

卷烟工业

领导信箱
ldxx@tobacco.gov.cn


烟草论坛

留言板

电子邮件定制

短信互动

 国家烟草专卖局总机
010-63605000

 新闻投稿热线:
010-63606303
010-63605947
010-63605142

cx-out@tobacco.gov.cn

3种不同焦油卷烟烟气的细胞毒性比较

2008-01-31

有关卷烟烟气和烟气化学成分的细胞毒性国外已经采用多种方法研究了很长时间,其中中性红体外毒理学法是评价卷烟烟气冷凝物的潜在细胞毒性的最敏感、最为有效的一种方法^[1]。CORESTA 体外毒理学特别工作组推荐选用合适的哺乳动物细胞用此法评价卷烟烟气的细胞毒性。目前中性红法已被广泛用于评定和比较不同焦油量、不同类型卷烟烟气冷凝物的细胞毒性^[2-4],还被应用于某些卷烟烟气成分、加和未加添加剂卷烟烟气粒相物和气相物的细胞毒性评定^[5]。然而,国内有关卷烟烟气的细胞毒性研究则相对较少^[6-7]。因此,以 K2R4F 卷烟作参比,对3种国产不同(盒标)焦油的市售混合型卷烟烟气的细胞毒性进行了测定比较,以考察降低焦油、CO和自由基、亚硝胺和稠环芳烃对于卷烟烟气细胞毒性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

Series 2 CO₂ 培养箱(ThermoForma 公司); Class2 type A/B 3 超净工作台(NUAIRE 公司); Scientific 1122 水浴锅(VWR 公司);IMT-2 倒置显微镜(Olympus 公司);CR412 离心机(Jouan 公司);可读 96 孔培养板分光光度计(Bio-Tek Synergy HT 公司);Pipetaid 移液枪(Drummond 公司);Basic pH 计(Fisher Scientific 公司);Condor 吸烟机(KC 公司)。

95%乙醇(Gold Shield Chemical 公司);小牛血清(Invitrogen 公司);L-谷氨酰胺、Dulbecco Modification of Eagle's Medium(DMEM)、磷酸盐缓冲液(PBS)、含 Ca²⁺、Mg²⁺ 磷酸盐缓冲液(DPBS)

(Invitrogen 公司);青霉素/链霉素(Cellgro 公司);冰醋酸(Aldrich 公司);胰酶(1x) EDTA(MP Biomedicals 公司);中性红染液(Sigma 公司);0.4% 台盼兰(Cambrex Bio Science 公司);BALB/c 3T3 细胞株(Battelle 公司西北毒理学中心提供);盒标焦油 3、8 和 15 mg/支混合型卷烟样品(北京卷烟厂提供);K2R4F 参比卷烟(购自美国市场)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

将 3T3 细胞接种于含有 10% 新生牛血清和 2% 200 mmol/L 单位 L-谷氨酰胺的 DMEM 培养液中,在 5% CO₂ 细胞培养箱中 37 °C 下培养,当细胞繁殖到一定浓度时计数,并将细胞转移至 T-75 mL 培养瓶中,5.0 × 10⁵ 个/瓶,每组 12 瓶(6 瓶作空白对照,6 瓶作为烟气暴露平行样品),添加培养液至总体积 20 mL,于 CO₂ 细胞培养箱中 37 °C 下培养 24 h。

1.2.2 烟气暴露

取出盛有培养 24 h 3T3 细胞的 T-75 mL 培养瓶,固定于振荡器上。振荡器左右振荡一定的角度使培养瓶中的培养液左右流动从而露出培养瓶的底部使细胞与烟气进行接触暴露。调节振荡速率至 4 次/min,将振荡器置于烟气暴露培养器(图 1)中,培养器温度控制在 36.5 °C 左右。在 ISO 标准条件下抽吸卷烟,产生的主流烟气用洁净空气稀释,稀释后的烟气直接导入盛有细胞的培养瓶中。烟气暴露浓度以稀释后的烟气中总颗粒物(TPM)浓度为指标进行控制。暴露时间为 60 min,每个样品通过调节空气与烟气的稀释比例暴露 6 个浓度(15 ~ 150 μg/L),每个浓度 6 个平行样品,6 个对照样品。整个暴露过程根据监测的 TPM/L 值进行控制。暴露结束后,将培养瓶中的培养液换成新鲜的培养液,并置于 CO₂ 培养箱中 37 °C 下培养 24 h。对照为 6 个通入洁净空气并经过相同条件培养的平行样品。

1.2.3 中性红细胞毒性试验

烟气暴露过的细胞培养 24 h 后,吸出培养液,并用 37 °C 下预热的 D-PBS 漂洗 2 遍,加入 20 mL 中性红培养液(496 mL 培养液 + 4 mL 中性红染液,当日配制,并过滤除菌),放入 CO₂ 培养箱中 37 °C 下培养 2 h。然后,除去中性红培养液,加

中 37℃ 下培养 3 h。然后,除去中性红培养液,加入 10 mL 1% 甲醛固定液(10 mL 甲醛 + 990 mL 蒸馏水),室温下放置 2 min,吸去固定液,加入 20 mL 中性红溶解液(乙醇 + 水 + 冰醋酸,体积比 50:49:1),室温下放置 2 min,颠倒几次培养瓶,使中性红充分溶解,吸取 0.2 mL 溶解液,置于 96 孔培养板。以中性红溶解液作空白、空气暴露样品作对照,用可读 96 孔培养板分光光度计测定溶解液在 540 nm 处的吸光值。

2 结果与讨论

测试结果(图 2)显示,随着烟气暴露浓度的增大,4 种卷烟烟气引起细胞死亡数量都增大,也就是说,抽吸的烟支数量越多,危害越大。还可以看出,在低暴露浓度时 4 种卷烟烟气对于细胞生长的影响作用差别不大,而随着烟气暴露浓度的增加,15 mg/支焦油卷烟烟气造成细胞死亡数量上升幅度最大,8 mg/支焦油卷烟与 K2R4F 卷烟的比较相似,3 mg/支焦油卷烟的最低。4 种卷烟烟气的相对细胞毒性大小顺序为:15 mg/支焦油卷烟 >> K2R4F ≈ 8 mg/支焦油卷烟 > 3 mg/支焦油卷烟。

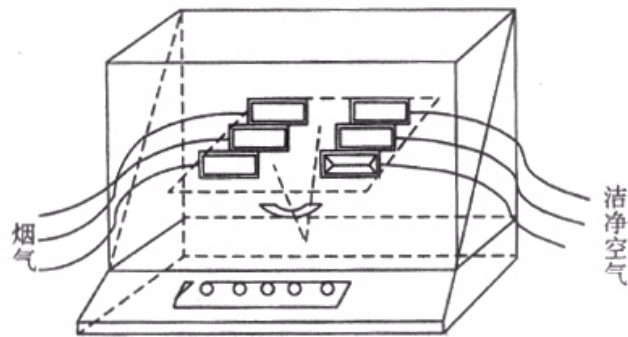


图 1 细胞烟气暴露系统示意图

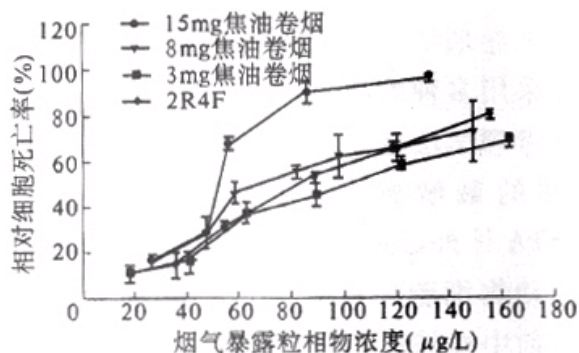
考虑到许多吸烟者吸食低焦油卷烟因烟碱摄入量不足不过瘾而吸食更多数量的卷烟来使体内达到一定的烟碱浓度,对烟碱浓度与中性红细胞毒性即相对细胞死亡率的关系进行了分析。结果见图 3。从图 3 看出,4 种卷烟暴露烟碱浓度与细胞毒性的关系与总粒相物和细胞毒性的关系基本一致,即都随着暴露浓度的增加细胞毒性增加。在相同的暴露烟碱浓度下 3 mg/支焦油卷烟烟气造成细胞死亡数量最低,8 mg/支焦油卷烟和 K2R4F 卷烟的比较相近,而 15 mg/支焦油卷烟的细胞毒性最强。说明如果吸食 3 mg/支超低焦油

卷烟达到和15 mg/支、8 mg/支焦油卷烟相同的烟碱量,3 mg/支卷烟烟气产生的毒害性要低于15 mg/支、8 mg/支焦油卷烟。

为了更为直观地考察4种卷烟烟气的细胞毒性大小,还采用4种卷烟烟气的 LC_{50} 值(半数致死浓度,即造成细胞数量减少50%的测试样品浓度)进行了比较。即用Calculusyn生物软件对各卷烟烟气暴露浓度和相对细胞死亡率进行统计分析,得各卷烟烟气暴露浓度和相对细胞死亡率的关系曲线图(图4),而相对细胞死亡率为50%时所对应的烟气暴露浓度就是各卷烟烟气的 LC_{50} 值。实际上各卷烟烟气TPM的 LC_{50} 值是该软件依据改良寇氏法公式^[8]计算的:

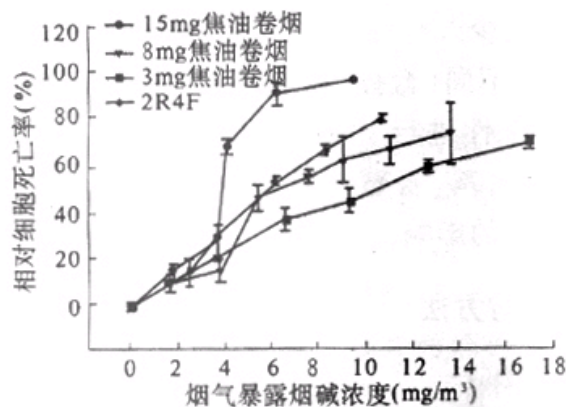
$$LC_{50} = \log^{-1} [Xm - i(\sum P - 0.5)]$$

式中: Xm ——最大剂量组剂量对数值; i ——相邻两组剂量高剂量与低剂量之比的对数(相邻两组对数剂量的差值); P ——各组细胞死亡率,用小数表示,如果死亡率为80%就写成0.80; $\sum P$ ——各组动物死亡率之总和。



相对细胞死亡率 = 1 - 相对细胞存活率,相对细胞存活率为烟气暴露细胞溶解液与对照样品溶解液的吸光值之比

图2 烟气暴露粒相物浓度与细胞毒性的关系



烟气暴露烟碱浓度 (mg/m³) = 烟气烟碱含量 (mg/支) · 暴露烟气浓度 (mg/m³) / TPM (mg/支)

图3 暴露烟碱浓度与细胞毒性的关系

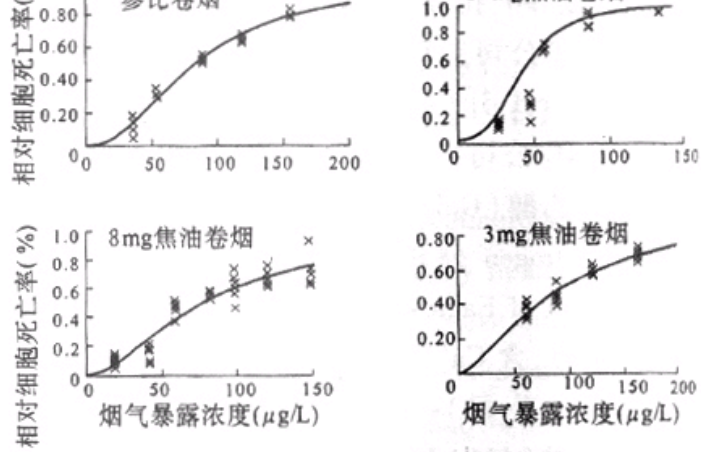


图4 4种卷烟烟气暴露粒相物浓度与细胞毒性的关系

结果显示,15 mg/支焦油卷烟 TPM 的 LC_{50} 最小,为 $49.2 \mu\text{g/L}$; 8 mg/支焦油卷烟和 K2R4F 卷烟的居中,分别为 78.0 和 $83.7 \mu\text{g/L}$; 3 mg/支焦油卷烟的最大,为 $95.1 \mu\text{g/L}$ 。说明 15 mg/支焦油卷烟 TPM 的毒性最大,8 mg/支焦油卷烟和 K2R4F 卷烟的次之,3 mg/支焦油卷烟的最小,与图 2 和图 3 的分析结果一致。同时,也与北京卷烟厂的测定结果(表 1)一致,即这些卷烟样品烟气的细胞毒性,随着其气相自由基、烟草特有 N-亚硝胺和稠环芳烃的降低而减小。

表 1 3种卷烟样品烟气中气相自由基、烟草特有 N-亚硝胺及稠环芳烃的含量^①

焦油 (mg/支)	NNN (ng/支)	NAT (ng/支)	NAB (ng/支)	NNK (ng/支)	苯并[a]蒽 (ng/支)	苯并[a]菲 (ng/支)	B(a)P (ng/支)	气相自由基 ($\times 10^{14}$ 自 由/支)
3	18.80	18.72	2.46	5.06	4.02	5.43	1.2	17.18 ± 2.19
8	136.10	121.00	3.61	58.54	12.65	21.37	7.16	50.40 ± 5.68
15	283.90	383.50	14.06	171.11	18.12	29.03	10.11	91.73 ± 4.31

注:①北京卷烟厂提供。

3 结论

本实验结果表明,卷烟烟气的细胞毒性随着其焦油和重要有害成分的降低而减小,或者说,卷烟减害降焦,可以降低其烟气的细胞毒性,降低吸烟对健康的危害。

(中国烟草总公司郑州烟草研究院

河南省烟草质量监督检测站)

卢斌斌 ryan meng

Lynne wi sse 焦延福

摘自《烟草科技》2007年第12期



主 管：国家烟草专卖局办公室

主 办：国家烟草专卖局信息中心

地 址：中国北京西城区月坛南街55号(100045)

备案序号：京ICP备05033420号

建议使用：800*600分辨率以上，IE5.0以上浏览器

未经许可，本网站包括图像、图标、文字在内的所有数据不得转载