

文章编号:1001-5914(2004)05-0286-03

卷烟烟气及其主要有害成分诱发细胞基因突变的研究

吕兰海¹, 杨陟华¹, 尤汉虎², 曹珍山¹, 刘兴荣², 朱茂祥¹

摘要:目的 研究卷烟烟气凝集物(CSC)及其主要有害成分吡咯丁酮基亚硝胺(NNK)诱发细胞基因突变的作用,为降低卷烟危害技术研究提供有益线索。方法 以永生化的人支气管上皮细胞(BEP2D)为靶细胞,某种知名品牌卷烟(混合型,标示焦油量为8 mg/支)用于制备CSC,并通过气相色谱-热能分析联用仪(GC-TEA)检测其NNK含量,用多核细胞法检测细胞次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HPRT)基因突变率(mutation frequency, MF)。结果 该卷烟制备的CSC测定量为(7.93±0.89) mg/支,与标示焦油量相当,其中NNK含量为(0.046±0.008) μg/支,NNK和CSC的浓度(x_1 和 x_2 μg/ml)诱发BEP2D细胞HPRT基因突变率(y_1 和 y_2 ‰)的剂量-效应关系分别为 $y_1=0.016x_1+1.012$ 和 $y_2=0.0061x_2+1.042$,CSC中NNK诱发细胞HPRT基因突变率的作用仅占0.002%。结论 卷烟烟气可诱发细胞HPRT基因突变,但其中NNK的作用不是主要的。

关键词: 烟草烟污染;吡咯丁酮基亚硝胺;香烟凝集物;人支气管上皮细胞;基因突变

中图分类号:R994.6

文献标识码:A

HPRT Gene Locus Mutation of HPV-18 Immortalized Human Bronchial Epithelial Cells Induced by Cigarette Smoke Condense and Its Major Harmful Component LU Lan-hai, YANG Zhi-hua, YOU Han-hu, et al. *Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medicine Science, Beijing 100850, China*

Abstract: **Objective** To study the HPRT gene locus mutations induced by cigarette smoke and its major component 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK). **Methods** HPV-18 immortalized human bronchial epithelial cells (BEP2D) were used as the target cells. Cigarette smoke condense (CSC) was collected from a famous brand cigarette (mixed cigarette, the amount of tar were marked by 8 mg per cigarette), and the content of NNK in the CSC was detected by GC-TEA. A rapid and sensitive multinuclear cell assay was used to detect the frequency of the HPRT gene mutation in BEP2D cells induced by NNK and CSC. **Results** Content of CSC in the cigarettes was (7.93±0.89) mg per cigarette, content of NNK in the CSC was (0.046±0.008) μg per cigarette. The frequency of HPRT gene mutation in BEP2D cells (y_1 and y_2) presented dependent on the concentrations of NNK and CSC (x_1 and x_2), and the dose-effect relationship were: $y_1=0.016x_1+1.012$ and $y_2=0.0061x_2+1.042$ respectively. However, result computed base on above formula indicated that, in a cigarette, the fraction of NNK-induced HPRT gene mutation was only 0.002% less than that of CSC induced. **Conclusion** Both CSC and NNK could induce HPRT gene locus mutation but the fraction of NNK in a cigarette was minor.

Key words: Tobacco smoke pollution; 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone; Cigarette smoke condense; HPV-18 immortalized human bronchial epithelial cells; Gene mutation

吸烟与人类健康关系密切,研究证实吸烟是肺癌最主要的危害因素,87%的肺癌都与吸烟有关^[1]。烟草烟气的成分十分复杂,目前已经鉴定出的化合物多达5 000余种,其中数十种化合物为明确的致癌物或辅助致癌物,如挥发性亚硝胺、苯并[a]芘等^[2]。但目前降低卷烟危害的技术研究多集中于针对卷烟烟气中主要有害物质,如烟草特异亚硝胺、苯并[a]芘、一氧化碳和自由基等^[3],较少涉及卷烟烟气中多种有害成分的综合作用。我们对卷烟烟气凝集物(焦油,CSC)诱发的细胞次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HPRT)基因突变进行研究,并与卷烟烟气中公认的致癌物——7种烟草特异性亚硝胺中的典型代表物吡咯丁酮基亚硝胺(NNK)的致突变作用进行比较,为采取综合措施降低卷烟CSC含量及其健康危害提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞及其培养

人乳头瘤病毒(HPV-18)永生化上皮细胞(BEP2D)由美国国立癌症研究所Harris教授馈赠,美国哥伦比亚大学放射生物研究中心Dr. Hei TK引进,为近二倍体核型,体外传代100余代,接种裸鼠未成瘤。该细胞用LHC-8完全培养基(Biofluids Inc.美国)在37℃,5%CO₂和95%湿度条件下培养,5~6 d传代,收集细胞时用0.25%胰酶(Gibco分装,美国)和0.02% EDTA-2Na的d-Hank's消化。

1.2 卷烟CSC制备

将卷烟(市售某品牌混合型卷烟,焦油标识量为8 mg/支)烟气导入收集管(气泡吸收管,市售)中,管内盛有25 ml无水乙醇和25 ml pH 6.2的0.05 mol/L柠檬酸盐缓冲液,按4 min/支的速率,连续收集50支卷烟。将收集液转移至50 ml容量瓶中,并用无水乙醇洗涤胶管并定容至50 ml(1支/ml)。准确量取一定体积的CSC溶液,冷冻干燥后称重,测定CSC含量。以上所

基金项目:国家烟草专卖局资助项目(110200202009)

作者单位:1.军事医学科学院放射医学研究所(北京 100850) 2.兰州医学院环境卫生教研室(甘肃 兰州 730000)

作者简介:吕兰海(1976-),男,硕士研究生,从事环境毒理学研究。

通讯作者:朱茂祥(1966-),男,副研究员, Tel:010-66930224

Copyright © 2004 by Jilin Scientific Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

需试剂均为市售分析纯。

1.3 卷烟 NNK 含量测定

取 20 ml 上述 CSC 溶液, 浓缩后经碱性氧化铝柱纯化, 用标准 NNK(纯度>98% , 美国, Chemsyn Science Lab) 作为内标, 通过气相色谱-热能分析联用仪(GC-TEA) 定量检测 NNK 含量。

1.4 细胞染毒

指数生长的 BEP2D 细胞加入终浓度分别为 4.0、8.0、16.0、32.0 $\mu\text{g/ml}$ 的 NNK 或 CSC , 培养 24 h 后, 去除培养液, 用预温的 d-Hank 's 液洗涤 3 次, 立即换新鲜的培养液进行培养。

1.5 HPRT 基因突变率分析^[4]

上述染毒后的细胞培养至第 5 代时, 分为 2 组, 其中一组加入含终浓度为 0.1 mmol/L 6-巯基鸟嘌呤(6-TG , 美国, Sigma 公司) 的 LHC-8 培养液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 30 h 后, 再同时向 2 组加入 6 $\mu\text{g/ml}$ 的细胞松弛素 B (cytochalasin B , Calbiochem 公司), 继续培养 42 h , 消化制备细胞悬液, 冰醋酸甲醇固定, 细胞悬液滴片, Giemsa 染色, 干燥后光镜下计数 5 000 个细胞, 记录在同一胞浆内具有完整核膜的双核或多核细胞数(包括相压、相切和分离的双核或多核细胞数)。每 1 000 个计数细胞中, 含 6-TG 培养细胞的双核或多核细胞数与不含 6-TG 培养细胞中双核或多核细胞数的比值即为 HPRT 基因位点突变频率(%)。

1.6 统计分析

用 SPSS 10.0 统计软件对实验结果进行处理, 实验组与对照组间比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 NNK 诱发 BEP2D 细胞 HPRT 基因突变

NNK 诱发 BEP2D 细胞 HPRT 基因突变的结果见图 1。图 1 可见, 随 NNK 剂量(x) 增高, HPRT 基因突变率(y) 明显增高, 两者呈现明显的线性剂量-效应关系($R^2=0.9763$) , 拟合公式为 $y=0.016x+1.012$ 。

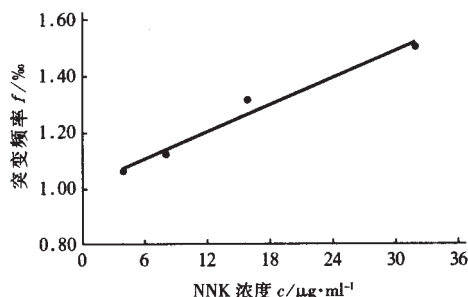


图 1 NNK 诱发 BEP2D 细胞 HPRT 基因突变的剂量-效应关系

2.2 CSC 诱发 BEP2D 细胞 HPRT 基因突变

图 2 为 CSC 诱发 BEP2D 细胞 HPRT 基因突变的结果, 随 CSC 剂量(x) 增高, HPRT 基因突变率(y) 明显增高, 两者呈现明显的线性剂量-效应关系($R^2=0.9986$)。

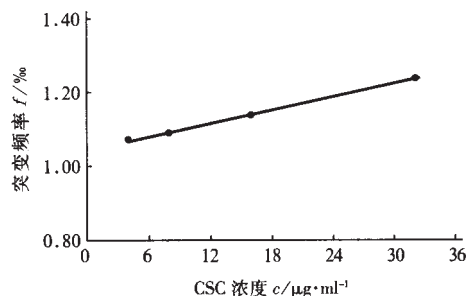


图 2 CSC 诱发 BEP2D 细胞 HPRT 基因突变的剂量-效应关系

拟合公式为 $y=0.0061x+1.042$ 。

2.3 NNK 在 CSC 诱发细胞 HPRT 基因突变中的作用

本实验条件下收集的 CSC , 经测定含量为(7.93 ± 0.89) ng/支 , 与焦油标示量(8 mg/支) 相当。NNK 含量测定结果为(0.046 ± 0.008) $\mu\text{g/支}$ 。根据 NNK 和 CSC 诱发 BEP2D 细胞 HPRT 基因突变的剂量-效应关系式, 尽管同等条件下, NNK 诱发 HPRT 基因突变率是 CSC 的 2.6 倍(剂量-效应关系曲线的斜率比值), 但由于 1 支卷烟的 CSC 中 NNK 含量仅为 5.8 $\mu\text{g/g}$, 可以计算, 诱发相同基因突变率所需要的 CSC 和 NNK 量, 折合为卷烟支数, 两者比值约 1:66 000 , 即 1 支卷烟的 CSC 诱发的基因突变中, 由 NNK 引起的仅占约 0.002%。

3 讨论

烟草中的化合物经呼吸道进入肺组织, 一部分被吸收入血液直接以原型排出体外, 剩余化合物在肺内经细胞色素 P450 酶的代谢, 一部分被活化形成有致癌作用的活性物质(如活性氧自由基、活性甲基等), 这些物质可与 DNA 形成加合物, 引起基因突变。当这种突变逃逸体内各种修复机制修复时, 就会引起永久性突变, 导致一些原癌基因和(或) 肿瘤抑癌基因失活, 引起肿瘤的发生。流行病学研究结果也表明, 除肺癌外, 吸烟还可引起口腔癌、咽癌、喉癌、食管癌、膀胱癌等。此外, 吸烟还与鼻、胃、肝、子宫癌及白血病等密切相关^[5]。

支气管上皮细胞是吸入的有害物质在体内代谢活化的主要场所, 也是肺癌发生的重要起源。NNK 是烟草中含量最丰富、致癌性最强的 7 种烟草特异性亚硝胺之一。我们曾研究表明, NNK 可诱发动物肿瘤以及体外细胞的恶性转化^[6,7]。本研究以人支气管上皮细胞为靶细胞, 对 CSC 及其主要有害成分 NNK 的基因突变作用进行观察和比较, 有助于认识吸烟可能导致危害的机制以及 NNK 在卷烟烟气健康影响中的作用。研究结果表明 CSC 和 NNK 诱发的细胞 HPRT 基因突变具有良好的剂量-效应关系, 这与 Cole 等^[8]的报道一致, 但公认的烟草致癌物 NNK 在吸烟所致基因突变中的作用并不重要, 在 CSC 诱发的基因突变中所占的份额仅为 0.002% , 该研究结果在国内外未见报道, 这对于认识吸烟与健康, 以及卷烟烟气中有害成分的危害

文章编号 :1001-5914(2004)05-0288-03

饮用水中壬基酚及其前体物的分布特性

周鸿¹, 张晓健¹, 胡建英², 金芬², 林爱武³, 樊康平³, 王占生¹

摘要:目的 调查具有雌激素作用的内分泌干扰物(EDCs)壬基酚(NP)及其在环境中的前体物非离子表面活性剂壬基酚聚氧乙烯醚(NPEOs)在某市饮用水中的分布特点。方法 于2002年丰水期和枯水期采集某市饮用水,采用LC-MS法测定水中的NPEOs(聚合度 $n>2$)浓度,GC-MS法测定水中的NP1EO、NP2EO和NP浓度。结果 不同原水中的NPEOs浓度($n=5\sim 15$)为 $0.210\sim 3.355\text{ }\mu\text{g/L}$,不同聚合度NPEOs的浓度不呈现高斯分布,NP的浓度为 $0.010\sim 0.040\text{ }\mu\text{g/L}$,低于推荐的环境标准值($1\text{ }\mu\text{g/L}$)。管网水中不同聚合度NPEOs分布与原水相似。结论 该市主要水源已受到一定程度的NPEOs污染,净水工艺对NPEOs及其降解产物NP的控制作用有待进一步研究,虽然目前污染不是很严重,但是严格管理上游工业污水的排放仍然是不容忽视的问题。

关键词: 水污染;内分泌干扰物;壬基酚;壬基酚聚氧乙烯醚

中图分类号:R123.5

文献标识码:A

Distribution Characteristics of Nonylphenol and Its Precursors, Nonylphenol Ethoxylates in Drinking Water of A City
ZHOU Hong, ZHANG Xiao-jian, HU Jian-ying, et al. Department of Environmental Science and Technology, Tsinghua University, Beijing 100084, China

Abstract: **Objective** To investigate the distribution characteristics of nonylphenol (NP), one kind of estrogenic endocrine disrupting chemical and its precursors, nonylphenol ethoxylates(NPEOs), one kind of non-ion surfactants in drinking water of a city. **Methods** In 2002, surveys on drinking water quality in the city were carried out during low-water and high-water periods. Concentrations of NPEOs($n>2$) were detected by LC-MS and contents of NP1EO, NP2EO and NP were detected by GC-MS. **Results** The results in the present paper showed that contents of NPEOs($n=5\sim 15$) were between $0.210\sim 3.355\text{ }\mu\text{g/L}$ and NPEOs of different polymeric number (n) didn't approximate to Gauss distribution. Concentration of NP varied from $0.010\sim 0.040\text{ }\mu\text{g/L}$, much lower than the commended environmental standard value($1\text{ }\mu\text{g/L}$). Distribution of NPEOs in tap water was similar to that in source water. **Conclusion** Either surface water or groundwater source are contaminated by NPEOs to some extent. Further studies are necessary about control of NPEOs and NP by water treatment processes. Although recent contamination isn't serious, it is still important to manage the discharge of upstream wastewater and enhance the protection of water source.

Key words: Drinking water contamination; Endocrine disrupting chemicals; Nonylphenol; Nonylphenol ethoxylates

壬基酚(nonylphenol, NP)是具有雌激素作用的内分泌干扰物质^[1-3],有研究表明,当水中的壬基酚浓度达到 $10\text{ }\mu\text{g/L}$ 时,虹鳉会发生生殖异常^[4]。NP是壬基酚

聚氧乙烯醚(nonylphenol ethoxylates, NPEOs)在环境中的主要生物降解产物之一,而NPEOs在我国的年产量约为 $5\times 10^4\sim 6\times 10^4$ t($5\sim 6$ 万吨)^[5],是一种在人们的日常生活和工业生产中广泛应用而且起着重要作用的非离子表面活性剂^[6,7]。使用后的NPEOs主要通过工业废水和城市污水处理系统进入水体,也有一部分直接排放进入环境。在英国,每年大约有37%的表面活性剂使

作者单位:1.清华大学环境科学与工程系(北京100084)2.北京大学环境学院(北京100083)3.北京自来水集团有限公司水质监测中心(北京100081)

作者简介:周鸿(1971-),女,湖南长沙人,讲师,博士研究生,从事饮用水卫生研究。

评价具有一定的指导意义,同时也提示烟草烟气中其他有害物质如苯并芘、自由基、重金属等可能在吸烟诱发的基因突变中起重要作用,需要进一步研究。

(感谢郑州烟草研究院赵明月、谢剑平研究员,中国疾病预防控制中心环境所刘东山同志,南华大学公共卫生学院刘玮同志、中国人民解放军307医院整形外科胡燕同志,对本研究的大力支持与帮助。)

参考文献:

- [1] Hecht SS. Cigarette smoking and lung cancer: chemical mechanisms and approaches to prevention[J]. Lancet Oncol, 2002, 3: 461-469.
- [2] Hoffmann D, Hoffmann I, El-Bayoumy K. The less harmful cigarette: a controversial issue, a tribute to Ernst L. Wynder[J]. Chem Res Toxicol, 2001, 14: 767-790.

- [3] 王彦亭, 谢剑平, 张虹, 等. 降低卷烟烟气中有害成分的技术研究[J]. 中国烟草学报, 2003, 9(3): 1-7.
- [4] Norman A, Mitchell JC, Iwamoto KS. A sensitive assay for 6-thioguanine-resistant lymphocytes[J]. Mutat Res, 1988, 208: 17-19.
- [5] Prokopeczyk B, Cox JE, Upadhyaya P, et al. Effects of dietary 1, 4-phenylenebis(methylene)selenocyanate on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced DNA adduct formation in lung and liver of A/J mice and F344 rats[J]. Carcinogenesis, 1996, 17: 749-753.
- [6] 朱茂祥, 张劲松, 杨陟华, 等. 纳米硒对4-甲基亚硝胺-1-(3-吡啶)-1-丁酮诱发昆明小鼠肺癌的防治研究[J]. 癌症, 2000, 19(10): 883-886.
- [7] 杨陟华, 朱茂祥, 龚谔芬, 等. NNK诱发人支气管上皮细胞恶性转化及氧化损伤机制研究[J]. 癌变·畸变·突变, 1999, 11(4): 184-187.
- [8] Cole J, Skopek TR. Somatic mutant frequency, mutation rates and mutational spectra in the human population in vivo[J]. Mutat Res, 1994, 304: 33-105.