

# Mutagenicity of cigarette samples with different tar releases in the *TK* gene mutation assay

SHANG Pingping, HUA Chenfeng,  
XIE Fuwei, LI Xiang\*  
(Zhengzhou Tobacco Research Institute, China Tobacco Corporation,  
Zhengzhou 450001, Henan, China)

# 不同焦油释放量 卷烟诱导 *TK* 基因 突变能力的 比较研究

尚平平, 华辰凤, 谢复炜, 李翔\*  
(中国烟草总公司郑州烟草研究院, 河南 郑州  
450001)

**【摘要】**目的: 研究卷烟烟气冷凝物对 *TK* 基因的致突变作用, 并比较不同焦油释放量卷烟样品的 *TK* 基因致突变能力。方法: 以盒标焦油为 5、8 和 11 mg 的市售卷烟(分别为 1、2 和 3 号样品)烟气冷凝物为受试物, 分别以 20、40、60、80、100、150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的卷烟烟气冷凝物对小鼠淋巴瘤细胞 L5178Y tk<sup>+/+</sup>3.7.2C 进行染毒处理, 以 15  $\mu\text{L}/\text{mL}$  的二甲基亚砜为溶剂对照, 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的环磷酰胺为阳性对照, 处理 3 h, 细胞洗涤重新接种培养 2 d, 加入三氟胸苷继续培养 12 d 后, 计数有突变集落生长的孔数, 计算各样品剂量组的三氟胸苷抗性突变频率, 并比较不同样品的致突变强度。结果: 1 号样品在剂量为 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时、2 号样品和 3 号样品在剂量为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 小鼠淋巴瘤细胞三氟胸苷抗性突变频率是溶剂对照组 3 倍以上, 并且随着卷烟烟气冷凝物剂量的增加, 三氟胸苷抗性突变频率呈上升趋势, 呈现明显的剂量-反应关系, 3 种卷烟样品的 *TK* 基因致突变强度分别为 0.37、0.36 和 0.38。结论: 3 种卷烟样品的烟气冷凝物均对小鼠淋巴瘤细胞表现出 *TK* 基因致突变作用, 比较 3 种样品的致突变强度发现, 卷烟烟气的致突变强度与焦油释放量无明显相关关系。

**【关键词】** 卷烟烟气冷凝物; 焦油; *TK* 基因突变试验; 致突变强度;

中图分类号: R994.6 文献标志码: A 文章编号: 1004-616X(2019)01-0049-04 doi: 10.3969/j.issn.1004-616x.2019.01.009

**【ABSTRACT】** **OBJECTIVE:** To study the mutagenicity of cigarette smoke condensates (CSC) in the *TK* gene mutation assay and to compare the mutagenicity of *TK* gene in cigarette samples with different tar release. **METHODS:** 3 commercial cigarettes of different tar releases, 5 mg (1<sup>#</sup>), 8 mg (2<sup>#</sup>) and 11 mg (3<sup>#</sup>), were tested. The mouse lymphoma cell line L5178Y tk<sup>+/+</sup>3.7.2C was treated with 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CSC from the 3 cigarette samples. 15  $\mu\text{L}/\text{mL}$  DMSO treatment was used as the solvent control, and 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  cyclophosphamide treatment was used as the positive control. The test protocol includes the 4-h treatment, 2-day expression and 12-day cloning phases. Then the mutation frequency of trifluorothymidine resistance (TMF) of each dose group was calculated. Finally, the mutagenic potency of different cigarette samples was compared. **RESULTS:** At the dose of 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of 1<sup>#</sup>, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of 2<sup>#</sup> and 3<sup>#</sup>, the TMF were more than 3 times higher than that in the solvent control group. In addition, the TMF increased with increase of the CSC doses. The mutagenic potency of the CSCs for 3 cigarette samples were 0.37, 0.36 and 0.38, respectively. **CONCLUSION:** All CSCs induced dose-dependent increases of mutagenicity in the mouse lymphoma assay. Comparing the mutagenicity of the 3 cigarette samples, there was no significant correlation between *TK* gene mutagenic potency and tar release in cigarette smoke.

**【KEY WORDS】** cigarette smoke condensate; tar; *TK* gene mutation test; mutagenic potency

卷烟烟气是含有 6 000 多种化学成分的复杂气溶胶, 其中有 69 种表现出遗传毒性<sup>[1]</sup>, 目前, 卷烟烟气的危害评价主要以体外毒性试验为主。体外毒性试验具有周期短, 灵敏度高等特点, 是反映卷烟风险的有

收稿日期: 2018-11-07; 修订日期: 2018-12-13  
基金项目: 郑州烟草研究院院长科技发展基金(322016CA0240)  
作者信息: 尚平平, E-mail: shangpingpingam@126.com。\*通信作者, 李翔,  
E-mail: lixiang79@sina.com

力手段,在卷烟烟气的危害评价中具有重要作用<sup>[2]</sup>。在进行卷烟烟气危害评价时,国内外多采用 Ames 试验和体外微核试验来评价其遗传毒性<sup>[3]</sup>。近年来,TK 基因突变试验因具有检测谱较广、检出灵敏度较高、简便易行等特点,得到了较快发展和不断完善。欧盟、美国和中国在进行食品添加剂、食品接触材料用物质、药品、化妆品等安全性毒理学评价时,也将其作为必选或备选的遗传毒性试验方法之一。

吸烟与健康一直是国内外关注的热点,随着世界卫生组织(World Health Organization, WHO)发布的《烟草控制框架公约》逐渐实施生效,中国烟草在卷烟降焦减害方面开展了大量研究工作<sup>[4]</sup>,从烟叶原料、卷烟配方、辅助材料和加工工艺等方面降低卷烟烟气的危害,研制了低焦油卷烟、动植物提取物添加卷烟<sup>[5]</sup>、减害功能材料添加卷烟等<sup>[6]</sup>。而如何比较不同卷烟的遗传毒性强度的差异,国内外均进行了探索性研究<sup>[7-9]</sup>。

我们将不同焦油释放量的卷烟,采用标准抽吸条件下收集的卷烟烟气冷凝物(cigarette smoke condensate, CSC)对 L5178Y tk<sup>+</sup>3.7.2C 小鼠淋巴瘤细胞进行染毒,计算各卷烟样品的三氟胸苷抗突变频率(trifluorothymidine resistance mutation frequency, TMF),利用 SPSS 17.0 对数据进行线性拟合,初步比较不同卷烟样品的 TK 基因致突变能力。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 受试物及主要试剂 盒标焦油分别为 5、8 和 11 mg 的 1、2 和 3 号市售卷烟,马血清(批号 1856573)和 RPMI 1640 培养基(批号 1924300)均购自 Gibco 公司,胸腺嘧啶核苷(批号 WXBC1817V)、氨甲碟呤(SLBK2839V)、次黄嘌呤(批号 SLBD4750V)、甘氨酸(批号 BCBM6203V)、三氟胸苷(批号 BCBL1812V)、环磷酰胺(批号 068K1131)均购自 Sigma 公司,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);二甲基亚砜购自上海翊圣生物有限公司(批号 D0306)。

1.1.2 细胞株 L5178Y tk<sup>+</sup>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。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 L5178Y tk<sup>+</sup>3.7.2C 小鼠淋巴瘤细胞在 37 ℃、CO<sub>2</sub> 体积分数为 5%、饱和湿度条件下常规悬浮培养,细胞浓度为 1×10<sup>6</sup>/mL,采用含 10% 马血清和适量抗菌素的 RPMI 1640 培养基,在 96 孔板上表达

培养时采用含 20% 马血清的 RPMI 1640 培养基。

1.2.2 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。

1.2.3 受试物处理 卷烟样品在(22±2) ℃、相对湿度(60±3)%的环境下平衡 48 h 后,并在此环境下采用 ISO 4387 抽吸方法(抽吸容量 35 mL,每次抽吸 2 s,每 60 s 抽吸一次)于转盘吸烟机抽吸 3 个卷烟样品各 20 支,抽吸结束后,用 DMSO 以 10 mg/mL 萃取滤片上的 CSC, -80 ℃ 保存待用。

1.2.4 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,调整细胞浓度为 5×10<sup>5</sup>/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 ℃ 振荡处理 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。

1.2.5 第 0 天平板接种效率的测定 按每毫升 8 个细胞,接种 96 孔板(每孔加 0.2 mL,即平均每孔 1.6 个细胞),每个剂量作 2 块板,37 ℃、CO<sub>2</sub> 体积分数为 5%、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,计算第 0 天平板接种效率(PE<sub>0</sub>)。

$$PE_0 = \frac{-\ln(EW/TW)}{1.6} \times 100\%$$

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。

1.2.6 表达培养 2 d 平板接种效率的测定 将细胞悬液调整细胞浓度为 2×10<sup>5</sup>/mL,48 h 表达培养(每天计数细胞浓度并保持浓度在 1×10<sup>6</sup>/mL 以下)后,计算相对悬浮生长(RSG)和相对总生长(RTG)。

$$RSG = \frac{\text{剂量组表达期间细胞增殖倍数}}{\text{溶剂对照组表达期间细胞增殖倍数}} \times 100\%$$

$$RTG = RSG \times RS_2 \times 100\%$$

式中 RS<sub>2</sub> 为第 2 天的相对存活率。

然后按照 PE<sub>0</sub> 的方法接种 96 孔板,培养 12 d 后,计算 PE<sub>2</sub>,方法同 PE<sub>0</sub>。

1.2.7 TFT 抗性突变频率测定 48 h 表达培养结束后,取适量细胞悬液,调整细胞浓度为 1×10<sup>4</sup>/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)， $PE_2$ 为表达培养2 d的平板效率。

**1.2.8 致突变能力比较** 当受试物有致突变阳性作用时，将卷烟烟气各剂量的TMF绘制剂量-反应关系曲线，直线部分的斜率即为致突变强度。直线部分的选择依据SPSS 17.0统计分析，首先对TMF数据进行一元二次(一元二次方程为 $\hat{y} = a_1x^2 + b_1x + c_1$ )线性拟合。二次项系数 $a_1$ 用于评价模型的显著性，当 $a_1$ 有明显显著性时，去掉高剂量数据，剩余数据再进行一元二次线性拟合，直至 $a_1$ 无显著性。对剩余数据进行一元直线( $\hat{y} = b_2x + c_2$ )回归模拟，其中， $b_2$ 为致突变强度<sup>[8]</sup>。

## 2 结果

3种卷烟样品信息及烟气冷凝物的常规化学分析数据见表1，实测的焦油含量和烟碱含量与盒标一致或低于盒标。

表1 3种卷烟样品的信息及烟气冷凝物的常规化学分析数据

样品	盒标含量/(mg/支)			实测含量/(mg/支)			次数/支
	焦油	烟碱	一氧化碳	烟碱	焦油	一氧化碳	
1号	5.0	0.4	6.0	0.4	4.7	6.1	6.3
2号	8.0	0.6	9.0	0.6	7.2	8.9	5.9
3号	11.0	1.1	12.0	1.0	11.0	12.3	6.7

3种卷烟样品的烟气冷凝物TK基因突变试验结果见表2，阳性对照CP的TMF显著高于溶剂对照组( $P < 0.01$ )。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。1号样品在剂量为150  $\mu\text{g/mL}$ 、2号样品和3号样品在剂量为100  $\mu\text{g/mL}$ 时，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。在本试验条件下，CSC对L5158Y细胞的TK基因有致突变作用。3种卷烟样品的TK基因致突变强度分别为0.37、0.36和0.38，表明卷烟烟气的TK基因致突变能力与焦油释放量无明显相关关系。

## 3 讨论

卷烟烟气含有多种遗传毒性有害成分，如4-(N-甲基-N-亚硝氨基)-1-(3-吡啶基)-1-丁酮、苯并芘等，目前国内外从基因突变<sup>[10-11]</sup>、染色体和染色体组畸变<sup>[12-14]</sup>、DNA损伤<sup>[15-16]</sup>等方面来评价卷烟烟气的遗传毒性。国际烟草科学研究合作中心烟草烟气体外毒性测试工作组推荐采用Ames试验和体外微核试验来评价卷烟烟气的危害，但仅采用这两种遗传毒性试验是

表2 卷烟样品烟气冷凝物的TK致突变频率测定结果

样品	受试物	剂量	RSG /%	RTG /%	TMF /( $\times 10^{-6}$ )	致突 变强度
1号	CSC	DMSO 15 $\mu\text{L/mL}$	100	100	11.60	0.37
		20 $\mu\text{g/mL}$	96.24	86.75	22.16	
		40 $\mu\text{g/mL}$	93.75	80.94	23.07	
		60 $\mu\text{g/mL}$	91.73	72.23	28.61	
		80 $\mu\text{g/mL}$	86.67	63.32	28.61	
		100 $\mu\text{g/mL}$	86.65	55.08	48.24*	
		150 $\mu\text{g/mL}$	83.58	43.61	70.75*	
CP	3 $\mu\text{g/mL}$	42.55	28.26	68.64*		
2号	CSC	DMSO 15 $\mu\text{L/mL}$	100	100	12.67	0.36
		20 $\mu\text{g/mL}$	101.08	98.76	30.55	
		40 $\mu\text{g/mL}$	99.06	70.32	32.09	
		60 $\mu\text{g/mL}$	77.96	47.61	32.09	
		80 $\mu\text{g/mL}$	73.28	44.75	32.09	
		100 $\mu\text{g/mL}$	75.57	38.07	58.16*	
		150 $\mu\text{g/mL}$	67.36	25.71	71.91*	
CP	3 $\mu\text{g/mL}$	24.15	10.69	68.64*		
3号	CSC	DMSO 15 $\mu\text{L/mL}$	100	100	13.43	0.38
		20 $\mu\text{g/mL}$	101.90	98.81	18.03	
		40 $\mu\text{g/mL}$	92.58	95.38	27.54	
		60 $\mu\text{g/mL}$	97.78	87.91	34.42	
		80 $\mu\text{g/mL}$	97.55	79.82	38.15	
		100 $\mu\text{g/mL}$	96.66	69.32	52.76*	
		150 $\mu\text{g/mL}$	94.79	53.62	69.20*	
CP	3 $\mu\text{g/mL}$	49.12	39.69	68.64*		

\*TMF是DMSO溶剂对照的3倍以上。

不全面的。

国际上至今已发展了使用不同生物材料的多种类型体内、体外遗传毒性测试试验，经济合作与发展组织有指导方针的遗传毒性试验共15项。这些试验各具优缺点，但尚未发现单一的一种试验在检测终点覆盖范围、灵敏度和特异性等方面均能达到令人满意的程度。因此，国内外均一致认为只有使用一组试验方法才能对受试物的遗传毒性作出较为可靠评价。与其他常用的短期致突变试验相比，TK基因突变试验检测的遗传学终点非常丰富，可检出的遗传毒性包括点突变、缺失、置换、基因增殖、杂合等多种遗传学损伤，这是Ames试验和体外微核试验无法比拟的。同时该试验具有高灵敏度和简便易行等特点，也是欧盟、美国和中国在药物、食品安全性评价时的必选或备选遗传毒性试验方法。

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<sup>[17]</sup>。卷烟烟气在多种遗传毒性试验中表现出阳性作用<sup>[2]</sup>，TK基因突变试验发展的完善，使得国际上开始采用TK基因突变试验来检测卷烟烟气的致突变性，美国FDA曾于2011对1种参比卷烟和10种市售卷烟进行小鼠淋巴瘤细胞的TK基因致





突变试验, 结果发现, 11种卷烟的烟气冷凝物均表现出致突变作用, 同时发现致突变强度与焦油释放量无相关关系<sup>[8]</sup>。本研究也发现焦油释放量的增加, 并未直接导致卷烟烟气致突变能力的增加, 这在流行病学的研究中得到了支持, 这些研究表明, 抽吸中焦油(14.5 mg)、低焦油(6.5~14.5 mg)和超低焦油(<6.5 mg)<sup>[18-19]</sup>吸烟者的致肺癌物质的暴露和患肺癌风险无明显差别, 表明卷烟烟气的遗传毒性并不单纯依赖于焦油量影响。事实上, 卷烟烟气含有100多种有害成分, 而焦油中的有害成分可能因烟草特性、卷烟的物理及化学特征及吸烟行为而异(即吸烟者的抽吸次数、抽吸体积及抽吸持续时间等)<sup>[20]</sup>。

总之, 本研究表明, 小鼠淋巴瘤细胞TK基因突变试验可以评估卷烟烟气的遗传毒性, 同时, 卷烟烟气对TK基因的致突变能力与焦油释放量无明显关系。

## 参考文献

- [1] HOFFMANN D, HOFFMANN I. The changing cigarette: chemical studies and bioassays[M]. New York: Oxford University Press, 2001: 159.
- [2] 华辰凤, 谢复炜, 尚平平, 等. 体外遗传毒性测试方法在烟草制品毒理学评价中的应用[J]. 癌变·畸变·突变, 2017, 29(3): 241-244.
- [3] 李翔, 华辰凤, 尚平平, 等. 遗传毒性测试方法在烟草制品体外毒理学评价中的应用[C]. 杭州: 第二届毒性测试替代方法与转化毒理学(国际)学术研讨会暨有害结局路径(AOP)与风险评估培训会议, 2016: 164-165.
- [4] 谢剑平. 形势与未来: 烟草科技发展展望[J]. 中国烟草学报, 2017, 23(3): 1-6.
- [5] 米娜. 中草药金圣香降低卷烟危害及机理研究[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2007.
- [6] 孙学辉, 杨松, 孙培健, 等. 基于卷烟降焦减害的滤嘴添加剂研究与应用进展[J]. 烟草科技, 2017, 50(2): 86-96.
- [7] 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, 49(5): 45-49.
- [8] 尚平平, 李翔, 聂聪, 等. 卷烟全烟气的Ames试验[J]. 癌变·畸变·突变, 2013, 25(5): 227-231.
- [9] GUO X, VERKLER T L, CHEN Y, et al. Mutagenicity of 11 cigarette smoke condensates in two versions of the mouse lymphoma assay[J]. Mutagenesis, 2011, 26(2): 273.
- [10] CROOKS I, DILLON D M, SCOTT J K, et al. The effect of long term storage on tobacco smoke particulate matter in vitro, genotoxicity and cytotoxicity assays[J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2013, 65(2): 196-200.
- [11] BREHENY D, CUNNINGHAM F, KILFORD J, et al. Application of a modified gaseous exposure system to the in vitro, toxicological assessment of tobacco smoke toxicants[J]. Environ Mol Mutagen, 2014, 55(8): 662-672.
- [12] GARCIA-CANTON C, ERRINGTON G, ANADON A, et al. Characterisation of an aerosol exposure system to evaluate the genotoxicity of whole mainstream cigarette smoke using the in vitro,  $\gamma$ H2AX assay by high content screening[J]. BMC Pharmacol Toxicol, 2014, 15(1): 41-41.
- [13] GARCIA-CANTON C, ERRINGTON G, MEREDITH C. Assessment of the in vitro gamma-H2AX assay by High Content Screening (HCS) as a novel genotoxicity test: application for the evaluation of single toxicants and mixtures[C]. United Kingdom: Environmental Mutagen Society Meeting, 2014, 768.
- [14] GARCIA-CANTON C, ANADON A, MEREDITH C. Genotoxicity evaluation of individual cigarette smoke toxicants using the in vitro,  $\gamma$ H2AX assay by high content screening[J]. Toxicol Lett, 2013, 223(1): 81-87.
- [15] LOU J, ZHOU G, CHU G, et al. Studying the cytogenotoxic effects of 12 cigarette smoke condensates on human lymphoblastoid cell line in vitro[J]. Mut Res, 2010, 696(1): 48-54.
- [16] 陆叶珍. 卷烟烟气冷凝物加S9与不加S9细胞—遗传毒性体外试验的比较研究[D]. 杭州: 浙江大学医学院, 2010.
- [17] CLIVE D, SPECTOR J F. Laboratory procedure for assessing specific locus mutations at the TK locus in cultured L5178Y mouse lymphoma cells[J]. Mut Res, 1975, 31(1): 17-29.
- [18] HARRIS J E, THUN M J, MONDUL A M, et al. Cigarette tar yields in relation to mortality from lung cancer in the cancer prevention study II prospective cohort, 1982-8[J]. Brit Med J, 2004, 328(7431): 72-79.
- [19] SS HECHT, SE MURPHY, SG CARMELLA, et al. Similar uptake of lung carcinogens by smokers of regular, light, and ultralight cigarettes[J]. Cancer Epidem, Biomark Prevent, 2005, 14(3): 693-698.
- [20] BURNS D M. Cigarettes and cigarette smoking[J]. Clin Chest Med, 1991, 12(4): 631-642.