

水对 5-氟尿嘧啶质子转移影响规律的研究*

胡兴邦 李浩然 梁婉春 韩世钧

(浙江大学化学系, 杭州 310027)

摘要 采用密度泛函理论(DFT)B3LYP方法, 在 6-311++G(d, p)基组上研究了由质子转移引起的 5-氟尿嘧啶(5-FU)的异构化反应. 共研究了38个含水与不含水的构型, 其中包括15个过渡态结构. 研究发现, 在5-氟尿嘧啶周围存在两类不同的区域, 在其中一类区域中, 水分子能促进质子转移的发生; 而在另一类区域中, 水分子却能阻碍质子转移的发生. 通过与尿嘧啶质子转移过程相比较, 发现在各种情况下 5-氟尿嘧啶异构化为烯醇式的几率均比尿嘧啶的大, 在一定程度上解释了为什么 5-氟尿嘧啶具有优良抗癌作用的同时具有一定的毒副作用.

关键词: 密度泛函理论, 5-氟尿嘧啶, 质子转移, 异构化, 水

中图分类号: O642

5-氟尿嘧啶在临床上是一种经常使用的抗癌药物, 其在体内能够转化为 5-氟尿嘧啶脱氧核苷酸(F-dUMP)^[1-2]. F-dUMP 能够不可逆地抑制胸腺嘧啶核苷酸激酶的合成, 阻断代谢环节, 影响DNA的生物合成, 从而抑制肿瘤细胞的生长. 虽然它对多种癌症都有较好的疗效, 但同时也具有一定的毒副作用^[3-4]. 5-氟尿嘧啶具有毒副作用的原因至今仍不为人所知.

生物体内由质子转移而引起的生物碱基异构化是引起基因突变的一个重要原因, 因此生物分子的质子转移一直吸引着众多研究者的兴趣^[5-7]. 孤立的生物分子内质子转移其活化能往往是比较高的, 后来的研究发现, 水分子能够促进质子转移的发生, 使反应的活化能极大地降低^[8-10].

我们^[11-14]最近的研究发现, 生物分子周围的水分子在质子转移过程中的作用并不是单一的, 虽然在某些区域的水分子能促进质子转移的发生(水分子对生物分子的诱变性), 但在另一些区域的水分子却能阻碍质子转移的发生(水分子对生物分子的稳定性). 利用此现象, 我们提出了一条全新的 5-溴尿嘧啶导致基因突变的机理^[15].

5-氟尿嘧啶(5-FU)在水诱变或保护下的质子转移过程是怎么样的?到目前为止还未见文献报道. 为了研究 5-氟尿嘧啶所有可能的质子转移过程, 并探索 5-氟尿嘧啶具有毒副作用的机理, 我们采用密度

泛函的方法研究了孤立的 5-氟尿嘧啶与质子转移相关的所有可能的异构体与过渡态, 以及其与水分子作用后与质子转移相关的所有可能的异构体与过渡态, 重点考察水分子对 5-氟尿嘧啶的诱变性及稳定性的影响.

1 计算方法

5-氟尿嘧啶可能的异构体共有 12 个, 但其中只有 5 个与质子转移有关, 其余 7 个与质子旋转有关. 对于 5-氟尿嘧啶, 由于质子旋转过程发生在质子转移过程之后, 本文不对其进行研究.

Gaigeot等^[16-17]的研究表明, 对嘧啶体系B3LYP与MP2获得的结果比较类似, 鉴于B3LYP具有较快的计算速度与优良的计算精度, 本文在B3LYP/6-311++G(d, p)水平下对所有构型进行全自由度优化. 构型优化, 能量、频率计算以及零点能校正均在同一理论方法下进行. 通过振动频率分析来确认过渡态, 所有过渡态均有且仅有一个虚振动频率, 而所有的反应物及产物均不存在虚振动频率. 文中5-氟尿嘧啶及其异构体和水分子的结合能由如下公式给出:

$$\Delta E_b = E_{\text{comp}} - \sum E_{\text{single}}$$

其中 E_{comp} 为氟尿嘧啶-水复合物经零点能校正的热焓, E_{single} 为相应氟尿嘧啶或水分子单体经零点能校正的热焓. 所有计算采用 Gaussian98 程序进行^[18].

2 结果与讨论

2.1 孤立的 5-氟尿嘧啶的质子转移过程

由图1可见,在所有异构体中,双酮式的5-氟尿嘧啶(FU)要比其他4个异构体(FU2^{*}、FU3^{*}、FU4^{*}、FU24^{*})稳定.5-氟尿嘧啶一共有5种可能的质子转移通道:(1)~(2)质子从5-氟尿嘧啶N₁转移到O₇,FU→FU2^{*}和FU4^{*}→FU24^{*}; (3)从N₁转移到O₈,FU→FU3^{*}; (4)~(5)从N₄转移到O₈,FU→FU4^{*}和FU2^{*}→FU24^{*}(见图1).但这些质子转移过程却有较大的区别.FU→FU3^{*}过程的活化能要高于其他所有过程,同时FU3^{*}也是所有异构体中最不稳定的一个.FU2^{*}→FU24^{*}和FU4^{*}→FU24^{*}的活化能要明显低于其他三个异构化过程,这是由于FU2^{*}、FU4^{*}和FU24^{*}三者热力学上稳定性均较差,它们之间的互变过程变得相对容易.从表1(A部分)可以看出,不论从热力学还是动力学上考虑,5-氟尿嘧啶异构化成FU3^{*}、FU4^{*}和FU24^{*}的几率要比尿嘧啶(U)异构化成U3^{*}、U4^{*}和U24^{*}的大,而烯醇式的嘧啶碱基的出现往往是引起基因突变的一个重要原因^[5-7,15],也就是说与尿嘧啶相比,5-氟尿嘧啶更容易异构化从而与错误的碱基配对而引起基因突变.

2.2 5-氟尿嘧啶在有水参与情况下的质子转移

生物分子都是处在一个充满水的环境中的,而水分子往往对生物分子的各种生物性质具有重要的作用.我们研究了5-氟尿嘧啶在有水参与情况下的质子转移.在5-氟尿嘧啶的周围共有4个水分子的结合位点,在图2中分别以S1、S2、S3和S4来表示不同的结合位点.当在5-氟尿嘧啶的S1位有一个水分子时我们将其表示为FU-W1,其余以此类推.

尽管5-氟尿嘧啶的各种异构体与水分子的结合能存在较大数量差异(表2),但所有结合能均为负

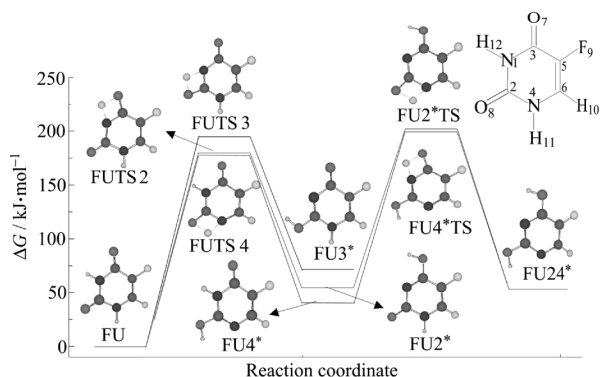


图1 孤立的5-氟尿嘧啶的质子转移通道

Fig.1 The proton transfer pathways in isolated 5-fluorouracil

表1 5-氟尿嘧啶异构化过程的吉布斯自由能变 $\Delta G(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$ 、吉布斯活化自由能变 $\Delta^{\ddagger}G(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$ 以及过渡态虚振动频率数据

Table 1 The Gibbs free energy changes, $\Delta G(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$ and the Gibbs activation free energy changes, $\Delta^{\ddagger}G(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$, of the tautomerizing processes of 5-fluorouracil and the corresponding imaginary frequencies, ν_i , at the transition states

Tautomerism	$\Delta G(\text{FU})$	$\Delta G(\text{U})^{\text{①}}$	$\Delta^{\ddagger}G(\text{FU})$	$\Delta^{\ddagger}G(\text{U})^{\text{①}}$	ν_i/cm^{-1}
A FU→FU2 [*]	54.37	51.33	179.60	173.41	1911.6i
FU→FU3 [*]	71.45	81.10	194.85	200.05	1908.5i
FU→FU4 [*]	40.74	48.41	177.45	178.02	1907.2i
FU2 [*] →FU24 [*]	-1.26	5.87	147.55	161.85	1892.2i
FU4 [*] →FU24 [*]	12.53	9.12	157.94	165.65	1896.3i
B FU-W2→FU2 [*] -W2	43.21	40.49	65.41	63.85	1433.6i
FU-W3→FU3 [*] -W3	53.43	63.40	71.57	77.37	1374.6i
FU-W4→FU4 [*] -W4	37.29	43.82	59.53	63.05	1452.7i
FU2 [*] -W4→FU24 [*] -W4	5.21	14.08	44.24	47.26	1573.4i
FU4 [*] -W2→FU24 [*] -W2	12.50	10.06	47.68	46.21	1453.5i
C FU-W1→FU2 [*] -W1	56.33	58.36	176.27	179.45	1896.3i
FU-W4→FU3 [*] -W4	76.25	87.11	193.63	200.38	1898.3i
FU-W3→FU4 [*] -W3	49.62	54.41	177.03	178.18	1901.3i
FU2 [*] -W3→FU24 [*] -W3	6.61	9.22	151.44	153.83	1887.9i
FU4 [*] -W1→FU24 [*] -W1	20.40	19.55	160.22	155.18	1889.3i

①taken from Ref.[14]

值,这表明水分子在S1、S2、S3和S4区域与5-氟尿嘧啶结合在能量上均是可行的.对双酮式的5-氟尿嘧啶而言,其一水合物的稳定性顺序为:FU-W4 > FU-W2 > FU-W3 > FU-W1,与双酮式的尿嘧啶-水合物的稳定性顺序相同^[11].

2.2.1 水分子促进5-氟尿嘧啶质子转移

我们^[11]早期的研究发现水分子能够促进尿嘧啶的质子转移过程.在本文中发现,当水分子处在S2、

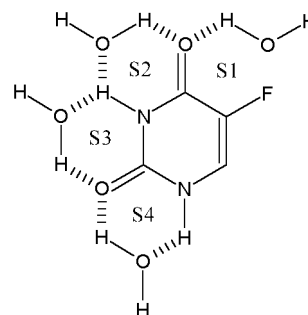


图2 5-氟尿嘧啶周围水的结合位点

Fig.2 Preferential sites of water molecules in the vicinity of 5-FU

表 2 5-氟尿嘧啶各种异构体与水的结合能($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)Table 2 Binding energies ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) of 5-fluorouracil tautomers to water molecule

Compound	$-\Delta E_b$	Compound	$-\Delta E_b$	Compound	$-\Delta E_b$
FU-W1	15.46	FU3*-W3	50.42	FU4*-W2	37.07
FU-W2	30.87	FU3*-W4	26.77	FU24*-W2	38.70
FU-W3	29.58	FU4*-W3	19.18	FU2*-W3	19.71
FU-W4	35.87	FU4*-W4	40.74	FU24*-W3	9.76
FU2*-W1	8.84	FU4*-W1	15.26	FU2*-W4	41.26
FU2*-W2	44.87	FU24*-W1	7.70	FU24*-W4	35.39

S4位, 质子从FU分别转移到FU2*、FU4*, 从FU4*、FU2*转移到FU24*时, 以及当水分子处在S3位, 质子从FU转移到FU3*时(图3), 水分子也同样对5-氟尿嘧啶的质子转移过程具有促进作用. 我们称这些水分子能促进质子转移的区域为诱变区域.

在这些水分子促进质子转移的过程中, 5-氟尿嘧啶 N—H 键上的氢原子转移到水分子上, 同时水分子上的另一个氢原子转移到5-氟尿嘧啶C=O键上, 所有过渡态均对应于一个双质子转移的过程. 它们的过渡态均以六元环的形式出现, 此六元环对于降低过渡态的能量具有重要的意义. 此外, 处在诱变区域的水分子还使其形成氢键的氧原子周围的局部电子密度增加(见表 3), 使得氧原子更容易被质子进攻. 同时使参与转移的氢原子周围局部电

表 3 水合前后 5-氟尿嘧啶上原子电荷($Q/|e|$)Table 3 Atomic charge ($Q/|e|$) of 5-fluorouracil with and without water

	O ₇	O ₈	H ₁₂	H ₁₁
FU	-0.304	-0.339	0.364	0.347
FU-W2	-0.341	-0.328	0.451	0.358
FU-W3	-0.298	-0.381	0.452	0.347
FU-W4	-0.304	-0.389	0.364	0.433
FU2*-W4	-0.180	-0.378	0.312	0.418
FU4*-W2	-0.362	-0.191	0.443	0.318

子密度减少(见表 3), 从而更容易进攻电负性的氧原子. 从表 1(B 部分)可见, 当水分子处在图 3 所示位置时, 与孤立的 5-氟尿嘧啶的质子转移过程相比, 水分子使质子转移的活化能降大大的降低, 降低幅度从 $103.31 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 到 $123.28 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. 同时除 FU2*-W4→FU24*-W4 外, 所有质子转移过程的自由能变化均明显降低, 降低幅度从 $3.45 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 到 $18.02 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. 也就是说, 处于诱变区域的水分子能够同时从动力学与热力学上促进 5-氟尿嘧啶的质子转移, 并使 5-氟尿嘧啶的烯醇式结构变得更稳定.

从表 1(B 部分)可以看出, 当水分子处于诱变区域时, 不论从热力学还是动力学上考虑, 5-氟尿嘧啶异构化成 FU3*、FU4* 和 FU24* 的几率也要比尿嘧啶(U)异构化成 U3*、U4* 和 U24* 的几率大. 也就是

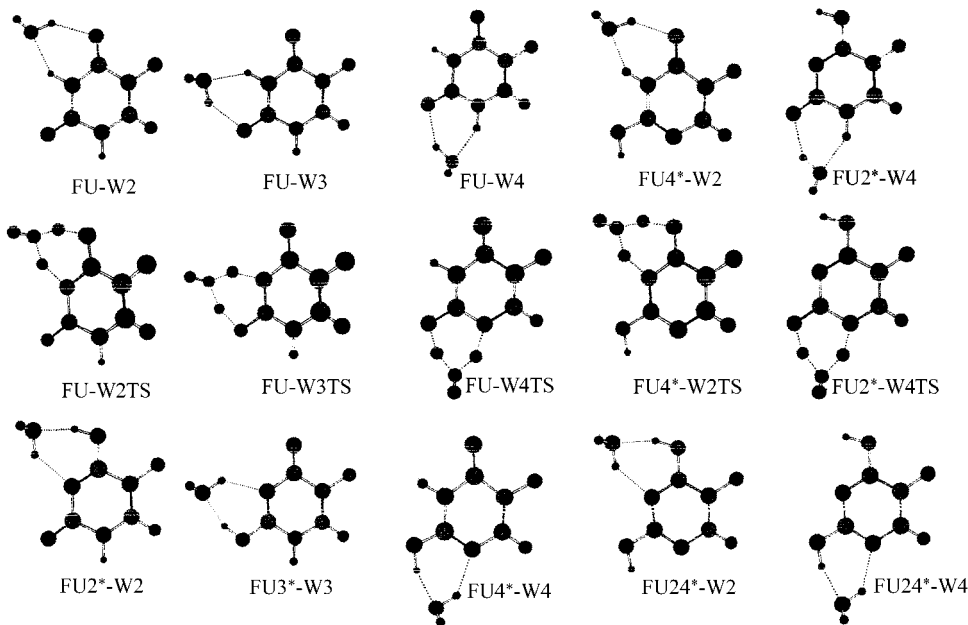


图 3 水分子协助质子转移情况下的优化结构

Fig.3 The optimized structures with water molecule assisting proton transfer

说,当水分子处于诱变区域时,与尿嘧啶相比较而言,5-氟尿嘧啶也是更容易异构化从而与错误的碱基配对而引起基因突变。

2.2.2 水分子阻碍 5-氟尿嘧啶质子转移

早期在研究水分子对质子转移过程的影响时,人们重点考察的是水分子对质子转移的促进作用^[8-10]。在先期的工作中,我们提出水分子对尿嘧啶的质子转移过程可能同时具有阻碍作用^[11]。在随后以甲酰胺^[12]和甘氨酸^[13]为模型分子进行的研究中,也同样展示出在主体分子的不同结合位点的水分子对质子转移过程的贡献是不一样的。水分子在某些区域可以促进质子转移,在某些区域却能阻碍质子转移。我们称这些水能够阻碍质子转移的区域为保护区域,如图 4 中水分子所处的 S1、S3 和 S4 位对于图中所描述的质子转移过程就是保护区域(表 1C 部分)。必须引起注意的是 S3 和 S4 位在图 3 描述的质子转移过程中是诱变区域,而在图 4 描述的质子转移过程中是保护区域,可见诱变及保护区是相对不同的质子转移过程而言的,并不是某个区域的水分子对所有过程起绝对的诱变或保护作用。

在本文中,我们发现当水分子处在 S1、S3 位,质子从 FU2*、FU4* 分别转移到 FU24* 时(图 4),水分子也同样对 5-氟尿嘧啶的质子转移过程具有阻碍作用(表 1C 部分)。且从动力学及热力学上这种阻

碍作用均是存在的。与孤立的 5-氟尿嘧啶的质子转移过程相比,在保护区域的水分子可以明显提高质子转移过程的自由能,提高幅度为 $7.87 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。同时还能提高质子转移的活化能,提高幅度从 $2.28 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 到 $3.89 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。但对 FU-W1→FU2*-W1, FU-W4→FU3*-W4 及 FU-W3→FU4*-W3 而言,与孤立的 FU1→FU2*, FU→FU3* 及 FU→FU4* 相比, W1、W3 及 W4 一方面提高了质子转移过程的自由能,另一方面却降低了质子转移过程的活化能。而 W1、W3 及 W4 却能同时提高尿嘧啶质子转移过程的活化能及自由能。我们早期的研究发现,水分子使活化能升高或降低主要与质子传递距离有关,若水分子的参与使质子传递距离增加则显示为活化能上升,若水分子的参与使质子传递距离减少则显示为活化能下降^[14]。

从表 1(C 部分)可以看出,当水分子处在保护区域时,不论从热力学还是动力学上考虑,5-氟尿嘧啶异构化成 FU2*、FU3* 和 FU4* 的几率均要比尿嘧啶异构化成 U2*、U3* 和 U4* 的大。也就是说,当水分子处在保护区域时,与尿嘧啶相比较而言,5-氟尿嘧啶也是更容易异构化从而与错误的碱基配对而引起基因突变。

从以上讨论可见,尿嘧啶的 5 位被氟取代后,与尿嘧啶相比, S1、S3 及 S4 位上的水分子的保护作用

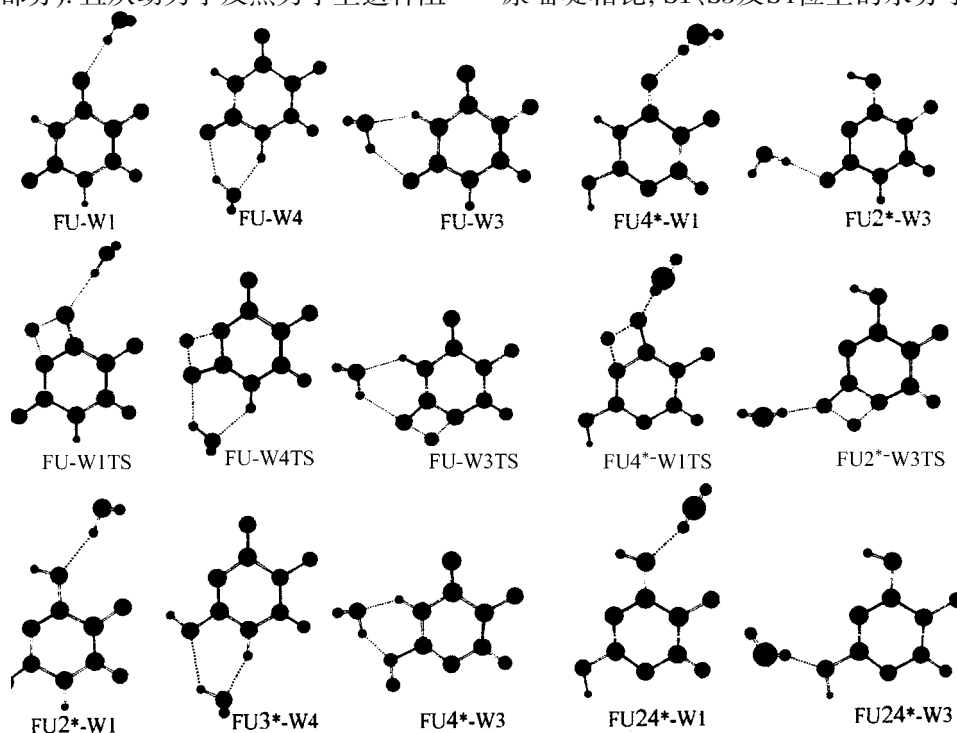


图 4 水分子阻碍质子转移情况下的优化结构

Fig.4 The optimized structures with water molecule preventing proton transfer

从热力学及动力学的同时保护转变为单纯热力学的保护,也就是说氟取代使嘧啶失去了水分子对其动力学上的保护.而对于我们早期研究的5-溴尿嘧啶而言,由于溴原子的电子效应及体积效应,使得5-溴尿嘧啶S1位失去了水的保护,即溴取代使嘧啶同时失去了水分子对其热力学及动力学上的保护^[5].

3 结 论

综上所述,我们发现在5-氟尿嘧啶的周围存在两种完全不同的水合区域,在诱变区域中,水分子能够协助5-氟尿嘧啶的质子转移,使其更趋向于异构化为易引起基因突变的烯醇式结构;而在保护区域中,水分子却能够阻止5-氟尿嘧啶的质子转移,使其以具有抗癌药效的双酮式结构存在.

通过与尿嘧啶质子转移情况(包括无水分子参与、水分子处于诱变区域、水分子处于保护区域)相比较,我们发现不论从热力学还是动力学上考虑,5-氟尿嘧啶异构化成烯醇式的几率要比尿嘧啶的大,而烯醇式的嘧啶碱基的出现往往是引起基因突变的一个重要原因^[5-7, 15],也就是说与尿嘧啶相比,5-氟尿嘧啶更容易异构化从而与错误的碱基配对而引起基因突变.

References

- 1 Atichartakarn, V.; Kraiphikul, P.; Clongsusuek, P. *Int. J. Radiat.*

- Oncol.*, **1988**, **14**:461
- 2 Dimery, I. W.; Legha, S. S.; Shirinian, M.; Hong, W. K. *J. Clin. Oncol.*, **1990**, **8**:1056
- 3 Forastiere, A. A.; Metc, B.; Schuller, D. E.; Ensley, J. F.; Hutchins, L. F. *J. Clin. Oncol.*, **1992**, **10**:1245
- 4 Vokes, E. E.; Mick, R.; Lester, E. P. *J. Clin. Oncol.*, **1992**, **9**:1376
- 5 Holbrook, S. R.; Cheong, C.; Kim, S. H. *Nature*, **1991**, **353**:579.
- 6 Florian, J.; Leszczynski, J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, **118**:3010
- 7 Rogstad, K. N.; Jang, Y. H.; Sowers, L. C.; Goddard, W. A. *Chem. Res. Toxicol.*, **2003**, **16**:1455
- 8 Gorb, L.; Leszczynski, J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, **120**:5024
- 9 Gorb, L.; Podolyan, Y.; Dziekonski, P.; Sokalski, W. A.; Leszczynski, J. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, **126**:10119
- 10 Gorb, L.; Leszczynski, J. *Inter. J. Quan. Chem.*, **1998**, **70**:855
- 11 Hu, X. B.; Li, H. R.; Liang, W. C.; Han, S. J. *J. Phys. Chem. B*, **2004**, **108**:12999
- 12 Liang, W. C.; Li, H. R.; Hu, X. B.; Han, S. J. *J. Phys. Chem. A*, **2004**, **108**:10219
- 13 Sun, Y.; Li, H. R.; Liang, W. C.; Han, S. J. *J. Phys. Chem. B*, **2005**, **109**:5919
- 14 Hu, X. B.; Li, H. R.; Liang, W. C.; Han, S. J. *J. Phys. Chem. B*, **2005**, **109**:5935
- 15 Hu, X. B.; Li, H. R.; Ding, J. Y.; Han, S. J. *Biochemistry*, **2004**, **43**:6361
- 16 Gaigeot, M. P.; Leulliot, N.; Ghomi, M.; Jobic, H.; Coulombeau, C.; Bouloussa, O. *Chem. Phys.*, **2000**, **261**:217
- 17 Hocquet, A.; Leulliot, N.; Ghomi, M. *J. Phys. Chem. B*, **2000**, **104**:4560
- 18 Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B. *et al.*, Gaussian 98 Revision A.3. Pittsburgh, PA: Gaussian Inc., 1998

Explore the Effect Induced by Water in the Proton Transfer Process of 5-fluorouracil *

HU, Xing-Bang LI, Hao-Ran LIANG, Wan-Chun HAN, Shi-Jun

(Department of Chemistry, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

Abstract In order to investigate the tautomerism of 5-fluorouracil(5-FU) induced by proton transfer, we describe a study of structural tautomer interconversion using density functional theory (DFT) calculations at B3LYP/6-311++G(d, p) level of the theory. Thirty-eight geometries including fifteen transition states with and without water molecule were studied. The calculated results indicate that there are two absolutely opposite regions in the vicinity of 5-FU. In one of the regions, water molecules can assist the tautomerism from 5-FU to its enol form (5-FU*), whereas in another region, water molecules can protect 5-FU from tautomerizing to 5-FU*. Furthermore, compared with the tautomerizing processes of uracil, the probability of 5-FU to tautomerize to its enol form is much higher. Based on such facts, the reason why 5-FU is an effective anticancer medicament but with some of toxicity is explained to some extent.

Keywords: Density functional theory, 5-fluorouracil, Proton transfer, Tautomerism, Water

Received: December 3, 2004; Revised: January 7, 2005. Correspondent: LI, Hao-Ran(E-mail: lihr@zju.edu.cn; Tel: +86-571-87952424).

*The Project Supported by NSFC(29976035) and NSF of Zhejiang Province(RC01051)