S., Qu X. G., *Nucleic Acids Res.*, **2011**, 39(15), 6835—6843
- [28] Chen J., Tang Q. N., Guo S. W., Lu C., Le S. M., Yan J., *Nucleic Acids Res.*, **2017**, 45(17), 10032—10041
- [29] Li N., Wang J. L., Ma K. K., Liang L., Mi L. P., Huang W., Ma X. F., Wang Z. Y., Zheng W., Xu L. Y., Chen J. H., Yu Z. B., *Nucleic Acids Res.*, **2019**, 47(15), e86
- [30] Wang Y. H., Zhao H. M., Zhou Q., Dai X. J., Liu K. H., Song D., Su H. M., *J. Phys. Chem. B*, **2019**, 123(13), 2853—2863
- [31] Zhao Y., Truhlar D. G., *Theor. Chem. Acc.*, **2008**, 120(1), 215—241
- [32] Wang Y. H., Jie J. L., Zhao H. M., Bai Y., Qin P. X., Song D., *Acta Chimica Sinica*, **2018**, 76(6), 475—482
- [33] Wang Y. H., Wei S. M., Duan J. W., Wang K., *Acta Chimica Sinica*, **2021**, 79(9), 1164—1172
- [34] Wang Y. H., Wei S. M., Wang K., Xu R. R., Zhao H. M., *Acta Chimica Sinica*, **2020**, 78(3), 271—278
- [35] Wei S. M., Wang Y. H., Zhao H. M., *Acta Chimica Sinica*, **2019**, 77(3), 278—286
- [36] Wei S. M., He Q. H., Duan J. W., Zheng H. Y., Ma L., Wang Y. H., *ChemPhysChem*, **2023**, 24(3), e202200625
- [37] Wei S. M., Zhang Z. H., Liu S. J., Wang Y. H., *New J. Chem.*, **2021**, 45(25), 11202—11212
- [38] Frisch M. J., Trucks G. W., Schlegel H. B., Scuseria G. E., Robb M. A., Cheeseman J. R., Montgomery J. A., Vreven T., Kudin K. N., Burant J. C., Millam J. M., Iyengar S. S., Tomasi J., Barone V., Mennucci B., Cossi M., Scalmani G., Rega N., Petersson G. A., Nakatsuji H., Hada M., Ehara M., Toyota K., Fukuda R., Ha-segawa J., Ishida M., Nakajima T., Honda Y., Kitao O., Nakai H., Klene M., Li X., Knox J. E., Hratchian H. P., Cross J. B., Bakken V., Adamo C., Jaramillo J., Gomperts R., Stratmann R. E., Yazyev O., Austin A. J., Cammi R., Pomelli C., Ochterski J. W., Ayala P. Y., Morokuma K., Voth G. A., Salvador P., Dannenberg J. J., Zakrzewski V. G., Dapprich S., Daniels A. D., Strain M. C., Farkas O., Malick D. K., Rabuck A. D., Raghavachari K., Foresman J. B., Ortiz J. V., Cui Q., Baboul A. G., Clifford S., Cioslowski J., Stefanov B. B., Liu G., Liashenko A., Piskorz P., Komaromi I., Martin R. L., Fox D. J., Keith T., Al-Laham M. A., Peng C. Y., Nanayakkara A., Challacombe M., Gill P. M. W., Johnson B., Chen W., Wong M. W., Gonzalez C., Pople J. A., *Gaussian 16, Revision A.03*, Gaussian Inc., Wallingford CT, **2016**
- [39] Kumar A., Sevilla M. D., *J. Phys. Chem. B*, **2022**, 126(7), 1483—1491

(Ed.: Y, K, S)