

# 卷烟烟气体内安全评价方法研究

宁 维<sup>1,2</sup>, 陈利平<sup>2</sup>, 李 瑜<sup>1</sup>, 李智奕<sup>1,2</sup>, 韩亚伟<sup>2\*</sup>, 郭亚鹏<sup>2</sup>

(1. 河南农业大学, 河南 郑州 450002; 2. 郑州轻工业学院, 河南 郑州 450002)

**摘要:** 为研究卷烟烟气对机体的毒害作用, 参照国内外卷烟烟气安全评价方面的实验模型程序及方法, 应用国产昆明系小鼠探索建立卷烟烟气体内安全评价方法。将 60 只小鼠随机分为对照组和吸烟组, 吸烟组在染毒箱中全烟气暴露 2 h/d, 10 支烟/次, 每周 6 次, 连续暴露 4 个月后解剖取其相关组织, 并进行病理学、免疫组化和蛋白质组学分析。结果显示, 与对照组相比, 吸烟组小鼠肺脏、肝脏组织内可见明显的病理变化; 吸烟组小鼠肺组织、肝组织的增殖细胞抗原 (PCNA) 和 p53 蛋白阳性表达率分别为 80.0% 和 66.7%、73.3% 和 60.0%, 显著高于对照组小鼠 ( $P < 0.01$ ); 吸烟组小鼠肺组织部分水溶性蛋白表达明显下调, 分子量为 18.6~23.6 kD 的部分蛋白条带含量明显降低, 肝脏分子量为 14.4~18.6 kD 的蛋白含量明显降低。本试验通过动物模型建立了卷烟烟气体内安全评价方法。

**关键词:** 卷烟烟气; 体内; 安全评价; 昆明小鼠

中图分类号: TS41<sup>+</sup>1 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2013)09-0152-05

## Study on the Safety Evaluation Method of Cigarette Smoke *in vivo*

NING Wei<sup>1,2</sup>, CHEN Li-ping<sup>2</sup>, LI Yu<sup>1</sup>, LI Zhi-yi<sup>1,2</sup>, HAN Ya-wei<sup>2\*</sup>, GUO Ya-peng<sup>2</sup>

(1. Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2. Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** In order to examine the possibility of the safety evaluation method of cigarette smoke *in vivo*, the specific toxic effects of cigarette smoke on the body of Kunming mice were performed according to the procedures and methods for safety assessment of cigarette smoke at home and abroad. Sixty mice were randomly divided into 2 groups, normal control and exposed control. The animals except normal control were exposed to tobacco smoke for 4 months (2 hours per day, 10 cigarettes, 6 days per week). Then the mice were killed for pathological, immunohistochemical and proteomic analysis. The lungs of exposed mice showed significant inflammatory cell infiltration, varying degree hyperplasia of goblet cell, the alveolar spaces of different sizes, some of them thinning or breakage, and the presence of significant sediment. Compared to that of the normal controls, the liver enlarged and cells degenerated with widespread, the volume increased, the number increased significantly, disorganized crowd, showing inflammatory cell infiltration mildly. The positive rates of PCNA and p53 protein expression in lung and liver were 80.0%, 66.7%; 73.3% and 60.0%, respectively, significantly higher than that of the normal controls. The water-soluble protein of the exposed control group was significantly lower, part of the protein bands with molecular weights of 18.6—23.6 kD in lung and 14.4—18.6 kD in liver was reduced significantly. This study established a safety assessment of cigarette smoke *in vivo* with Kunming mice successfully.

**Key words:** cigarette smoke; *in vivo*; safety evaluation; Kunming strain mouse

收稿日期: 2013-05-13

基金项目: 河南省科技厅基础研究项目 (102300410109)

作者简介: 宁 维 (1985-), 女, 陕西咸阳人, 在读硕士研究生, 研究方向: 食品安全评价。E-mail: ningwei2012@126.com

\* 通讯作者: 韩亚伟 (1973-), 男, 河南商丘人, 副教授, 博士, 主要从事分子生物学研究。E-mail: ywhan@zzuli.edu.cn

卷烟烟气在卷烟燃吸过程中由烟草燃烧、裂解和蒸馏产生,含几千种化学物质,其中许多组分对人体都具有一定的毒性作用<sup>[1-2]</sup>。近年来,随着社会各界对吸烟与健康问题的日益重视,对于卷烟烟气危害性的研究逐渐成为烟草化学和毒理学研究的重点。目前,卷烟烟气的安全性评价主要集中在体外毒理学研究方面,体外毒理学方法主要包括细胞毒性和基因毒性2个方面<sup>[3]</sup>,尽管其对评价不同卷烟的烟气或烟气冷凝物的相对毒性有效,但往往只偏重于少数几项有害成分的分析,使得对卷烟烟气的安全性评价指标比较单一,缺乏说服力。而关于卷烟烟气体内安全评价方法的建立,国内外尚未见报道。因此,为健全卷烟烟气的安全评价体系,建立更加科学、合理的卷烟烟气安全评价方法,全烟气体内安全评价体系的建立十分必要。

本研究参照国内外吸烟导致各种病变的动物模型<sup>[4-11]</sup>,采用国产昆明系小鼠,使其在全烟气暴露装置中被动吸烟,探索卷烟烟气体内安全评价方法的可行性,为建立卷烟烟气的生物安全评价体系提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料、试剂和仪器

1.1.1 供试动物 KM 雄性小鼠(5 周龄,SPF 级),体质量 20~25 g,由河南省实验动物中心提供,合格证号:SCXK(豫)2010-0002。饲养过程光照模式为标准化、环境温度 25℃、湿度 70%。自由进食,环境适应期 7 d。

1.1.2 试剂 增殖细胞核抗原(PCNA)试剂盒、p53 试剂盒由北京康为世纪生物科技有限公司提供;丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、十二烷基磺酸钠(SDS)、Tris、甘氨酸购自 Sigma 公司;过硫酸铵、四甲基乙二胺(TEMED)购自 Bio-rad 中国公司;溴酚蓝、考马斯亮蓝 R-250、考马斯亮蓝 G-250、蛋白分子量标准购自北京索莱宝科技有限公司;氯化钠、氯化镁为分析纯,购自天津市科密欧化学试剂有限公司;散花牌过滤嘴香烟(焦油量 11 mg/支,烟气烟碱量 0.7 mg/支)购自河南中烟工业有限责任公司。

1.1.3 仪器 TYAP1212 微型真空泵购自宁波北仑跳跳机械有限公司;显微镜购自日本奥林巴斯;玻璃匀浆器、BR4i multifunction 高速冷冻离心机购自美国 Thermo 公司;UV-5100 型紫外可见分光光度计购自上海元析仪器有限公司;梯度电泳仪购自美国 Bio-rad 公司;JS-680B 凝胶成像分析仪购自上海培清科技有限公司;染毒箱为自制,参照文献<sup>[4-11]</sup>

方法,A 箱为烟气暴露箱,B 箱为烟气伪暴露箱。

### 1.2 试验设计

在染毒箱中采取被动式吸入方式,温度 25℃、湿度 70%。将小鼠随机分为 2 组,每组 30 只,分别为吸烟组和对照组。吸烟组每天在 A 箱中全烟气暴露 2 h,每次 10 支烟,1 周染毒 6 次,连续暴露 4 个月。对照组放入 B 箱内,除全烟气暴露外,其余条件均同吸烟组,连续饲养 4 个月。期间每天监测染毒箱内环境,每周测量小鼠体质量,日常观察其一般形态(行为、精神状态、皮毛、分泌物等)<sup>[9-10]</sup>。

### 1.3 病理学诊断

染毒结束后,将小鼠脱颈致死,取其气管、肺、肝、肾、脾、胃、肠、膀胱和睾丸组织,用 4℃ 的 0.9% 生理盐水清洗,随即将全部组织均分为 3 份,1 份用 10% 缓冲福尔马林固定液固定 24 h,然后进行常规石蜡包埋,切片(4 μm),HE 染色,进行病理观察。其余 2 份保存备用。

### 1.4 免疫组织化学法

对 HE 染色后观察有异常的切片,采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶免疫组化方法(S-P 法)进行免疫组织化学染色。镜下观察细胞 PCNA 及 p53 蛋白的表达情况。对染色阳性细胞于高倍镜(40×)下随机取 10 个视野,共计数 1 000 个细胞,记录每 100 个细胞中的阳性细胞数,取其平均值,以染色阳性细胞占所计数全部细胞的百分率作为阳性表达率。蛋白表达情况判别标准为(1)阴性(-):染色阳性细胞<25%;(2)阳性(+):染色阳性细胞所占比例为 25%~49%;(3)强阳性(++):阳性细胞≥50%。每次试验均以已知阳性切片作为阳性对照,以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

### 1.5 水溶性总蛋白的差异表达

取病理观察有异常的组织于 4℃ 蛋白提取缓冲液(pH 值 7.5)中匀浆(组织湿质量与缓冲液的质量体积比为 1:10),4℃、12 000 g 离心 15 min,取上清得水溶性总蛋白。根据考马斯亮蓝法测量蛋白质浓度,取 15 μL 蛋白质样品(35 μg)与等量 2× 上样缓冲液混匀后沸水加热 3~5 min,冰浴后离心,在 12% 的 SDS-PAGE 凝胶中分离蛋白,考马斯亮蓝 R-250 染色 60 min,脱色液(甲醇:冰乙酸:双蒸水=1:1:8)中脱色至无色即可<sup>[12]</sup>。在凝胶成像分析仪上成像。

### 1.6 统计分析

应用 SPSS 13.0 统计学软件处理数据,试验结果采用平均值±标准差表示,采用  $\chi^2$  检验,组间比较采用 *t* 检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 全烟气暴露 1 个月后小鼠体质量及饮食量情况

日常观察小鼠一般形态,所有小鼠对全烟气和环境适应良好,没有因为试验因素直接导致死亡。吸烟 1 个月后,与对照组相比,吸烟组皮毛发黄、不光滑,吸烟过程中动作迟缓,分泌物未见异常。表 1 所示,吸烟组小鼠体质量及饮食量变化显著低于对照组( $P<0.05$ )。

表 1 吸烟 1 个月后小鼠体质量及饮食量比较

组别	体质量变化/g	饮食量变化/g
吸烟组	$36.3 \pm 4.50^*$	$57.8 \pm 7.33^*$
对照组	$43.8 \pm 6.49$	$66.2 \pm 3.58$

注: \* 表示吸烟组与对照组比较差异显著( $P<0.05$ )。

### 2.2 病理学诊断结果

观察切片发现,除肺和肝外,吸烟组小鼠其余组织均与对照组无明显差异。对照组小鼠(图 1a)肺组织结构正常,肺泡间隔完整、清晰,无明显炎症细胞浸润。吸烟组小鼠(图 1b)肺内可见明显炎症细胞浸润,纤毛倒伏缺失,杯状细胞不同程度增生,肺泡腔大小不一,部分肺泡间隔变薄或断裂。与正常肝脏组织(图 1c)相比,吸烟组(图 1d)肝脏肿大,表面光滑,肝细胞出现广泛的变性,且以细胞水肿为主,表现为肝细胞胞质疏松淡染和气球样变,肝细胞体积增大,数量明显增多,排列紊乱拥挤,可见轻度炎症细胞浸润。

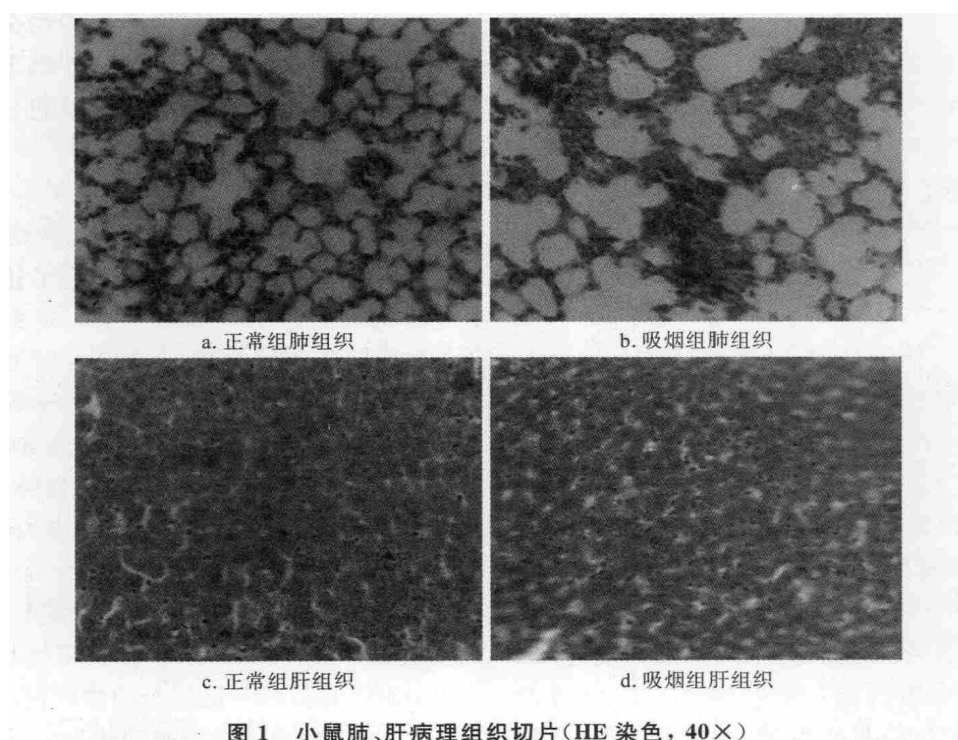


图 1 小鼠肺、肝病理组织切片(HE 染色, 40×)

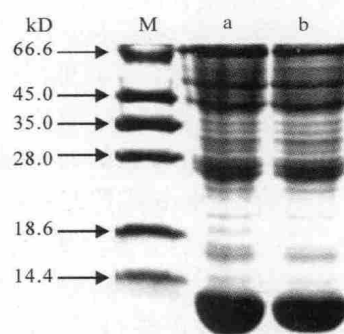
### 2.3 免疫组化检测结果

免疫组化结果以细胞内出现明显棕黄色颗粒者为 PCNA、p53 阳性细胞。吸烟组肺组织的 PCNA 蛋白阳性表达率为 80.0%, p53 蛋白阳性表达率为 66.7%, 其中阳性(+)占 73.3%(22/30)、强阳性(++)占 6.7%(2/30);吸烟组肝组织的 PCNA 蛋白阳性表达率为 73.3%(22/30), p53 蛋白阳性表达率为 60.0%, 其中阳性(+)占 53.3%(16/30)、强阳性(++)占 6.7%(2/30), 与对照组肺、肝组织的 PCNA 及 p53 蛋白表达间差异极显著( $P<0.01$ )。

### 2.4 肺、肝水溶性总蛋白的表达

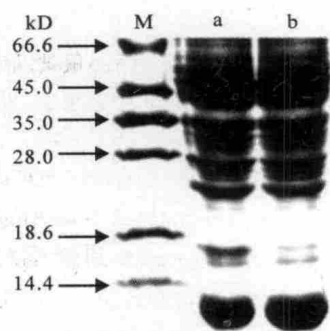
从图 2、图 3 可以看出,与对照组相比,吸烟组小鼠的肺、肝水溶性总蛋白有明显变化。吸烟组小鼠肺组织部分水溶性蛋白表达明显下调,分子量为

18.6~23.6 kD 的一部分蛋白条带含量明显降低;吸烟组小鼠肝脏分子量为 14.4~18.6 kD 的水溶性总蛋白含量明显降低。



M. 蛋白分子量标准; a. 对照组; b. 吸烟组

图 2 肺水溶性总蛋白 SDS-PAGE 凝胶电泳结果



M. 蛋白分子量标准; a. 对照组; b. 吸烟组

图3 肝水溶性总蛋白 SDS-PAGE 凝胶电泳结果

### 3 结论与讨论

自16世纪烟草传入欧洲以后,人们对吸烟与健康问题就产生了不同的看法。一般认为吸烟与肺癌、心血管病以及慢性阻塞性肺疾病有明显相关性,但对于结肠溃疡、骨质疏松症等具有一定的保护作用<sup>[13]</sup>。但由于缺乏足够的科学依据,以至于长期以来未得到明确的结论。截至目前,对卷烟烟气的内安全评价主要集中在体外毒理学方面,且往往只偏重于少数几种有害成分的分析,而对卷烟烟气的体内安全评价研究尚未见报道。

本研究采用国产昆明系小鼠,通过被动式的全烟气暴露模式,建立卷烟烟气体内安全评价模型。该模型可完全收集卷烟的主流烟气和侧流烟气,使动物完全暴露在烟气环境中,这将使动物对全烟气进行更加全面地吸收,从而更能真实地评价全烟气通过各种途径进入体内后对机体造成的危害,但机体对卷烟烟气的摄入量目前仍无法准确测量,有待进一步研究。在全烟气暴露1个月后,吸烟组小鼠的体质量及饮食量显著低于对照组。说明卷烟烟气可影响小鼠的生长,对其生长有明显的抑制作用。全烟气暴露4个月后,吸烟组小鼠肺泡内可见明显炎症细胞浸润,肺泡腔大小不一,部分肺泡间隔变薄或断裂现象,且肺部有明显沉积物存在。肝细胞核表面光滑,异染色质增加,肝细胞体积增大,细胞核数量明显增多。其气管、肾、脾、胃、肠、膀胱和睾丸组织与对照组相比均未见明显异常。这说明在短时期内,卷烟烟气对小鼠肝、肺影响较大,而对其他组织器官影响较小。同时,这还与吸烟的数量有很大关系。郑卫星等<sup>[14]</sup>研究证明,长期吸烟与肺癌的发病率具有相关性。

PCNA只存在于正常增殖细胞和肿瘤细胞内,在细胞增殖的启动上起重要作用,是反映细胞增殖状态的良好指标。PCNA是一种分子量为36 kD的蛋白质,在细胞核内合成,并存在于细胞核内,为

$\delta$ -DNA聚合酶的辅助蛋白。而 $\delta$ -DNA聚合酶是真核生物DNA复制中起主要作用的酶之一,能够促进DNA的延长<sup>[15]</sup>。因此,PCNA的合成和表达与细胞增殖状态密切相关,是目前反映细胞增殖状态的主要生物指标。本试验中,吸烟组肺、肝组织的PCNA蛋白阳性表达率分别为80%和73.3%,与对照组小鼠之间具有极显著差异( $P<0.01$ ),说明吸烟组小鼠肝、肺细胞增殖极其活跃,这与肝、肺的损伤类型、浸润深度及淋巴结转移等密切相关,进一步说明卷烟烟气对小鼠肝、肺具有明显的损伤作用。

p53是一种肿瘤抑制基因,是细胞生长周期中的负调节因子,与细胞周期的调控、DNA修复、细胞分化、细胞凋亡等重要的生物学功能有关。p53蛋白是由p53基因编码的393个氨基酸组成的53 kD的核内磷酸化蛋白,分为野生型和突变型。其中野生型p53蛋白由于其半衰期短,且在正常细胞中含量低,很难检出。而突变型p53蛋白由于其基因发生点突变,蛋白质构象发生改变,稳定性增加,且能与一些癌蛋白形成稳定的复合物,使其半衰期大大延长,且含量增多,通常可用免疫组织化学方法检测<sup>[16]</sup>。Miller等<sup>[17]</sup>利用分子生物学方法,验证了肺癌中及肺癌癌变过程中存在p53基因突变。在本试验中,使用免疫组织化学方法检测吸烟小鼠肝、肺中p53蛋白表达情况,结果显示,吸烟组小鼠肝、肺p53蛋白阳性表达率分别为66.7%和60%,极显著高于对照组( $P<0.01$ ),且在20例肺p53阳性表达者中发现有17例呈PCNA阳性表达。说明吸烟组小鼠肝、肺部基因突变率增加,细胞增殖活跃。

本试验采用标本混合的方法提取蛋白质,即将同一组的肺、肝组织混合均匀,在同等条件下提取蛋白质。这种方法能够有效降低个体差异所造成的分析上的复杂性,避免错误信息。在蛋白质组研究中,标本混合的方法可以作为试验设计的一个新思路<sup>[18]</sup>。蛋白质是生命的物质基础,在不同的应激条件或病理状态下,蛋白质组成的细胞或组织在特定条件下所表达的蛋白质组成和含量也都会发生变化。刘安军等<sup>[19]</sup>对小鼠肺、肝水溶性总蛋白的差异表达进行了初步研究,从蛋白质组学角度研究了卷烟烟气对小鼠肺、肝的影响,为预防和治疗肺损伤的研究提供了理论依据。但从试验结果来看,蛋白质表达差异不显著。这可能是因吸烟的剂量小、时间短所致,其具体原因有待后期研究证实。

本研究通过建立动物模型,初步探讨了卷烟烟气的体内安全评价方法。结果表明,在短时期内,卷烟烟气对小鼠肝、肺影响较为明显,而对其气管、肾、

脾、胃、肠、膀胱和睾丸组织影响较小。该方法的建立,为后期进一步完善卷烟烟气的生物安全评价体系奠定了基础。但由于试验采用动物种属的限制,其结果稳定性仍需进一步验证。

#### 参考文献:

- [1] Bombick D W, Ayres P H, Putnam K, *et al.* Chemical and biological studies of a new cigarette that primarily heats tobacco. Part 3: *In vitro* toxicity of whole smoke [J]. Food and Chemical Toxicology, 1998, 36(3): 191-197.
- [2] Richard R, Baker, José R, *et al.* The effect of tobacco ingredients on smoke chemistry. Part I: Flavourings and additives [J]. Food and Chemical Toxicology, 2004, 42(2): 3-37.
- [3] 卢斌斌, 姚玮华. 卷烟烟气体外毒理学测定方法研究进展[J]. 中国烟草学报, 2008, 14(2): 65-69.
- [4] Witschi H P, Espiritu I, Maronpot R R, *et al.* The carcinogenic potential of the gas phase of environmental tobacco smoke[J]. Carcinogenesis, 1997, 18(11): 2035-2042.
- [5] Witschi H P, Espiritu I, Peake J L, *et al.* The carcinogenicity of environmental tobacco smoke[J]. Carcinogenesis, 1997, 18(3): 575-586.
- [6] D'Agostini F, Balansky R M, Bennicelli C, *et al.* Pilot studies evaluating the lung tumor yield in cigarette smoke-exposed mice[J]. Int J Oncol, 2001, 18(3): 607.
- [7] Shigemitsu O, Kazutetsu A, Masashi K, *et al.* Platinum nanoparticle antioxidants inhibit pulmonary inflammation in mice exposed to cigarette smoke[J]. Pulmonary Pharmacology & Therapeutics, 2009, 22(4): 340-349.
- [8] 王心如. 毒理学实验方法与技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 16-17.
- [9] 杨杰, 袁振丽, 姜丽娜, 等. 昆明系小鼠被动吸烟肺肿瘤模型的建立[J]. 解放军预防医学杂志, 2006, 24(2): 99-102.
- [10] Witschi H P, Espiritu I, Uyeminami D. Chemoprevention of tobacco smoke-induced lung tumors in A/J strain mice with dietary myoinositol and dexamethasone[J]. Carcinogenesis, 1999, 20(7): 1375.
- [11] 毕波, 周昆, 郑赛晶, 等. 卷烟诱导小鼠咳嗽和痰液分泌模型的研究[J]. 实验动物科学, 2010, 27(2): 10-12.
- [12] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 2006: 100-110.
- [13] 张文友, 马晓河. 卷烟烟气中的有害化学物质及与健康的关系[J]. 西昌学院学报, 2005, 19(3): 63-66.
- [14] 郑卫星, 李若葆. 长期吸烟与肺癌患者 NF- $\kappa$ B 表达的相关性研究[J]. 临床内科杂志, 2011, 28(2): 125-127.
- [15] Warbriek E. The puzzle of PCNA's many partners [J]. Bioessays, 2000, 22(11): 997-1006.
- [16] Eleftherios P, Diamandis. Clinical applications of the p53 tumor suppressor gene[J]. Clinical Chimica Acta, 1995, 237(1/2): 79-90.
- [17] Miller C W, Simonk K, Aslo A, *et al.* p53 mutations in human lung tumor[J]. Cancer Res, 1992, 52: 1659.
- [18] 王立顺, 尹艳慧, 高素君, 等. 以双向凝胶电泳为基础的食管癌组织蛋白质组学分析新策略[J]. 中国免疫学杂志, 2003, 19(4): 230.
- [19] 刘安军, 孟艳丽, 曹东旭, 等. 四氧嘧啶导致小鼠肝脏损伤相关肝脏差异蛋白的研究[J]. 食品工业科技, 2007, 23(9): 20-23.