

· 论 著 ·

基于 TK 基因突变试验评价卷烟烟气的遗传毒性

尚平平¹, 李翔¹, 谢复炜¹, 霍娇², 华辰凤¹

1. 中国烟草总公司郑州烟草研究院, 郑州 450001; 2. 四川大学华西公共卫生学院

摘要:目的 采用 TK 基因突变试验研究卷烟烟气的遗传毒性。方法 以 L5178Y tk^{+/+}-3.7.2C 小鼠淋巴瘤细胞为研究对象, 3R4F 参比卷烟的烟气为受试物, 卷烟烟气经 DMSO 萃取后, 设置试验剂量组为 20、40、80、100、150 μg/mL, 另设二甲基亚砜溶剂对照组和环磷酰胺阳性对照组, 对 L5178Y tk^{+/+}-3.7.2C 小鼠淋巴瘤细胞染毒处理及表达。结果 在加 S9 的情况下, 80 μg/mL 的突变频率是溶剂对照组 3 倍以上, 实验结果呈阳性。结论 在此次试验条件下, 卷烟烟气具有 TK 基因致突变作用。

关键词: 卷烟烟气; TK 基因突变试验

中图分类号: R114 文献标志码: A 文章编号: 1006-2483(2018)05-0023-03 DOI: 10.3969/j.issn.1006-2483.2018.05.006

Genotoxicity of cigarette smoke by using the TK gene mutation test

SAHNG Pingping¹, LI Xiang¹, XIE Fuwei¹, HUO Jiao², HUA Chenfeng¹

1. Zhengzhou Tobacco Research Institute of China National Tobacco Corporation, Zhengzhou 450001, China

2. West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610000, China

Corresponding author: HUA Chenfeng, Email: niya_lucky@126.com

Abstract: **Objective** To investigate the potential genotoxicity of cigarette smoke using the TK gene mutation test. **Methods** The cigarette smoke condensate (CSC) of the reference cigarette 3R4F was extracted by DMSO. The L5178Y tk^{+/+}-3.7.2C mouse lymphoma cells were treated with CSC at different concentrations, 20, 40, 80, 100 and 150 μg/mL, for 3 h. Dimethyl sulfoxide was the solvent control group, and cyclophosphamide was positive control group. **Results** With metabolic activation, the TK gene mutation frequency of 80 μg/mL group was more than 3 times higher than that of the solvent control group. **Conclusion** The results indicate that cigarette smoke containing toxicant inducing TK gene mutation.

Keywords: Cigarette smoke; TK gene mutation test

吸烟与健康一直是卫生科研工作者的关注热点, 世界卫生组织《2015 年全球吸烟流行趋势报告》^[1]中指出吸烟是引起死亡的风险因素之一。卷烟烟气中有 5 315 种化学成分, 其中有 93 种具有或可能有毒性作用^[2]。目前国内外对卷烟烟气的危害评价主要以烟草科学研究合作中心(Cooperation Centre for Scientific Research Relative to Tobacco, CORESTA) 烟草烟气体外测试工作组推荐的细胞毒性试验^[3]、Ames 试验^[4]和体外微核试验^[5]为主。而卷烟烟气中的有害成分包括多种遗传毒性化合物^[6-8]如多环芳烃, 烟草特有亚硝胺等, 导致的遗传学终点也有所不同^[9], 仅仅采用 Ames 试验和体外微核试验并不足以全面评价卷烟烟气的遗传毒性,

而且与食品添加剂、食品接触材料用物质^[10]、药物等遗传毒性检测的试验组合有一定的差距。

目前, 国内外食品添加剂、食品接触材料用物质、药物的遗传毒性评价均将 TK 基因突变试验作为推荐和备选的遗传毒性试验之一, 而且 CORESTA 烟草烟气体外测试工作组也在进行卷烟烟气 TK 基因突变试验的研究工作, 因此亟待建立适用于卷烟烟气的 TK 基因突变试验。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 受试物及主要试剂 3R4F 参比卷烟, 肯塔基大学; 马血清 购自 gibeo 公司, 批号 1856573;

基金项目: 郑州烟草研究院院长科技发展基金(322016CA0240)

第一作者简介: 尚平平, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向: 烟草制品风险评估

通信作者: 华辰凤, 硕士, Email: niya_lucky@126.com

RPMI 1640 培养基 购自 gibco 公司 ,批号 1924300; 胸腺嘧啶核苷 购自 sigma 批号 WXBC1817V; 氨甲碟呤 购自 sigma 批号 SLBK2839V; 次黄嘌呤 购自 sigma 批号 SLBD4750V; 甘氨酸 购自 sigma 批号 BCBM6203V; SD 大鼠肝 S9 购自武汉普莱特生物医药技术有限公司 批号 S10013; 三氟胸苷 购自 sigma 批号 BCBL 1812V; DMSO 上海翊圣生物有限公司 批号 D0306; 环磷酰胺 购自 sigma 批号 068K1131。

1.1.2 细胞株及培养 L5178Y tk^{+/+}-3.7.2C 小鼠淋巴瘤细胞 ,由解放军疾病预防控制中心毒理学评价研究中心赠送。细胞在 5% 的 CO₂、37 °C、饱和湿度条件下常规悬浮培养 培养密度在 1 × 10⁶ 个/mL ,采用含 10% 马血清和适量抗菌素的 RPMI 1640 培养基 96 孔板表达培养时采用含 20% 马血清的培养基。

1.2 方法 方法和结果判定参考 GB 15193.20 - 2014^[11] 受试物进行 2 次平行试验。

1.2.1 自发突变清除 为避免细胞的自发突变对实验结果产生影响 ,在正式实验前 ,进行自发突变清除工作。用含 3 g/mL 胸腺嘧啶核苷 ,5 g/mL 次黄嘌呤 ,0.1 g/mL 氨甲碟呤和 7.5 g/mL 甘氨酸的 THMG 培养基处理细胞 24 h 800 r/min 离心 5 min、洗涤后在不含氨甲碟呤的 THG 培养基中培养 2 d。

1.2.2 受试物处理 采用 ISO 4387 抽吸方法(抽吸容量 35 mL ,每口抽吸 2 s ,每 30 s 抽吸一口)于转盘吸烟机抽吸 3R4F 参比卷烟 20 支 ,抽吸结束后 ,用 DMSO 以 10 mg/mL 萃取滤片上的卷烟烟气冷凝物(Cigarette Smoke Condensate ,CSC) , - 80 °C 保存待用。

1.2.3 染毒 根据细胞毒性的相对存活率确定的试验剂量分别为 20、40、80、100、150 μg/mL ,取生长良好的 L5178Y 细胞 ,调整细胞密度为 5 × 10⁵ /mL ,按 1% 体积加入受试物 CSC(阳性对照组加入环磷酰胺 ,阴性对照组加入 DMSO) 37 °C 震荡处理 3 h。800 r/min ,离心 5 min 后 ,弃上清液 ,用不含血清的培养基洗涤细胞 2 遍 ,重悬细胞于含 10% 马血清的培养基中。

1.2.4 表达培养

(1) 第 0d 平板接种效率(PE₀)的测定:按 8 个细胞/mL 接种 96 孔板(每孔加 0.2 mL ,即平均 1.6 个细胞/孔) ,每个剂量作 2 块板 37 °C 5% CO₂ ,饱和湿度条件下培养 12 d ,计数每块平板有集落生长的孔数 ,计算 PE₀。

$$PE_0 = \frac{-\ln(EW/TW)}{1.6} \times 100.00\% \text{ 式中 EW 为}$$

无集落生长的孔数 ,TW 为总孔数 ,1.6 为每孔接种细胞数。

(2) 表达培养 2d 平板接种效率(PE₂)的测定:

将细胞悬液调整细胞密度为 2 × 10⁵ /mL ,48 h 表达培养(每天计数细胞密度并保持密度在 10⁶ /mL 以下)后 ,计算相对悬浮生长(RSG)和相对总生长(RTG)。

$$RSG = \frac{\text{剂量组表达期间细胞增殖倍数}}{\text{溶剂对照组表达期间细胞增殖倍数}} \times$$

100.00%

RTG = RSG × RS₂ × 100.00% ,式中 RS₂ 为第 2 d 的相对存活率。

然后按照 PE₀ 的方法接种 96 孔板 ,培养 12 d 后 ,计算 PE₂ ,方法同 PE₀。

1.2.5 TFT 抗性突变频率(TMF)测定 48 h 表达培养结束后 ,取适量细胞悬液 ,调整细胞密度为 1 × 10⁴ /mL ,加入终浓度为 3 g/mL 的三氟胸苷 ,混匀 ,接种 96 孔板(每孔加 0.2 mL) ,每个剂量作 2 块板培养 12 d 后 ,计数有突变集落生长的孔数。

$$TMF(\times 10^{-6}) = \frac{-\ln(EW/TW)/N}{PE_2}$$

式中 EW 为无集落生长的孔数 ,TW 为总孔数 ,N 为每孔接种细胞数(2 000) ,PE₂ 为表达培养 2d 的平板效率。

1.3 统计学分析 TMF 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示 ,采用 SPSS 17.0 统计软件包进行方差分析 ,检验水准 α = 0.05。

2 结果

3R4F 参比卷烟的卷烟烟气 TK 基因突变试验(表 1) ,阳性对照 CP 的 TMF 显著高于溶剂对照组(P < 0.01)(表 1)。随受试物剂量增加 ,RSG 和 RTG 呈下降趋势 ,表现出良好的剂量 - 反应关系。CSC 处理组 80 μg/mL 的 TMF 是溶剂对照组 3 倍以上 ,并且随着 CSC 剂量的增加 ,TMF 呈上升趋势 ,呈现明显的剂量 - 反应关系。在试验条件下 ,卷烟烟气对 L5158Y 的 TK 基因有致突变作用。

表 1 3R4F 参比卷烟的 TK 致突变频率测定结果

受试物	剂量(μg/mL)	RSG(%)	RTG(%)	TMF(×10 ⁻⁶)
DMSO	15	100.00	100.00	16.1 ± 2.1
CSC	20	81.50	72.90	32.6 ± 10.6
	40	55.70	55.70	36.8 ± 13.9
	80	36.30	32.50	54.2 ± 26.2
	100	30.00	24.70	53.1 ± 19.9
	150	15.90	14.20	49.4 ± 1.6
CP	3	82.10	83.60	83.6 ± 8.4

3 讨论

卷烟烟气是含有 100 多种有害成分的复杂气溶胶,有研究指出,我国成年男性吸烟导致的死亡在 2030 年可能达到 200 万人^[12],近年来,国内外对卷烟烟气的危害评价开展了大量的研究工作^[13-45]。烟草科学研究合作中心(Cooperation Centre for Scientific Research Relative to Tobacco, CORESTA)、部分跨国烟草公司和中国烟草总公司根据目前国际认可的体外遗传毒性试验,结合卷烟烟气的性质和独特特性加以修改,确定了相关的主要程序。目前,推荐用于卷烟烟气的遗传毒性试验包括鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验(Ames 试验)和体外微核试验。

与食品和药物的遗传毒性评价程序仍有一定的差距,同时,这些遗传毒性试验涵盖的遗传学终点较少,不足以全面评价卷烟烟气的遗传毒性。由于各个遗传毒性试验所检测的毒性终点不同,在进行食品添加剂、食品接触材料用物质、药物的安全性评价时,均是采用多种遗传毒性试验的组合。TK 基因突变试验是 Clive 和 Spector 于 1975 年创建的方法,利用突变细胞对嘧啶类似物表现出抗性而存活的特点对 TK-突变体进行选择,从而检测化学物或其他环境因素的诱变性^[16],是具有检出灵敏度较高、检测谱较广,且简便易行的体外短期致突变试验方法^[17]。自此,广泛应用于化合物的遗传毒性评价^[18]。随着 TK 基因突变试验实验技术的不断完善,欧盟、美国都将其作为食品添加剂和食品接触材料用物质必选的遗传毒性试验之一。此后,中国也开展了 TK 基因突变试验方法的推广,在修订和新发布的保健食品、药品、化妆品等安全性毒理学评价程序中,也已将其列为必选或备选的遗传毒性试验之一。

鉴于此, CORESTA 烟草烟气体外毒性测试工作组也多次提出了扩展原有三项体外毒性试验的计划,并于 2017 年将 TK 基因突变试验作为首要扩展试验。课题组作为 CORESTA 烟草烟气体外毒性测试工作组的成员,对卷烟烟气进行了 TK 基因突变试验的研究,结果发现卷烟烟气对 L5178Y 细胞的 TK 基因有致突变作用。卷烟烟气的 TK 基因突变试验也为卷烟遗传毒性研究的进一步发展奠定更加坚实的基础。

参考文献

[1] World Health Organization. WHO global report on trends in prevalence of tobacco smoking 2015 [R]. Switzerland: WHO

Press, 2015.

[2] US Food and Drug Administration. Harmful and Potentially Harmful Constituents in Tobacco Products and Tobacco Smoke; Established List [R]. New Hampshire: Federal Register 2012.

[3] Cooperation Centre for Scientific Research Relative to Tobacco. Neutral Red Uptake Assay Proficiency Study [R]. France: In Vitro Toxicity Testing of Tobacco Smoke Sub-Group Technical Report 2015.

[4] Cooperation Centre for Scientific Research Relative to Tobacco. Ames Assay Proficiency Study [R]. France: In Vitro Toxicity Testing of Tobacco Smoke Sub-Group Technical Report 2016.

[5] Cooperation Centre for Scientific Research Relative to Tobacco. In vitro Micronucleus Assay Proficiency Study [R]. France: In Vitro Toxicity Testing of Tobacco Smoke Sub-Group Technical Report 2016.

[6] Fowles J, Bates M. The Chemical Constituents in Cigarettes and Cigarette Smoke: Priorities for Harm Reduction [S]. National Drug Policy New Zealand 2000.

[7] Fowles J, Dybing E. Application of toxicological risk assessment principles to the chemical constituents of cigarette smoke [J]. Tobacco Control 2003(12):424-430.

[8] Pankow JF, Watanabe KH, Toocalino PL, et al. Calculated cancer risks for conventional and "potentially reduced exposure product" cigarettes [J]. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, 2007, 16(3):584-592.

[9] 陈卫红,周芸. 关注多环芳烃导致的呼吸系统健康损害 [J]. 公共卫生与预防医学 2017 28(5):1-5.

[10] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 15193.1-2014. 食品安全国家标准 食品安全性毒理学评价程序 [S]. 北京: 中国标准出版社 2014.

[11] GB 15193.20-2014. 食品安全国家标准: 体外哺乳类细胞 TK 基因突变试验 [S]. 北京: 中国标准出版社 2014.

[12] 骆景光, 韩凌, 杨明, 等. 吸烟后即刻呼出气 CO 检测联合强化 5A 治疗对 ACS 患者烟草戒断效果 [J]. 公共卫生与预防医学 2016 27(1):47-49.

[13] 李翔, 尚平平, 聂聪, 等. 全烟气暴露与烟气冷凝物染毒方式的卷烟烟气体外微核测试结果比较 [J]. 烟草科技, 2013(10):31-34.

[14] 尚平平, 李翔, 彭斌, 等. 部分国内外卷烟全烟气暴露的体外致突变作用 [J]. 烟草科技 2013(5):46-50.

[15] JIANPING XIE, Marano KM, Wilson CL, et al. A probabilistic risk assessment approach used to prioritize chemical constituents in mainstream smoke of cigarettes sold in China [J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2012 62(2):355-362.

[16] Clive D, Spector JF. Laboratory procedure for assessing specific locus mutations at the TK locus in cultured L5178Y mouse lymphoma cells [J]. Mutation Research, 1975(31):17-29.

[17] Hoizer J, Scalzi J, Sawyer J, et al. Localization of the mouse thymidine kinase gene to the distal portion of chromosome 1 [J]. Genomics, 1999(10):827-830.

[18] 卢叶丹, 霍娇, 张立实, 等. 丙烯酸-2-乙基己酯的 3 项致突变试验研究 [J]. 毒理学杂志 2016 30(1):62-65.

(收稿日期:2018-08-20)

(本文编辑:易秋莎)