

烟草毒理研究进展

马晓英¹, 崔留欣²

1 河南职工医学院, 新郑龙湖镇双湖大道 8 号 451191; 2 郑州大学公共卫生学院, 郑州市科学大道 100 号 450001

摘要: 从体外试验和体内实验两方面, 在生物大分子水平、细胞水平和整体水平等层次, 概述了近几年烟气一般和特殊毒性作用及其作用机制的研究成果。

关键词: 烟草毒理; 烟气毒理; 烟草; 烟气一般毒性; 烟气特殊毒性

中图分类号: TS416 文献标识码: A 文章编号: 1004-5708(2008)02-0056-09

Recent progress in tobacco toxicological research

MA Xiao-ying¹, CUI Liu-xin²

1 Henan Staff Medical College, Xinzheng 451191, China;

2 College of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China

Abstract: Progress and current status of research in tobacco toxicology was reviewed. General toxicity and special toxicity of tobacco in vitro and in vivo tests were discussed from biomolecule, cell, and animal and/or human level. Effective mechanism was discussed and further study was proposed.

Key words: tobacco toxicology; cigarette smoke toxicology; tobacco; cigarette smoke general toxicity; cigarette smoke special toxicity

近几年全世界范围对烟草控制提出新的要求, 烟草毒理学研究成为烟草科技研究的热点问题之一^[1]。我国已经正式签署《烟草控制框架公约》, 但是烟草毒理学方面的报道并不多见, 而进行烟草毒理学研究, 确定烟气主要危害成份及毒理作用机制, 对开发低危害卷烟制品十分必要。纵观世界控烟史, 每一次控烟运动都对烟草科技进步, 产品质量提高起到一定的推动作用。因而, 进一步开展严密、科学、公正的烟草毒理学研究, 是烟草科技研究必须重视的问题, 在吸烟与健康两者之间找到恰当的平衡点, 是烟草毒理学研究的最终目的。目前烟草毒理学研究主要指烟气毒理学研究, 包括全烟气及部分成份一般毒性研究和特殊毒性研究, 有体外试验和体内实验两种方法, 主要从生物大分子水平、细胞水平及总体水平等层次入手, 主要涉及全烟气及 Hoffmann 提到的 44 种成份的研究, 主要表现

在烟气急、慢性毒作用及作用机制和“致癌”、“致突变”等方面。

1 烟气一般毒性研究

根据接触时间的长短, 可将烟气产生的一般毒性作用分为急性毒性、亚慢性毒性和慢性毒性。对烟气一般毒性进行研究, 对防治烟草所致急慢性中毒, 对毒理学安全性评价和危险度管理等方面均具有十分重要的意义。

1.1 烟气细胞毒作用研究

烟气急性毒性研究主要集中在烟气细胞毒作用, 是指细胞一次或 24 h 内多次接触烟气后短时间内所产生的毒性效应。

1.1.1 烟气细胞毒作用机制

烟气细胞毒作用机制与细胞氧化损伤有关, 抗氧化剂能减少烟雾细胞毒性。英美烟草公司报道^[2]: 抗氧化剂乙酰半胱氨酸(NAC)和维生素 E 能拮抗烟气对肺纤维细胞 V79 和人脐静脉内皮细胞的细胞毒性。也有研究^[3]发现: 阿魏酸(ferulic acid, FA)和 NAC 可

作者简介: 马晓英, 女, 硕士, 环境毒理学方向。zzimaxy@126.com

崔留欣(通讯作者), 男, 教授, 环境毒理学方向。

E-mail: clx@zzu.edu.cn

收稿日期: 2007-02-05

以有效保护鼠外周血淋巴细胞 DNA 不受烟碱损伤, 该研究通过体外培养鼠外周血淋巴细胞, 进行烟碱暴露, 剂量 3 mmol。结果发现: 添加 FA 和 NAC 组均能表现保护作用。同时也证实 FA 和 NAC 在有效剂量时, 没有细胞毒作用。最近也有研究^[4]证实姜黄素有部分保护小鼠肺和肝免受烟草损伤的作用。上述研究均表明烟气细胞毒作用与氧化损伤有关。

烟气细胞毒作用还与烟气能干扰细胞内多种信号传导通路有关。为了探讨烟气暴露对细胞信号传导通路的影响, 剑桥大学学者^[5]用原代人肺上皮细胞和支气管上皮细胞, 在烟气 3-D 暴露模型中培养 16 h、24 h, 随后提取细胞全基因。结果发现: 3 个捐赠者细胞基因表达增强或抑制表现一致性。低剂量组 6 h 已经出现基因表达改变, 且与 24 h 组没有显著区别。高剂量组基因表达出现不可恢复的改变, 且发生改变的基因与信号传导通路有关。如: 细胞内致癌物新陈代谢、氧化/抗氧化平衡、DNA 损伤和修复等。还发现以前未报道过的 β 生长因子传导通路阻滞。

烟气也可通过 IL-6/STAT3 信号通路, 诱导 DNA 严重损伤并引起细胞死亡, STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3, STAT3) 是一种信号转录激活因子, 细胞损伤 DNA 的修复需要 STAT3 的作用, 对烟草暴露诱导的细胞 DNA 损伤有一定保护作用。有研究^[6]用人支气管上皮细胞体外培养, 发现烟草暴露后, Tyr705 发生磷酸化, DNA 加合物形成增多。还通过 siRNA 技术研究发现, 抑制 STAT3 可导致烟草暴露环境中人支气管上皮细胞的 DNA 严重损伤并导致细胞死亡。这个研究结果为进一步研究烟草的急性损伤提供了基础。

随着研究的深入发现烟气对细胞调节功能的影响, 大于烟气直接细胞毒作用。有研究^[7]采用体外培养人支气管上皮细胞, 暴露于新鲜烟气中, 发现单层上皮细胞屏障功能丧失, 且与烟气呈剂量依赖关系。该研究还发现: 烟气暴露组跨膜电阻降低, 清蛋白水平升高, 标志着细胞对离子和大分子物质屏障功能的降低。停止暴露恢复 30 min 后依然如此。其作用机制与烟气影响多种具有调节功能的酶活性有关。该研究还发现: 抑制丝/苏氨酸蛋白激酶 (Rho 激酶) 的活性, 烟气导致的离子和大分子渗透明显减少, 抑制酪氨酸激酶活性, 烟气导致的大分子渗漏减少, 有趣的是抑制肌球蛋白轻链激酶的活性, 将增加烟气导致的渗漏。这说明: 酪氨酸激酶和 Rho 激酶的激活, 肌球蛋白轻链激酶的失活对烟气导致细胞渗透性增加有贡献。从

而证明: 烟气对于细胞调节功能的影响比细胞毒作用更能解释烟气导致细胞屏障功能丧失的机制。

1.1.2 丙烯醛、焦油细胞毒作用研究

最近美国一项研究^[2]报道: 烟气中丙烯醛有细胞毒作用, R-硫辛酸有保护作用。该研究用人视网膜色素上皮细胞进行研究。结果发现: 丙烯醛超过 50 μ mmol 短时间暴露就可以产生细胞毒性, 低剂量 (0.1 ~ 5 μ mmol) 长时间暴露也可导致与高剂量短时间暴露同样作用。毒性作用包括: 影响细胞存活能力、线粒体功能, 抗氧化能力、Nrf2 表达、酶活性等, 还能导致氧化剂水平升高引起氧化损伤, 蛋白羰基化反应导致蛋白失活, 细胞内钙水平升高。钙是细胞内一种重要的信号传导分子, 与细胞内多种信号传导通路激活有关。该研究还发现: 预先加入 R-硫辛酸有明显保护作用。因此, 该研究者还提出: 以线粒体为目标的抗氧化剂均可预防丙烯醛引起的细胞毒作用。烟气成份对线粒体损伤的机制可能是: 烟气成份导致线粒体功能紊乱, 影响细胞呼吸链正常功能, 影响细胞能量代谢。还有学者^[8]发现: 烟气成份能抑制线粒体复合酶 I 和 II 的活性, 导致线粒体膜电压、氧消耗量和 ATP 生成量的降低, 从而导致细胞能量供应不足, 在多种疾病病理发展过程中起重要作用。

以前已证实烟气中焦油具有细胞毒性, 最近发现焦油还与烟气中其它成份相互作用。有研究^[9]用体外培养 BALB/c-3T 细胞, 分别暴露于: 市售卷烟烟气、低焦油卷烟烟气和超低焦油含量卷烟烟气。结果发现烟气中自由基、杂环胺 (TSNAs) 和多环芳烃 (PAHs) 含量第 2、3 组均低于第 1 组。用中性红染色试验判断细胞毒性及测定半数致死剂量, 第 2、3 组均低于第 1 组。因此, 进一步加强减少焦油含量的研究十分必要。

1.1.3 急细胞毒性研究方法的探讨

由于各实验室使用研究方法和细胞株不全相同, 导致研究结果不完全相同, 因此有不少报道探讨烟气急性细胞毒作用研究方法。有学者^[10]在研究全烟气对人肝 Hep-G2 细胞毒作用时发现: MTT 试验方法比中性红试验更灵敏, 但是中性红试验在研究长期暴露时候更有说服力。还有学者^[11]提出一种快速检测细胞毒性的方法。该方法不用培养细胞, 把烟气直接通入添加谷胱甘肽的吸收液中, 通过测定谷胱甘肽量的改变判断烟气细胞毒性作用。该方法和经典中性红染色试验判断细胞毒性有很好相关性 ($r^2 = 0.94$, $p < 0.05$)。该研究为检测烟气及成份的细胞毒性作用提供一个快速方法。还有学者^[12]提出贝类性腺细胞模

型可以用来研究烟气对生殖能力的影响。该学者通过彗星试验发现, 烟气提取物导致贝类性腺细胞 DNA 断裂, 和公认的 DNA 断裂剂过氧化氢作用类似, 提示可以用此模型研究烟气的生殖毒性。

烟气毒性研究从最初烟气单纯化学分析, 到成份毒性研究及全烟气冷凝物毒性研究, 研究不断深入, 也发现了新问题。烟雾造成细胞损伤的程度与细胞的结构和功能状态均, 这在研究剂量-效应关系时要充分考虑。有研究^[13]发现人支气管上皮细胞 (HBEC) 3-D 暴露模型对烟气毒作用的敏感性低于 NCI-H292 细胞模型。另外, 冷凝烟气所用溶剂不同, 对烟气细胞毒性作用不完全相同。有学者^[14]分别用甲醇和二甲基亚砜做溶剂研究烟气冷凝物的细胞毒性, 发现处理 1 h, 仅用二甲基亚砜作溶剂的烟气冷凝物出现细胞增殖和代谢变化, 但是在不含烟气冷凝物的溶剂中, 两组 24 h 后也出现类似情况。这与以往报道不相同, 该研究提示: 烟气冷凝过程中与溶剂可能还存在相互作用, 这在研究烟气冷凝物毒性作用时需要注意。

1.2 烟气亚慢性、慢性毒作用研究

吸烟与心血管系统疾病, 肺气肿和慢性气管炎等慢性阻塞性肺部疾病 (COPD) 等多种疾病有关, 因而, 研究烟气亚慢性、慢性毒作用及作用机制同等重要。烟气中亚慢性毒作用主要与焦油、烟碱和 CO 等成份有关, 焦油同时还存在急性毒作用, 烟草所致慢性毒性作用研究报道不多。

1.2.1 烟气中 CO 亚慢性毒作用研究

高浓度 CO 造成缺氧窒息等危害, 但是长期接触烟气中低浓度 CO 是否会造成影响, 及机制如何? 有学者^[15]对此进行了研究。该研究选用雌性 Wister 大鼠暴露于 CO, 体积比 0.02%, 20 h/d, 连续 72 周。结果发现: 动物血中血红蛋白含量上升, 病理检查 2 组动物肺组织未见异常, 肺神经内分泌细胞和中性粒细胞数目未见异常; 自发肿瘤没有统计学差异。但是, 右心室质量增加 20%, 左心室和心室隔质量增加 14%。大动脉和股动脉未发现粥样斑块。该研究结果提示: CO 在吸烟导致肺损伤作用中不起主要作用, 烟气中 CO 与心血管肌肉肥厚有关, 与动脉粥样硬化没有必然联系。因此, 为揭示烟气致病机制, 需要考虑烟气中其他成份的作用。

1.2.2 烟气呼吸毒作用

目前烟气呼吸毒作用主要用 90 d 啮齿动物吸入染毒实验。有学者^[16]用 Sprague-Dawley 大鼠研究烟气呼吸毒作用。该研究每组动物雌雄各 30 只。通过专

门仪器, 仅从鼻吸入烟碱浓度为 0.06、0.2、0.8 mg/L 烟气颗粒物溶解液, 1 h/d, 5 d/周, 连续 13 周。停止暴露后, 2/3 立即处死, 1/3 留养恢复 13 周后处死。结果发现, 与对照组比, 动物呼吸功能、血红蛋白含量、呼吸组织细胞增值率均没有见到明显异常。组织病理检查未见异常。因为烟气成份复杂, 且相互作用, 因而动物实验结果和体外烟草化学分析相关性非常有限, 提示应加强生物学实验。

1.2.3 亚慢性毒性研究模型的探讨

慢性阻塞性肺气肿 (COPD) 是一组常见肺部疾病, 主要指呼吸道炎症及阻塞和肺气肿, 病理基础是肺部组织纤维化, 肺通气功能障碍, 大量研究证实烟气是发生 COPD 的一种重要危险因素, 从而表现呼吸毒作用。有报道^[17]用 A/J 和 B6C3F1 小鼠复制吸烟致肺气肿模型。该研究染毒质量体积比为 250 mg/m³, 时间为 15 周。结果: A/J 小鼠肺气肿发病率 51%, B6C3F1 小鼠 38%。说明 A/J 小鼠复制肺气肿模型更好, 这为以后进一步研究该病发生机制提供良好动物模型。该实验还尝试用全反式维甲酸预防小鼠发生肺气肿, 但是没有取得明显效果。但是烟气诱导复制 COPD 模型耗时耗力, 而烟气添加脂多糖成份更容易复制出烟草相关 COPD 模型^[18]。该研究发现, 烟气添加脂多糖组动物免疫反应和炎症反应亢进, 肺细胞有丝分裂增强, 肌肉细胞发育和收缩功能降低, 这些变化均与 COPD 形成有关。该研究还发现: 肺组织细胞相关大分子物质和基因表达数目降低。最明显的是间质金属蛋白酶-12 (MMP-12), 一种弹性蛋白。noxo 基因表达减弱, 该基因编码还原型辅酶 II 氧化酶, 2 种蛋白成份在 COPD 中起重要作用。还发现 amyloid A1 基因表达也下调, 而该基因是一种 COPD 急性期指标。总之, 烟草暴露加脂多糖可以有效复制烟草相关 COPD 动物模型。还有学者^[19]报道: 通过短时间暴露可以复制出类似人类 COPD 发展进程的啮齿类动物模型。这为进一步研究烟草致 COPD 机制提供了基础。

烟气致 COPD 研究模型多在动物整体水平, 而烟气致心血管系统疾病的研究报道多用细胞模型。人脐静脉内皮细胞可以作为一个良好的体外模型来研究烟气有关的心血管系统疾病。英美烟草公司报道^[20], 用中性红染色试验检测苯并(a)芘细胞毒作用时候发现: 烟气成份冷凝物能改变动脉粥样硬化过程中间产物, 如细胞形态结构发生变化, 单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) 表达增加, 中间产物 IL-6, IL-8 因子水平升高等, 且人脐静脉内皮细胞比血管内皮细胞敏感。同时肌钙蛋

白可作为一种生物标志物^[21]。因为肌钙蛋白亚基 TnI、TnT 与肌肉损伤相关,吸烟者体内血清或血浆中肌钙蛋白水平已经被应用于判断心肌细胞损伤,从而诊断心血管系统疾病,而非吸烟者体内没有发现类似改变。这为以后研究烟气对心血管系统的影响提供一个体外模型。

同时由于生物多样性和遗传多态性,不同种属不同品系细胞株及动物对同一外来化学物反应不完全相同,且不同抽烟类型和习惯对烟草生物学毒性不同^[22],因此选择合适细胞株及动物,构建标准化研究模型十分重要,另外全烟气暴露和人群研究需要继续深入进行。

2 烟气特殊毒性研究

外来化学物特殊毒性是相对于一般毒性来说,主要包括外来化学物“致癌、致畸、致突变”和发育毒作用,目前烟气特殊毒性研究集中在烟气致癌和致突变作用方面。

2.1 烟气致癌作用研究

自 1981 年英国流行病学家里查德-多尔和理查德-佩托提出吸烟可致肺癌,吸烟与癌症之间的关系日益受到重视。世界卫生组织和世界抗癌联盟认为化学物致癌存在多种作用机制,而烟气含量众多,成份复杂,烟气可以通过多种机制导致机体发生癌症。

2.1.1 烟气、氧化损伤与癌症

目前多认为烟气中多种成份可通过氧化损伤机制致癌。有研究^[13]用人支气管上皮细胞进行烟气暴露,选择改进的彗星试验检测,结果发现:与对照组细胞比,暴露组细胞存在明显 DNA 线形损伤和氧化损伤。在烟气的致氧化损伤作用中,最受关注的成份是自由基。以往研究证明几乎所有化学致癌物都可由酶作用生成自由基,而过量自由基及诱发的连锁反应均可造成生物大分子如 DNA、RNA、蛋白质的损伤,是癌症启动和促进的基础。其中活性氧可诱导多种癌基因如: c-fos、c-jun、c-myc 和 c-Ha-ras 表达发生改变,从而表现与肿瘤相关。而每支烟的烟雾中约有 1016 个自由基,因而烟气中自由基与癌症的关系不容忽视。也有学者用蛋白质组学方法研究烟气中自由基对细胞中蛋白质的影响^[23]。所培养 MCF-7 细胞株分烟气暴露组,耗尽自由基烟气暴露组,提取蛋白质做双向电泳后回收胶中高表达差异蛋白点,做质谱分析,通过与蛋白质数据库比对分析,发现这些差异蛋白均有氧化特性。氧化因素对生物大分子物质如 DNA、RNA、蛋白质等的氧化

损伤,是癌症启动和发展的基础之一,而烟气对机体有氧化损伤作用,因而,烟气可能通过该机制致癌。

2.1.2 烟气、基因甲基化与癌症

基因特定序列甲基化被认为与癌症发生关系密切。有研究发现烟气能导致基因特定序列甲基化,因而烟气有可能通过该机制致癌。有学者^[24]报道通过皮肤致癌实验发现:烟气致癌可能与烟气造成基因序列特定区域的甲基化累积有关。该研究依据致癌 2 阶段模型,用 7,12-二甲-a-蒽启动癌症过程,用烟气冷凝物(CSC)促进癌症发生。CSC 含量分别是 3、9、18、27 mg,时间是 4、8、29 周。停止暴露后,提取全细胞 DNA,限制性酶切,PCR,电泳,估计甲基化改变。对暴露 8 周,发生癌变组织分析发现:持续的甲基化改变对促进肿瘤发生起重要作用。该研究还发现 Ha-Ras 启动子上游 22 个 CpG 位点在对照组皮肤、27 mg CSC 组、肿瘤组织中均未发生甲基化。但是,转录起始位点上游 2 个 CpG 甲基化随着 CSC 量的增加而增加,所有肿瘤组织中均发生甲基化。因而该研究者提出:特定区域甲基化增多对细胞增殖形成肿瘤作用巨大。也有学者^[25]通过研究提出:鸟氨酸脱羧酶可能是肿瘤发生所必须的,所以可以用来作为 CSC 致动物皮肤癌发生的生物标志物。

2.1.3 烟气、基因多态性与癌症

吸烟导致肺癌具有个体差异,因为只有不足 20% 的吸烟者患肺癌。很多因素能影响个体对吸烟导致肺癌的敏感性,包括机体对致癌物代谢活化和解毒、DNA 修复能力和基因的不同功能等。有研究发现: A1AT 基因型与发生肺癌危险性显著相关^[26]。但是 1999 年 Seersholm 的队列研究和 2003 年 Silvio 的动物实验^[27]结果表明:肺癌患者后代发生癌症危险性升高证据不足。癌症是环境因素与个体因素共同作用的结果,如果运用环境基因组学和毒理基因组学方法,发现前基因毒性或基因毒性的生物标志物与吸烟暴露的动物模型或与吸烟人群的基因多态性相关,对于发现并保护烟草导致癌症易感人群是非常有意义的。对此葡萄牙科学家^[28]进行了尝试。该研究发现: GSTT1 基因和 GSTM1 基因多态性与头颈鳞状细胞癌患者抽烟和不抽烟没有必然联系。而 GSTT1 和 GSTM1 多态性在 2001 年被发现与卵巢癌,2002 年被发现与乳腺癌有关,2006 年^[29]发现与儿童急性淋巴细胞白血病有关。也有学者^[30]对末端羧基水解酶 L1 基因、吸烟和肺癌关系进行探讨。该研究对与肺神经内分泌细胞调节功能有关的 11 个基因进行研究,发现只有泛素蛋白通路

中的 UCHL1 基因的表达在吸烟人群中增强。正常情况下 UCHL1 只在气管上皮神经内分泌细胞中表达,然而吸烟者纤毛上皮细胞中也发现有 UCHL1 表达。说明纤毛上皮有转化为其他细胞的可能。UCHL1 涉及细胞退化,细胞内蛋白损伤等,且超过 50% 肺癌患者细胞内高表达。因此,认为长期抽烟者 UCHL1 过表达提示可能是正常上皮细胞恶性转化的一个早期迹象。这为进一步研究吸烟、癌症和人群之间关系提供了借鉴。

2.1.4 烟气、信号传导与癌症

烟气可能通过非正常激活 Hedgehog 和 Wnt 信号传导通路及作用于 NF- κ B 信号通路,从而导致癌症的发生。Hedgehog 和 Wnt 信号通路仅在胚胎时期及发生癌变组织中发挥作用,但是烟气能导致该通路非正常激活,提示烟气致癌机制可能与该信号传导通路异常激活有关。有学者^[31]通过将癌变细胞转入裸鼠复制肺癌进行研究,结果发现:患肺癌鼠体内由 Hedgehog 和 Wnt 调节的信号传导通路被烟气激活,且使用药物抑制该通路可阻碍细胞恶性转化的发生。该研究结果说明:Hedgehog 和 Wnt 信号通路的激活在吸烟致肺癌过程中起重要作用。该学者还指出:借此可以对烟气致肺癌的分子机制进行深入研究,通过使用药物抑制该通路,也许给治疗吸烟引起的肺癌提供一种新方法。NF- κ B 信号通路可调节细胞生存和凋亡信号,该通路对于癌症发生起重要作用,有研究^[32]表明烟气致癌机制可能与该信号通路有关。该学者用正常人支气管上皮细胞研究发现,烟气暴露与细胞 TNF- α mRNA 变化与烟气存在剂量依赖关系,粒细胞集落刺激因子水平比对照组降低,而两者皆与 NF- κ B 信号通路有关,与抑制肿瘤及细胞增殖有关。该研究初步揭示烟气致癌与 NF- κ B 信号通路的关系。也有研究^[33]通过细胞培养和动物实验发现,绿茶中主要成份没食子酸儿茶素(EGCG)具有选择性抑制癌症细胞增殖和促进凋亡的抗增殖潜能,EGCG 发挥作用与 NF- κ B 信号通路有关,但是对正常细胞没有影响。CSC 诱导的细胞外信号调节酶、氨基端激酶、p38 和促分裂酶原活化蛋白激酶的磷酸化,表现为 3-磷酸酰肌醇激酶活性降低,AKT、mTOR 信号分子减少。EGCG 预处理的细胞可以降低 CSC 诱发的磷酸化,激活 NF- κ B/p65。上述研究结果均说明 NF- κ B 信号通路和烟气导致癌症发生关系密切,也许通过对信号传导通路的深入研究,可以解开烟气致癌机制之谜,为临床治疗烟气相关癌症提供新思路。

2.1.5 烟气中成份与环境致癌成份的相互作用

烟气成份中还存在着非基因毒性致癌物。有学者^[34]通过叙利亚鼠胚胎细胞转化实验发现:安妥明和二乙基-己基酞酸盐是非基因毒性致癌物,而传统分析方法认为这些物质具有基因毒性。该分析结果和啮齿动物致癌作用生物学分析结果高度一致,与活体肿瘤细胞的诱导类似,能鉴别出非遗传毒性致癌物和促进物。该实验鉴别烟气中起始物为苯并(a)芘、N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍,促进物为十二氧-十四(烷)酰基佛波醇-十三醋酸盐和苯巴比妥,苯并(a)芘既有致癌起始物作用又有促进物作用。烟气成份复杂并存在相互作用,同样环境中存在各种致癌因素,而各种致癌因素之间存在各种各样相互影响。有学者^[35]通过人白细胞体外培养,证实人白细胞同时暴露于紫外线和烟草特有亚硝胺代谢产物(NNK)中,DNA 损伤和发生脂质过氧化增加。日本学者^[36]也进行了相关研究。该研究用基因敲除小鼠对射线致癌和 NNK 致癌之间关系进行初步探讨。结果发现:NNK 处理可以降低细胞对与射线致 DNA 双链断裂的承受能力。这为进一步研究致癌物之间的相互关系提供了借鉴。

2.1.6 癌症动物模型探讨

烟气致癌症动物模型的探讨主要集中在烟气致肺癌和皮肤癌。烟气致肺癌动物模型研究相对较早,国外曾于 2001 报道,Agostini 等用 A/J 小鼠成功复制出吸烟致肺癌动物模型,2002 报道,Witschi 等用 Balb/c 和 SWR 小鼠也复制出吸烟致肺癌动物模型,但是吸烟导致肺癌动物模型复制时间较长,且 3 种动物国内不容易获得,价格较昂贵,故国内学者^[37]尝试用昆明小鼠,2005 年也成功复制出被动吸烟致肺癌动物模型。该研究对昆明小鼠在动式染毒柜中吸入染毒,主流烟雾和侧流烟雾控制在 11% 和 89%,染毒 5 d/周,连续 21 周,恢复 16 周。实验结束后用戊巴比妥处死,镜下观察并做病理检查,计算肿瘤发病率和肿瘤发病数,均取得满意效果。最近有学者^[38]报道在裸鼠复制出吸烟致早期肺癌模型。该研究选用人支气管上皮细胞 BEAS-2B 进行烟气暴露 8 d,然后移植到裸鼠形成早期肺癌。虽然不断有烟气染毒复制肺癌动物模型报道,但是各实验室之间缺乏统一标准,烟气暴露情况也不完全相同,动物模型的探讨及相关机制研究仍在继续。为研究烟气致癌机制,探讨快速复制动物模型的方法,有学者^[38]尝试用烟气冷凝物涂抹动物皮肤,复制烟气致皮肤癌动物模型。该研究涉及国际癌症研究

中心(IARC)公布的主流烟雾中存在的 81 种致癌物。其中 48 种存在于烟气气相物, 29 种仅存在于烟气气相中, 4 种成份在 2 种状态中均存在。独立的实验证实存在气相中的致癌物可能比粒相物中的致癌物作用更明显。该研究者还指出: 也许经皮染毒致癌实验不够灵敏, 但是一种估计烟气冷凝物潜在致癌活性的有用方法。

2.2 烟气与基因突变

基因突变是指由于 DNA 碱基对的置换、增添或缺失而引起的基因结构的变化。基因突变可引起染色体畸变, 也可以通过 DNA 复制而遗传, 使物种发生永久改变。目前烟气致突变活性分析主要用 Ames 试验、微核试验、L5178Y 小鼠淋巴瘤分析、基因序列分析等方法。

2.2.1 烟气致基因突变作用研究

DNA 发生改变可引起染色体或染色单体断裂, 造成缺失或者重排, 从而引起染色体结构异常称为染色体畸变或结构畸变。有研究³⁹⁾用人淋巴细胞姊妹染色单体交换试验检测不同类型卷烟, 发现烟气冷凝物的确存在致染色体畸变毒性。还有学者⁴⁰⁾体外培养 CHL/IU 细胞, 直接暴露于气相和总粒相物中 3 h, 停止暴露后恢复 21 h, 固定、染色。结果发现 2 种暴露均与细胞出现微核率存在剂量依赖关系, 说明无论气相状态还是烟气中粒相物均有致染色体畸变毒性作用。烟气是一种混合物, 成份有 4000 多种, 各种成份生物学活性、作用机制各不相同, 为深入研究烟气致畸变作用及机制, 有学者⁴¹⁾采用 Ames 试验、微核试验、中性红染色试验等多种方法, 同时检测卷烟燃烧产物中 12 种成份体外生物活性。结果发现: 在不同试验中结果不同, 反映出该 12 种成份具有不同毒作用机制。还有学者⁴²⁾研究分析烟气中 22 种化学成份, 主要包括: 焦油、烟碱、一氧化碳、TSNAs, 苯并(a)芘等, 观察指标为: MR 值、姊妹染色体交换发生率、微核率、细胞死亡率、实验大鼠死亡率, 并进行相关性和多元回归分析。结果发现 TSNAs 是影响 MR 值、姊妹染色体交换发生率、细胞死亡率的重要因素, 焦油、烟碱、一氧化碳、苯并(a)芘与微核率、动物死亡率没有显著相关性。上述研究充分说明了烟气生物学作用及机制的复杂。

最近烟气致染色体畸变毒性人群毒理学研究资料报道不多。有报道⁴³⁾用彗星试验检测吸烟者外周血淋巴细胞 DNA 损伤, 并通过测定血中谷胱苷肽水平判断机体对 DNA 损伤的修复能力。结果发现: 淋巴细胞 DNA 损伤发生的量和程度与尿中烟碱及其代谢产

物可代因含量与每天抽烟量明显相关, 与谷胱苷肽水平明显负相关, 且抗 DNA 损伤修复能力非抽烟者大于抽烟者。

全烟气具有致突变作用, 但是烟草中成份复杂, 并非每种都有致突变作用, 通过研究确定烟气中主要致突变物及作用机制非常重要。有研究⁴⁴⁾通过 Ames 试验证实: 杂环胺和苯并(a)芘表现明显致突变性; 其它成份 < 100 mg 当量时候, 不表现致突变活性。且在正常烟气中分别添加杂环胺(HCAs)、TSNAs、PAHs、多环芳香族碳氢化合物(PAAs)和硝基多环芳烃(NPAHs)等成份后, 混合物致突变活性没有统计学差异。也有研究者⁹⁾对烟气中焦油进行研究, 证实焦油具有致突变活性, 降低焦油量能减少卷烟烟气致突变活性。烟气中对二基酚也有致突变活性。8-羟基鸟嘌呤是 DNA 发生点突变的产物。日本烟草公司⁴⁵⁾通过体外细胞培养小牛胸腺细胞和 A549 细胞, 发现两细胞中 8-羟基鸟嘌呤含量在烟气暴露组均增高, 且 8-羟基鸟嘌呤与对二基酚存在剂量依赖关系。同时还发现全烟气吸收液比气相烟气吸收液敏感。全烟气吸收液所致的 8-羟基鸟嘌呤在酸性溶液中占优势。提示烟气导致 8-羟基鸟嘌呤增加的作用机制不同, 也许还包括间接作用。

烟气成份之间相互作用, 且有些成份本没有致突变活性, 但是在体内酶作用下发生代谢活化, 能产生致突变作用。有研究者⁴⁶⁾用烟气冷凝物经皮对动物染毒, 探讨各成份之间的关系。染毒结束后, 用 Ames 试验检测发现: 烟气各种成份混合物是焦油致突变活性的 80%, 进一步实验证实焦油中中性溶解成份可以拮抗 80% 2-乙基醚致突变活性。说明烟气中各种成份之间作用关系复杂, 甚至有相互拮抗作用。也有学者⁴⁰⁾的研究证实: 在 S9 代谢活化系统存在下, 烟气致突变活性升高。对此, 日本学者⁴⁷⁾还做了深入研究。烟气成份去甲哈尔满(Norhaman, 9H-pyrido[3, 4-b]indole)和哈尔满(haman, 1-methyl-9H-pyrido[3, 4-b]indole)不具有致沙门菌突变活性。但是, 在 S9 系统中和苯胺或甲苯胺存在时, 共同作用表现致突变活性, 其机制与 P450 酶催化的代谢活化有关。AMPNH 和 APH 是去甲哈尔满和苯胺, 哈尔满和氨基苯胺结合后的产物, 对表达 P450s 和 NADPH-P450 的 7 个基因研究发现: AMPNH 和 APH 对其中 4 个基因存在毒性, 且 AMPNH 和 APH 主要在 P4501A2 和 NAT2 中活化, 其次是 NAT1, P4501A1 仅仅与 AMPNH 激活有弱相关关系。该研究充分说明了烟草成份及其代谢活化的复杂性。偶见关于添加活性成份降低烟气致突变活性的报

道^[48], 该研究用中国仓鼠卵巢细胞体外培养, 分烟气暴露组、添加 Zeolite (沸石) 组和对对照组, 暴露 30 d 后采用 Ames 试验检测发现, 添加 Zeolite 的卷烟烟气致突变性降低, 其机制与 Zeolite 和烟气中亚硝胺相互作用有关, 但是没有发现 Zeolite 有直接降低烟气中亚硝胺含量的作用。

2.2.2 烟草成瘾与基因突变

一般认为烟草成瘾与烟碱依赖有关, 最近研究^[49]发现烟碱依赖形成与基因突变有关。烟碱通过作用于中枢神经细胞突触前乙酰胆碱受体, 从而使吸烟者产生欣快感。烟碱长期作用下, 受体对乙酰胆碱的敏感性降低, 表现为成瘾者吸烟量越来越大, 并引起各种慢性退化性疾病。该研究动物实验发现小鼠基因序列发生一个 Leu9' → Ala9' 的点突变, 表现对烟碱非常敏感, 且存在选择性。还发现烟碱作用受体结构为 $\alpha 4\beta 2$, 激活该受体对形成烟碱依赖非常重要。通过竞争性抑制 $\alpha 4\beta 2$ 受体也可以降低烟碱依赖的敏感性。通过对编码 $\alpha 4$ 亚基的基因进行修饰可以降低对烟碱的感受性, 通过基因敲除 $\beta 2$ 编码基因, 可减少小鼠对烟碱依赖的敏感性。该学者还建议将该受体分为: 烟碱敏感型和烟碱耐受型, 有助于发现烟草成瘾的易感人群。随后有研究^[50]发现: 酒石酸瓦伦尼克林 (Varenicline tartrate), 一种烟碱受体部分拮抗剂, 0.5 ~ 1.0 mg/d, 能有效治疗烟碱依赖。也有研究^[51]发现 COMT 基因 rs737865 和 rs165599 位点情况可以预测用抗抑郁药—盐酸安非他酮 (bupropion) 治疗烟碱依赖的结局。当然对人类进行基因修饰伦理上不可行, 但是分析该受体基因多态性、吸烟行为和受体变异特征和功能也许可以解开烟草依赖之谜, 为治疗烟草成瘾及烟碱依赖提供科学依据。

综上所述, 虽然使用啮齿类动物试验和细胞模型研究烟气毒性作用及作用机制取得初步进展, 但是耗费时间和经费, 但是根据烟气成份的结构、理化性质和某些生物学活性, 可初步预测其潜在危害或者特殊毒性。为此, 对烟气中多种成份, 开展定量结构-活性研究, 尤其是包括多个毒性终点以及致癌、致畸、致突变作用的定量结构-活性研究, 对评价和预测烟气中存在的多种混合化学物的危险度提供了良好思路^[52]。

3 结语

纵观世界控烟史, 每一次控烟运动都对烟草科技进步、产品质量提高起到一定的推动作用。进一步开展严密、科学、公正的烟草毒理学研究, 对烟气中有害

成份与环境其他来源有害成份进行定性、定量对比研究; 开展烟气中有害成份急、亚急性、慢性毒性研究, 尽力保留卷烟的品质又能降低对人体的危害, 加强对烟草致病的保护方面研究, 是烟草毒理学研究必须重视的问题。科学研究的发展必将改善吸烟与健康的对立关系, 在两者之间找到恰当的平衡点, 是烟草毒理研究的最终目的, 相信也许在不远的将来, 烟草能够获得同酒、咖啡等可选择消费品同等地位。

参考文献

- [1] 谢剑平. CORESTA 热点研究问题[J]. 中国烟草学报, 2006, 12(1): 13-16
- [2] Gaca M D, Kalirai K, Massey E D. Antioxidants reduce cell cytotoxic responses to cigarette smoke[C]//CORESTA Congress, Paris, 2006. Smoke Science/Product Technology Groups abstract SSPOST21.
- [3] Sudheer A R, Muthukumar S, Kalpana C, et al. Protective effect of fenuic acid on nicotine-induced DNA damage and cellular changes in cultured rat peripheral blood lymphocytes: A comparison with N-acetylcysteine[J]. Toxicol In Vitro, 2006-11-21. [Epub ahead of print].
- [4] Vanisree A J, Sudha N. Curcumin Combats Against Cigarette Smoke and Ethanol-Induced Lipid Alterations in Rat Lung and Liver[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2006, 288(1/2): 115-123.
- [5] Maunders H, Patwardhan S R, Phillips J, et al. Human Bronchial Epithelial Cell Transcriptome: Gene Expression Changes Following Acute Exposure to Whole Cigarette Smoke in vitro[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, [2007-1-12]. [Epub ahead of print].
- [6] Liu X. STAT3 activation inhibits human bronchial epithelial cell apoptosis in response to cigarette smoke exposure[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 353(1): 121-126.
- [7] Olivera D S, Boggs S E, Beenhouwer C, et al. Cellular mechanisms of mainstream cigarette smoke-induced lung epithelial tight junction permeability changes in vitro[J]. Inhal Toxicol, 2007, 19(1): 13-22.
- [8] Van der Toom M, Slebos D J, de Bruin H, et al. Cigarette smoke induced blockade of the mitochondrial respiratory chain switches lung epithelial cell apoptosis into necrosis[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, [2007-01-05]. [Epub ahead of print].
- [9] Meng Q R, LU Binbin, Wisse L, et al. Characterization of cytotoxicity and gene expression profiles in BALB/c 3T3 cells ex-

- posed to whole smoke from a full-flavor or two PREP cigarettes [C] // CORESTA Congress Paris; 2006, Smoke Science/Product Technology Groups abstract SS26
- [10] Wiczorek R, Roper W. Effect of vapour phase on whole cigarette mainstream smoke in vitro cytotoxicity [C] // CORESTA Congress, Paris; 2006, Smoke Science/Product Technology Groups abstract SS28.
- [11] Cahours X, Blanchet M, Haond C, et al. A cell-free method to assess the gaseous phase cytotoxicity of cigarette smoke [C] // CORESTA Congress Paris; 2006, Smoke Science/Product Technology Groups abstract SSPOST08
- [12] Nagarajappa Ganguly A, Goswami U. DNA damage in male gonad cells of Green mussel (*Perna viridis*) upon exposure to tobacco products [J] . *Ecotoxicology*, 2006, 15(4): 365-369.
- [13] Thorne D, Haswell L, Fiebelkorn S, et al. Development of an in vitro alternative model for the measurement of cigarette smoke induced DNA damage using 3-D human lung cell cultures [C] // CORESTA Congress Paris; 2006, abstract SSPOST24
- [14] Martino A, Flamma F, Bassi A, et al. Evaluation of cigarette smoke condensate cytotoxicity by using different solvents [J] . *Ig Sanita Pubbl*, 2006, 62(3): 241-254.
- [15] Sorhaug S, Steinshamn S, Nilsen O G, et al. Chronic inhalation of carbon monoxide; effects on the respiratory and cardiovascular system at doses corresponding to tobacco smoking [J] . *Toxicology*, 2006, 228(2/3): 280-290.
- [16] Yoshino K, Fuji S, Ishii I, et al. Comparative inhalation toxicity of test cigarettes containing ingredients and a reference cigarette in rats [C] // CORESTA Congress Paris; 2006, Smoke Science/Product Technology Groups abstract SSPOST18
- [17] March T H, Bowen L E, Finch G L, et al. Effects of strain and treatment with inhaled all-trans-retinoic acid on cigarette smoke-induced pulmonary emphysema in mice [J] . *COPD*, 2005, 2(3): 289-302
- [18] Meng Q R, Gideon K M, Harbo S J, et al. Gene Expression Profiling in Lung Tissues from Mice Exposed to Cigarette Smoke, Lipopolysaccharide, or Smoke Plus Lipopolysaccharide by Inhalation [J] . *Inhal Toxicol*, 2006, 18(8): 555-568.
- [19] Lee K M, Renne R A, Harbo S J, et al. 3-week inhalation exposure to cigarette smoke and/or lipopolysaccharide in AKR/J mice [J] . *Inhal Toxicol*, 2007, 19(1): 23-35.
- [20] Gaca M D, Cockcroft N, Richter A, et al. Responses of vascular endothelial cells to cigarette smoke particulate matter [C] // CORESTA Congress Paris; 2006, Smoke Science/Product Technology Groups abstract SSPOST20
- [21] Gregg E O, Fisher A L, Lowe F, et al. The potential of cardiac troponins for use as biomarkers in cigarette smokers [C] // CORESTA Congress Paris; 2006, Smoke Science/Product Technology Groups abstract SS32
- [22] Funck-Brentano C, Raphael M, Lafontaine M, et al. Effects of type of smoking (pipe, cigars or cigarettes) on biological indices of tobacco exposure and toxicity [J] . *Lung Cancer*, 2006, 54(1): 11-18
- [23] Rolando C, Tokarski C, Emami I. Proteomics study of the influence of cigarette smoke free radicals on culture cells [C] // CORESTA Congress Paris; 2006, abstract SS33
- [24] Bachman A N, Curtin G M, Doolittle D J, et al. Altered methylation in gene-specific and GC-rich regions of DNA is progressive and nonrandom during promotion of skin tumorigenesis [J] . *Toxicol Science*, 2006, 91(2): 406-418
- [25] Curtin G M, Hanausek M, Walaszek Z, et al. Short-term biomarkers of cigarette smoke condensate tumor promoting potential in mouse skin [J] . *Toxicol Science*, 2006, 89(1): 66-74
- [26] Yang P, Bamlet W R, Sun Z, et al. Alpha1-antitrypsin and neutrophil elastase imbalance and lung cancer risk [J] . *Chest*, 2005, 128(1): 445-452
- [27] Silvio D Fon, Francesco, Agostini. Modulation of cigarette smoke-related end-points in mutagenesis and carcinogenesis [J] . *Mutation Research*, 2003, 523/524: 237-252
- [28] Joice Matos Biselli, Renata Cristina de Angelo Calsaverini Leal Mariangela Torreglosa Ruiz, et al. GSTT1 and GSTM1 polymorphism in cigarette smokers with head and neck squamous cell carcinoma [J] . *Rev Bras Otorrinolaringol*, 2006, 72(5): 654-658
- [29] Tsvirenko S V, Tsaur G A. Genetic polymorphism of glutathione-S-transferase M1 and T1 in children with acute lymphoblastic leukemia [J] . *Klin Lab Diagn*, 2006(2): 23-24, 33-34
- [30] Carolan B J, Heguy A, Harvey B G, et al. Up-regulation of expression of the ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 gene in human airway epithelium of cigarette smokers [J] . *Cancer Research*, 2006, 66(22): 10729-10740
- [31] Lemjabbar-Alaoui H, Dasari V, Sidhu S S, et al. Wnt and hedgehog are critical mediators of cigarette smoke-induced lung cancer [J] . *PLoS ONE*, 2006, 1(1): 1-11.
- [32] Fields W R, Leonard R M, Odom P S, et al. Gene expression profiles in normal human bronchial epithelial (NHBE) cells fol-

- lowing exposure to smoke condensate[J] . *Toxicol Sciences*, 2005, 86(1): 84-91.
- [33] Syed D N, Afaq F, Kweon M H, et al. Green tea polyphenol EGCG suppresses cigarette smoke condensate induced NF- κ B activation in normal human bronchial epithelial cells[EB/OL]. [2006-07-24]. *Oncogene advance online publication*.
- [34] Breheny D, Zhang H, Massey E D. Application of a two-stage Syrian hamster embryo cell transformation assay to cigarette smoke particulate matter[J] . *Mutat Research*, 2005, 572(1/2): 45-57.
- [35] Chuang C H, Hu M L. Synergistic DNA damage and lipid peroxidation in cultured human white blood cells exposed to 4-(methyl-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and ultraviolet A[J] . *Environ Mol Mutagen*, 2006, 47(2): 73-81.
- [36] Ikeda M, Masumura K I, Sakamoto Y, et al. Combined genotoxic effects of radiation and a tobacco-specific nitrosamine in the lung of gpt delta transgenic mice[J] . *Mutat Research*, 2007, 626(1): 15-25.
- [37] 杨杰, 袁振丽, 姜丽娜, 等. 昆明小鼠被动吸烟肺癌模型的建立[C] // 中华预防医学会环境卫生分会. 全国空气污染与健康学术研讨会论文集. 温州, 2005: 190-194.
- [38] Smith C J, Perfetti T A, Garg R, et al. Utility of the mouse dermal promotion assay in comparing the tumorigenic potential of cigarette mainstream smoke[J] . *Food Chem Toxicol*, 2006, 44(10): 1699-1706.
- [39] Sorrento C, Del Piano L, Barnato L, et al. Genotoxicity of cigarette smoke condensate from different tobacco types in cultured human lymphocytes[C] . CORESTA Congress, Kyoto, 2004. Smoke Science/Product Technology Groups, abstract SS-POST5.
- [40] Prefontaine D, Monin A, Jumarie C, et al. In vitro bioactivity of combustion products from twelve tobacco constituents[J] . *Food Chem Toxicol*, 2006, 44(5): 724-738.
- [41] Ogura M, Iida R, Fukushima T, et al. Reactivity of gas/vapour phase (GVP) of cigarette smoke in the in vitro micronucleus assay[C] // CORESTA Congress, Paris, 2006. Smoke Science/Product Technology Groups, abstract SS27.
- [42] YAO Jianhua, CHEN Zhangyu, WU Pingyan, et al. Primary studies on the correlation between adverse biological effects and important harmful chemical components of smoke in cigarette safety evaluation[C] // CORESTA Meet. Stratford-upon-Avon, 2005. Smoke Science-Prod. Techno Groups, abstract SSPT28.
- [43] Fracasso M E, Doria D, Franceschetti P, et al. DNA damage and repair capacity by comet assay in lymphocytes of white-collar active smokers and passive smokers (non- and ex-smokers) at workplace[J] . *Toxicol Lett*, 2006, 167(2): 131-141.
- [44] Fukushima T, Miura Y, Otsu Y, et al. Contribution of selected smoke constituents to TPM mutagenic potencies in *Salmonella typhimurium* TA98[C] // CORESTA Congress, Paris, 2006. Smoke Science/Product Technology Groups, abstract SS25.
- [45] Miura N, Fukano Y, Nishino T. Differences in the generation of 8-hydroxyguanine by cigarette smoke in calf-thymus DNA and in A549 cells[C] // CORESTA Congress, Paris, 2006. Smoke Science/Product Technology Groups, abstract SS31.
- [46] Nakamura H, Yoshino K, Fuji S, et al. Skin-painting studies of cigarette smoke condensate in SENCAR mice for evaluating effect on tumour promotion of cigarette with ingredients[C] // CORESTA Congress, Paris, 2006. Smoke Science/Product Technology Groups, abstract SSPOST17.
- [47] Yoshimitsu Oda, Yukari Totsuka, Keiji Wakabayashi, et al. Activation of aminophenylnorhaman, aminomethylphenylnorhaman and aminophenylharman to genotoxic metabolites by human N-acetyltransferases and cytochrome P450 enzymes expressed in *Salmonella typhimurium* umu tester strains[J] . *Mutagenesis*, 2006, 21(6): 411-416.
- [48] ZHU Jian Hua, WANG Ying, CAO Yi, et al. In vitro and in vivo tests on cigarettes containing zeolite additives[C] // CORESTA Congress, Paris, 2006. Smoke Science/Product Technology Groups, abstract SSPOST06.
- [49] Andrew R Tapper, Sheri L McKinney, Raad Nashmi, et al. Nicotine Activation of α 4 β 2 Receptors: Sufficient for Reward, Tolerance and Sensitization[J] . *Science*, 2004, 306(5698): 1029-1032.
- [50] Oncken C, Gonzales D, Nides M, et al. Efficacy and safety of the novel selective nicotinic acetylcholine receptor partial agonist varenicline for smoking cessation[J] . *Arch Intern Med*, 2006, 166(15): 1571-1577.
- [51] Berrettini W H, Wileyto E P, Epstein L, et al. Catechol-O-methyltransferase (COMT) gene variants predict response to bupropion therapy for tobacco dependence[J] . *Biol Psychiatry*, 2007, 61(1): 111-118.
- [52] 王心如. 毒理学基础[M] . 4版. 北京: 人民卫生出版社, 2004.