

## NNK 和 B[a]P 在卷烟烟气复杂基质中的联合细胞毒性

木潏<sup>1,2</sup>, 潘秀颀<sup>2</sup>, 杨陟华<sup>2</sup>, 朱茂祥<sup>2\*</sup>, 齐绍武<sup>1\*</sup>

(1.湖南农业大学 烟草工程技术研究中心, 湖南 长沙 410128; 2.军事医学科学院 放射与辐射医学研究所, 北京 100850)

**摘要:**以苯并[a]芘(B[a]P)、甲基亚硝胺吡啶基丁酮(NNK)为目标化合物, 设置卷烟烟气冷凝物(CSC)及 NNK 的质量浓度为 0(CK)、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10、0.12、0.14、0.16 mg/mL, B[a]P 的质量浓度为 0(CK)、0.000 8、0.001 6、0.002 4、0.003 2、0.004、0.004 8、0.005 6、0.006 4 mg/mL, 研究 NNK, B[a]P 和 CSC 对人体支气管上皮细胞(BEAS-2B)的毒性作用。结果表明: CSC 的  $IC_{50}$  为 0.133 mg/mL, NNK 为 0.110 mg/mL, B[a]P 为 0.004 6 mg/mL; 低剂量 B[a]P、NNK 分别及联合与 CSC 作用细胞毒性均大于 CSC 单独作用, 二者分别与 CSC 作用均表现为协同作用; 低剂量 CSC、NNK 分别及联合与 B[a]P 作用细胞毒性均大于 B[a]P 单独作用, 二者分别与 B[a]P 联合作用均表现为协同作用; 低剂量 CSC、B[a]P 分别及联合与 NNK 作用的细胞毒性与 NNK 单独作用大小不一, 二者分别与 NNK 作用均表现为拮抗作用; 3 种毒性物质联合作用均表现为拮抗作用。

**关键词:** 卷烟; 烟气; 甲基亚硝胺吡啶基丁酮; 苯并[a]芘; 联合作用; 细胞毒性

中图分类号: TS41<sup>+1</sup> 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2012)01-0049-04

### Synergic cytotoxicity between NNK and B[a]P in the complicated cigarette smoke

MU Ying<sup>1,2</sup>, PAN Xiu-jie<sup>2</sup>, YANG Zhi-hua<sup>2</sup>, ZHU Mao-xiang<sup>2\*</sup>, QI Shao-wu<sup>1\*</sup>

(1. Research Center of Tobacco Engineering and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;  
2. Beijing Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

**Abstract:** B[a]P and NNK were used as the target compounds. CSC and NNK in the dose of 0(CK), 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10, 0.12, 0.14, 0.16 mg/mL respectively and B[a]P in the dose of 0(CK), 0.000 8, 0.001 6, 0.002 4, 0.003 2, 0.004, 0.004 8, 0.005 6, 0.006 4 mg/mL were tested by MTT to investigate their cytotoxicity on BEAS-2B cells. The result showed the  $IC_{50}$  of cigarette smoke condensates (CSC), NNK and B[a]P were 0.133, 0.110, 0.004 6 mg/mL respectively. CSC combined with low dose of B[a]P and NNK respectively or together showed larger cytotoxicity than CSC alone, and CSC with B[a]P and NNK respectively displayed synergism. Low dose of CSC and NNK respectively or together combined with B[a]P showed cytotoxicity greater than B[a]P alone, and CSC and NNK with B[a]P respectively displayed synergism. Low dose of CSC and B[a]P respectively or together combined with NNK showed antagonism. The unification of B[a]P, CSC and NNK showed antagonism.

**Key words:** cigarette; smoke; 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone(NNK); benzo[a]pyrene(B[a]P); synergic; cytotoxicity

卷烟烟气是一种极其复杂的混合物<sup>[1]</sup>, 其有害成分对人体健康的影响具有综合、动态及多样性的特点, 如何构建符合其特征性的研究方法已成为研究吸烟与健康关系的重点和难点。谢剑平等<sup>[2]</sup>发现,

在卷烟烟气的众多有害成分中, CO、HCN、NH<sub>3</sub>、甲基亚硝胺吡啶基丁酮(NNK)、苯并[a]芘(B[a]P)、苯酚、巴豆醛的毒性最大。这些有害物质之间的相互作用, 会影响单一物质的实际毒性, 且各种有害

收稿日期: 2011-11-08

基金项目: 中国烟草总公司科技项目(110200801022)

作者简介: 木潏(1987—), 女, 云南丽江人, 硕士研究生, 主要从事烟草科学与工程技术研究, muying1921@126.com; \*通信作者, qishaowu2007@yahoo.cn, zhumx@nic.bmi.ac.cn

成分的释放量在烟气中差异极显著,单一使用某种纯化学物质的毒理学评价结果来评价卷烟烟气无法诠释其复杂性。目前,国内外众多学者对卷烟烟气中有害成分的研究大多集中在单一物质的毒性影响方面<sup>[3-6]</sup>,对有害成分之间联合作用的研究较少。B[a]P、NNK为卷烟烟气中有较大代表性的有害物,虽释放量极低,但具有极强的致癌性<sup>[7-8]</sup>。笔者以肯塔基参比卷烟3R4F为研究对象,分析了B[a]P、NNK在卷烟烟气复杂基质中的联合作用,以期对卷烟烟气的安全性评价提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及主要仪器与设备

材料:肯塔基参比卷烟3R4F;胰蛋白酶、B[a]P(纯度 96%,Sigma公司);NNK(纯度 99.0%,Alfar Aesar公司);LHC-8培养液(Biofluids Inc公司);二甲亚砜(DMSO,纯度 99.9%,Sigma公司);腺病毒-12/SV40永生化的支气管上皮细胞(BEAS-2B,由美国国立癌症研究所 Harris 教授提供)。

主要仪器与设备:洁净工作台(北京冠鹏净化设备有限公司);TS100倒置显微镜(Nikon公司);BB15型CO<sub>2</sub>孵箱(Thermo公司);Milli-Q50超纯水仪(Millipore公司);680酶标仪(Multiakan公司);JJ100型单通道吸烟机(中国烟草总公司郑州烟草研究院)。

### 1.2 卷烟烟气凝聚物(CSC)的制备

连接密封的2支玻璃滴滤管作为气体采样器,第1个气体采样器内盛有95%的乙醇5.0 mL,第2个气体采样器内盛有5.0 mL蒸馏水,将卷烟烟气导入气体采样器管,设定抽吸周期为60 s、抽吸时间为2 s,连续收集10支卷烟的烟气。待最后一支吸完且气体完全吸收后,将2支管中的收集液混在一起,并用乙醇洗涤气体采样器,与前混合液混合后定容至10.0 mL,摇匀后分装于0.5 mL EP管中,于液氮罐中储存。CSC的质量浓度为10 mg/mL。

### 1.3 BEAS-2B 的培养与存活率检测

BEAS-2B细胞采用无血清LHC-8培养基,在37℃、5% CO<sub>2</sub>和95%的相对湿度条件下于培养箱中培养<sup>[9]</sup>。

分别以不同浓度CSC、B[a]P、NNK进行染毒。分别按CSC及NNK的质量浓度0(CK)、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10、0.12、0.14、0.16 mg/mL设置,B[a]P的质量浓度按0(CK)、0.000 8、0.001 6、0.002 4、0.003 2、0.004、0.004 8、0.005 6、0.006 4 mg/mL

设置。采用MTT法检测BEAS-2B细胞存活率<sup>[10]</sup>。运用SPSS13.0计算细胞半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)和95%置信区间<sup>[11-12]</sup>。

### 1.4 联合作用细胞毒性的测定与分析

采用线性回归方法分析CSC、B[a]P、NNK之间联合作用的细胞毒性。先测出三者单独作用的细胞毒性,再任选三者中的二者以固定低剂量(以单一作用细胞存活率 85%剂量为准)分别及联合与第3种物质(处理浓度)混合后作用BEAS-2B细胞,得出联合作用结果。根据联合染毒的细胞存活率,计算出CSC、B[a]P、NNK两两作用和三者联合作用的预期值<sup>[13]</sup>,并与实际值相比较。实际值小于预期值,表明受试物之间为协同作用;实际值大于预期值,表明受试物之间为拮抗作用;实际值与预期值接近,表明受试物之间无明显协同作用。

## 2 结果与分析

### 2.1 NNK、B[a]P、CSC单独作用BEAS-2B细胞的毒性

由表1可知,3种受试物单独作用细胞的毒性差异较大,B[a]P毒性最高,CSC毒性最低。本研究联合作用固定低剂量选择:CSC为0.05 mg/mL,B[a]P为0.000 4 mg/mL,NNK为0.03 mg/mL。

表1 CSC、NNK、B[a]P单独作用BEAS-2B细胞的毒性  
Table 1 Result of the BEAS-2B cells treated by CSC or NNK or B[a]P

| 受试物   | 质量浓度             |               |               | 细胞85%<br>存活率 |
|-------|------------------|---------------|---------------|--------------|
|       | IC <sub>50</sub> | 95%置信<br>区间上限 | 95%置信<br>区间下限 |              |
| CSC   | 0.133 0          | 0.101 0       | 0.150 0       | 0.056 00     |
| NNK   | 0.110 0          | 0.680 0       | 0.139 0       | 0.034 00     |
| B[a]P | 0.004 6          | 0.001 2       | 0.005 8       | 0.000 42     |

### 2.2 联合作用的细胞毒性

#### 2.2.1 低剂量B[a]P、NNK分别及二者联合与CSC作用的细胞毒性

由表2可知,不同毒性物质联合作用BEAS-2B细胞的存活率明显小于CSC单独作用(CK除外);随着CSC浓度的增大,细胞存活率下降,呈现良好的剂量效应关系;固定低剂量B[a]P(0.000 4 mg/mL)和NNK(0.03 mg/mL)分别与CSC作用BEAS-2B细胞的存活率明显低于预期值(CK除外),相加作用明显;二者联合与CSC作用的细胞存活率与预期值差异不大,随CSC浓度的增大,呈弱拮抗作用;3个组合作用细胞的毒性以CSC+NNK最大,CSC+B[a]P最小。

表 2 低剂量 B[a]P、NNK 分别及二者联合与 CSC 作用的细胞存活率

| CSC 质量浓度<br>(/mg·mL <sup>-1</sup> ) | 细胞存活率/% |           |        |         |       |               |       |
|-------------------------------------|---------|-----------|--------|---------|-------|---------------|-------|
|                                     | CSC     | CSC+B[a]P |        | CSC+NNK |       | CSC+NNK+B[a]P |       |
|                                     |         | 实际值       | 预期值    | 实际值     | 预期值   | 实际值           | 预期值   |
| 0.00                                | 100.00  | 100.00    | 94.40  | 100.00  | 85.12 | 100.00        | 78.50 |
| 0.02                                | 101.80  | 95.59     | 100.10 | 77.21   | 90.81 | 79.15         | 84.19 |
| 0.04                                | 93.07   | 81.00     | 88.54  | 63.12   | 79.26 | 73.57         | 72.64 |
| 0.06                                | 84.89   | 66.40     | 77.00  | 44.80   | 67.72 | 55.97         | 61.10 |
| 0.08                                | 73.81   | 51.43     | 65.46  | 35.91   | 56.18 | 40.63         | 49.56 |
| 0.10                                | 63.84   | 35.04     | 53.91  | 27.12   | 44.63 | 35.08         | 38.01 |
| 0.12                                | 49.85   | 14.23     | 42.37  | 20.12   | 33.09 | 28.81         | 26.47 |
| 0.14                                | 30.89   | 8.21      | 30.83  | 10.91   | 21.55 | 23.19         | 14.93 |
| 0.16                                | 24.95   | 6.32      | 19.28  | 6.50    | 10.00 | 8.62          | 3.38  |

## 2.2.2 低剂量 CSC、NNK 分别及二者联合与 B[a]P 作用的细胞毒性

由表 3 可知,不同毒性物质联合作用 BEAS-2B 细胞的存活率明显小于 B[a]P 单独作用(CK 除外),随 B[a]P 浓度的增大,呈现良好的剂量效应关系。固定低剂量 CSC(0.05 mg/mL)和 NNK(0.03 mg/mL)

分别与 B[a]P 联合作用后,细胞存活率均低于预期值(CK 及 0.006 4 mg/mL 处理除外),协同作用明显;二者联合与 B[a]P 作用细胞存活率明显高于预期值,表现出拮抗作用。3 个组合作用细胞的毒性以 B[a]P + NNK 最大, B[a]P+CSC +NNK 最小。

表 3 低剂量 CSC、NNK 分别及二者联合与 B[a]P 作用的细胞存活率

| B[a]P 质量浓度<br>(/mg·mL <sup>-1</sup> ) | 细胞存活率/% |             |       |             |       |                |       |
|---------------------------------------|---------|-------------|-------|-------------|-------|----------------|-------|
|                                       | B[a]P   | B[a]P + CSC |       | B[a]P + NNK |       | B[a]P+CSC +NNK |       |
|                                       |         | 实际值         | 预期值   | 实际值         | 预期值   | 实际值            | 预期值   |
| 0.000 0                               | 100.00  | 100.00      | 90.77 | 100.00      | 85.12 | 100.00         | 75.88 |
| 0.000 8                               | 91.94   | 69.04       | 81.33 | 55.55       | 75.65 | 90.63          | 66.41 |
| 0.001 6                               | 82.38   | 57.37       | 73.66 | 43.12       | 67.98 | 77.63          | 58.74 |
| 0.002 4                               | 73.38   | 47.77       | 65.99 | 37.47       | 60.31 | 66.47          | 51.07 |
| 0.003 2                               | 65.49   | 42.52       | 58.32 | 33.07       | 52.64 | 58.20          | 43.40 |
| 0.004 0                               | 60.42   | 39.59       | 50.65 | 31.09       | 44.97 | 51.72          | 35.73 |
| 0.004 8                               | 51.49   | 32.88       | 42.98 | 28.68       | 37.30 | 47.60          | 28.06 |
| 0.005 6                               | 44.55   | 30.42       | 35.31 | 25.96       | 29.63 | 41.45          | 20.39 |
| 0.006 4                               | 36.37   | 28.70       | 27.64 | 24.28       | 21.96 | 33.15          | 12.72 |

## 2.2.3 低剂量 CSC、B[a]P 分别及二者联合与 NNK 作用的细胞毒性

由表 4 可知,NNK+CSC 联合作用 BEAS-2B 细胞的存活率高于 NNK 单独作用(CK 及 0.02、0.04 mg/mL 处理除外);NNK + B[a]P 联合作用 BEAS-2B 细胞的存活率在 0.08、0.10、0.12、0.14、0.16 mg/mL 处理下高于 NNK 单独作用,其余处理

均低于 NNK 单独作用(CK 除外);NNK+CSC+B[a]P 仅在 0.12、0.14、0.16 mg/mL 处理下的细胞存活率高于 NNK 单独作用组。固定低剂量的 CSC(0.05 mg/mL)和 B[a]P(0.000 4 mg/mL)分别及联合与 NNK 作用细胞存活率高于预期值,表现为拮抗作用;3 个联合作用组合的细胞毒性以 NNK+CSC+B[a]P 联合毒性最大,NNK + CSC 最小。

表 4 低剂量 CSC、B[a]P 分别及二者联合与 NNK 作用的细胞存活率

| NNK 质量浓度<br>(/mg·mL <sup>-1</sup> ) | 细胞存活率/% |           |       |             |       |               |       |
|-------------------------------------|---------|-----------|-------|-------------|-------|---------------|-------|
|                                     | NNK     | NNK + CSC |       | NNK + B[a]P |       | NNK+CSC+B[a]P |       |
|                                     |         | 实际值       | 预期值   | 实际值         | 预期值   | 实际值           | 预期值   |
| 0.00                                | 100.00  | 100.00    | 90.76 | 100.00      | 94.36 | 100.00        | 85.12 |
| 0.02                                | 88.61   | 87.77     | 81.08 | 86.67       | 84.66 | 81.65         | 75.43 |
| 0.04                                | 81.43   | 75.34     | 70.49 | 73.79       | 74.06 | 67.11         | 64.84 |
| 0.06                                | 69.87   | 71.21     | 59.91 | 66.61       | 63.47 | 56.31         | 54.26 |
| 0.08                                | 57.69   | 66.17     | 49.32 | 60.80       | 52.87 | 49.73         | 43.67 |
| 0.10                                | 46.98   | 63.22     | 38.73 | 53.85       | 42.27 | 44.65         | 33.08 |
| 0.12                                | 37.03   | 60.79     | 28.14 | 44.82       | 31.67 | 42.86         | 22.49 |
| 0.14                                | 27.52   | 54.19     | 17.55 | 41.51       | 21.07 | 40.01         | 11.90 |
| 0.16                                | 21.31   | 49.74     | 6.97  | 36.69       | 10.48 | 37.45         | 1.32  |

### 3 小 结

本试验以BEAS-2B为靶细胞,通过对CSC及其最具代表性的有害成分NNK和B[a]P的联合作用细胞毒性进行分析,发现B[a]P、NNK与CSC均具有体外细胞毒性,且存在明显剂量效应关系。低剂量B[a]P、NNK分别及联合与CSC作用细胞毒性均高于CSC单独作用;二者分别与CSC作用均表现为协同作用;二者联合与CSC作用,呈弱拮抗作用。低剂量CSC、NNK分别及联合与B[a]P作用细胞毒性均大于B[a]P单独作用;二者分别与B[a]P作用均表现为协同作用;二者联合与B[a]P作用,表现为拮抗作用。低剂量CSC、B[a]P分别及联合与NNK作用,NNK+CSC联合作用BEAS-2B细胞的存活率高于NNK单独作用(CK及0.02、0.04 mg/mL处理除外);NNK + B[a]P联合作用BEAS-2B细胞的存活率在0.08、0.10、0.12、0.14、0.16 mg/mL处理下高于NNK单独作用,其余处理均低于NNK单独作用(CK除外);NNK+CSC+B[a]P仅在0.12、0.14、0.16 mg/mL处理下的细胞存活率高于NNK单独作用组;二者分别及联合与NNK作用均表现为拮抗作用。笔者推测NNK可能与卷烟烟气中其他成分发生拮抗作用,随着NNK含量的上升,激活了BEAS-2B细胞NNK代谢的相关酶类物质,促使NNK代谢加快,表现为细胞存活率下降趋势变缓,联合细胞毒性变小。

相关研究<sup>[14]</sup>表明,B[a]P可导致肺癌A549细胞DNA损伤,使细胞周期发生阻滞;B[a]P与多氯联苯联合作用时,能抑制B[a]P代谢产物葡萄糖化,减缓B[a]P代谢速率<sup>[15]</sup>;2,4,6-三硝基甲苯(TNT)与B[a]P呈拮抗效应,可阻止B[a]P进入细胞<sup>[16]</sup>;NNK能造成细胞的氧化损伤<sup>[4]</sup>,与肺癌的相关性很高<sup>[17]</sup>;α粒子和NNK联合作用于BEP-2D细胞时,协同效应显著<sup>[13]</sup>。本研究结果表明,B[a]P与CSC之间存在协同作用,而B[a]P、CSC、NNK联合作用均呈现拮抗效应。卷烟烟气中其他有害成分(如苯酚、巴豆醛、重金属等)物质之间的相关性有待研究。

#### 参考文献:

[1] Baker R R, Pereira JR da Silva, Smith G. The effect of tobacco ingredients on smoke chemistry I: Flavourings and additives[J]. Food and Chemical Toxicology, 2004,

- 42: 32-37.
- [2] 谢剑平,刘惠民,朱茂祥.卷烟烟气危害性指数研究[J].烟草科技,2009(2):5-15.
- [3] Kawaguchi M, Shibata N, Mori S, et al. Crotonaldehyde accumulates in glial cells of a Alzheimer's disease brain [J]. Acta Neuropatho, 2006, 111(5): 422-429.
- [4] 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理研究[J]. 癌变·畸变·突变, 1999, 11(4): 184-188.
- [5] 颜璐,张天宝. 苯并[a]芘诱导BEAS-2B细胞恶性转化的不同阶段特征[J]. 毒理学杂志, 2007, 21(4): 328-329.
- [6] 天建华,刘爱华,吴平艳,等. 国内外22个牌号卷烟烟气有害生物效应的比较研究[J]. 中国烟草学报, 2003, 9(4): 12-19.
- [7] Cooper R L, Lindsey A J, Waller R E. The presence of 3,4-benzopyrene in cigarette smoke[J]. Chem Ind, 1954, 46: 14-18.
- [8] Hecht S S, Hoffmann D. The relevance of tobacco-specific nitrosamines to human cancer[J]. Cancer Surv, 1989(8): 273-294.
- [9] 司徒镇强,吴军正. 细胞培养[M]. 西安:世界图书出版公司, 2007: 200-201.
- [10] 刘荣,齐绍武,朱茂祥,等. 卷烟烟气有害成分联合作用的细胞毒性[J]. 烟草科技, 2009(9):27-31
- [11] 赵斌,葛金芳,朱娟娟,等. 小议在MTT法测细胞增殖抑制率中 $IC_{50}$ 的计算方法[J]. 安徽医药, 2007, 11(9): 834-836.
- [12] Schleder E, Genschow E, Spielmann H, et al. Oral acute toxic class method: A successful alternative to the oral  $LD_{50}$  test [M]. United States: Regul Toxicol Pharmacol, 2005: 15-23.
- [13] 李平,杨陟华,潘秀颜,等. α粒子和NNK联合作用的细胞毒性研究[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2006(12): 583-586.
- [14] 吴晓明,周宜开,王志勇,等. 苯并(a)芘对肺癌细胞DNA损伤及修复基因表达水平的影响[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2002, 20(6): 443-445.
- [15] Margaret O J, Kevin M K, Zhang Y B, et al. Increased toxicity of benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol in the presence of polychlorobiphenyls[J]. Marine Environmental Research, 2004, 58: 343-346.
- [16] Washburn K S, Donnelly K C, Huebner H J, et al. A study of 2,4,6-trinitrotoluene inhibition of benzo(a)pyrene up take and activation in a microbial mutagenicity assay[J]. Chemosphere, 2001, 44: 1703-1709.
- [17] 张红,刘铭. NNK结构与其代谢机理和致癌性研究[J]. 宝鸡文理学院学报:自然科学版, 2007, 27(4): 287-290.

责任编辑: 杨盛强