

第一部分

总 论

绪 论

第一节 概 述

一、化学致癌物与人类癌症

流行病学和职业医学研究证实,化学致癌物 (Chemical carcinogen) 和其他环境因素是人类癌症 (human cancer) 的主要原因。特征性癌症的发生率不同国家是明显不同的。例如,乳腺癌、胃癌、结肠癌和肝癌发病率在各国之间可相差 5~10 倍。这种差异并非主要为遗传因素。移民患癌症的危险性,通常与其原来生长国家类似,但其后代患癌的发病率似乎与其移居国人群类似。由此可见,人类癌症主要与环境因素与生活习惯有关,并非决定于遗传因素,某些工业发达国家癌症死亡的主要原因,与他们职业和环境接触致癌物,以及不良的生活习惯,如吸烟,以及不健康的饮食习惯有关。

二、致癌研究的早期历史回顾

化学致癌的研究最早可追溯到英国内科医生 Hill J 和 Pott P 在 18 世纪 70 年代的直接临床观察。Hill J (1771 年) 发现,某些鼻癌患者都是使用鼻吸烟器者,因为他们暴露于鼻烟。Pott P (1775 年) 发现,扫烟囱的工人中许多人患阴囊癌,推测可能与其接触煤烟有关。但这些报道在当时影响很小。值得注意的是,德国外科医生 Rehn L (1895 年) 报道,染料行业工人膀胱癌发生率很高。

最早开始致癌实验研究是 Yamagawa 和 Ichikawa (1915 年),他们将煤焦油反复涂抹在家兔耳朵上,发现在涂抹处出现皮肤癌。在此之后, Tsutsui (1918 年) 报道,将煤焦油涂抹在皮肤上可诱发皮肤癌。随后英国学者在煤焦油沥青中分离出活性致癌成分,并鉴定

为多环芳烃 (PAHs) 中的苯并 (a) 芘 (BaP) (图 1-1) (Coak 等, 1933 年)。

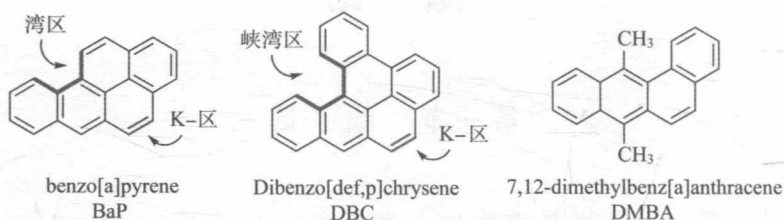


图 1-1 早期鉴定出的多环芳烃类致癌物

第二节 多环芳烃

一、结构-活性关系

发现某些 PAHs 具有致癌性后, 人们很快提出疑问, 什么是 PAHs 的活性结构? PAHs 的结构与活性关系 (structure-activity relationships) 被研究者证实, PAHs 是直接活化或经代谢活化, 表现其致癌性。同时还提出 PAHs 的靶细胞是什么。早期研究认为, PAHs 是直接致癌物。因为其尿中代谢产物 (酚、二氢二醇、苯醌及其结合物) 无活性, 或仅有轻度致癌性。

对 PAHs 的结构-活性关系进行了充分研究之后发现, PAHs 具有 4~7 个芳香环, 并具有“湾区” (图 1-1)。

DAHs 的典型代表 BaP 在其 4,5 键之间有“K 区”引入甲基, 活性通常加强。苯蒽 [benz (a) anthracene, BA] 不致癌, 若在 BA6-、7-、8-或 12-位置引入甲基, 生成 7,12-二甲基苯蒽 (DMBA, 图 1-1), 就成为最强的致癌物。在一系列 5 环 PAHs 中, BaP 是最强的致癌物, dibenz [a,h] anthracene, benzo [g] chrysene 和 benzp [c] chrysene 是中等致癌物, 其他异构体为弱肿瘤起动机。国际癌症

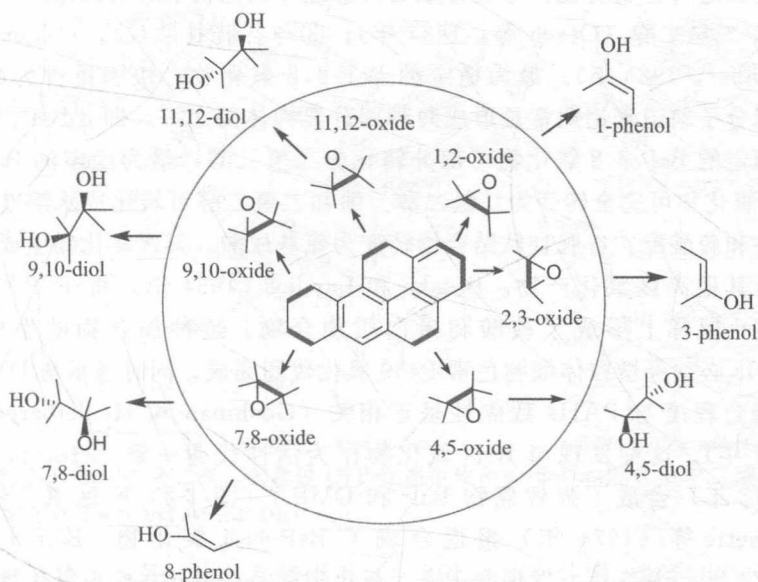


图 1-2 BaP 通过细胞色素 P-450 代谢过程及其代谢产物

研究所 (IARC) 将 BaP 归入 1 类, 人类致癌物。

在 6 环 PAHs 中, dibenz [def · p] chrysene (DBC) 是最强的致癌物。PAHs 分子中若被某些极性基团, 例如 COOH 、 NO_2 和 SO_3H 取代, 致癌性则大大降低。

二、代谢与代谢活化

Boyland (1950 年) 设想, 苯醌环氧化物 (arene oxides) 是 PAHs 的主要代谢产物, 同时生成酚、二氢二醇和其他氧化代谢产物, 这种观点受到广泛接受。他认为 K 区苯醌氧化物, 如 Bap-4, 5-氧化物 (图 1-1, 图 1-2) 是 PAHs 中最强的致癌物之一。由 Puelman (1995 年) 提出 “K 区” 概念之后, 将具有亲电性芳香键类似物称为 9, 10-菲 (9, 10 phenanthrine)。

BaP 通过内质网细胞色素 P450 代谢 (图 1-2)。苯醌氧化物经 3

条途径进行生物转化：①重排成酚；②经环氧化物水解酶催化水解为顺式-二氢二醇（Oesch 等，1984 年）；③与谷胱甘肽反应（Siger 和 Grunber，1983 年）。最为稳定的 BaP-2,3 氧化物，快速重排为酚。根据分子轨道理论通常是形成两种同分异构体酚之一，即 3-BaP。较为稳定的 BaP-7,8 氧化物可部分转化为二氢二醇；最为稳定的 BaP-4,5 氧化物可完全转变为二氢二醇。酚和二氢二醇可转化成水溶性结合物和硫酸酯。谷胱甘肽结合物转变为巯基尿酸。其次氧化物生成苯醌及其他高度氧化产物。Brooks 和 Lawley（1964 年）将³H-PAHs 涂在小鼠背上形成了核酸和蛋白质加合物。这种加合物的生成，PAHs 必须经微粒体细胞色素 P450 氧化代谢完成。同时显示与 DNA 的结合程度与 PAHs 致癌性呈正相关（Goshman 和 Heidelberger，1967 年）。这种发现与 K 区氧化物作为活性代谢一致。Harvey 等（1978 年）合成了强致癌物 BaP 和 DMBA（图 1-2）K 区氧化物。Dansette 等（1974 年）报道合成了 BaP-4,5 氧化物。Baird 等（1973 年，1975 年）发现 BaP-4,5 氧化物和 7-甲基-BaP-5,6-氧化物与 DNA 形成的加合物，经水解酶水解所得色谱图，与在体内形成的色谱图不同，因此，排除 K 区氧化物并非活性代谢产物。

（一）二醇环氧化途径（diol epoxide pathway）

BaP 代谢产物在小鼠细胞中形成的 DNA 加合物，较 BaP-4,5 氧化物形成 DNA 加合物有较强的色谱极性。Borgen 等（1973 年）将 BaP-7,8-二氢二醇与 DNA 在仓鼠肝微粒体中孵育，生成 DNA 结合物。Sims 等（1974 年）认为活性代谢产物是二醇环氧化物（图 1-3）。

据 Beland 和 Yagi 等（1975 年，1976 年）报道，已经合成立体的反式-和顺式-Bp 二醇环氧化物（anti-和 Syn-BPDE）（图 1-3）。Anti-BPDE 在分子表面有一个朝向环氧化氧的苄基羟基集团（benzylic OH group），而 Syn-BPDE 在相同分子面上也有这种集团。因此，这两种异构体就呈现出一对±对映体（图 1-3）。

根据 anti-和 syn-BPDE 推测在体内可能形成加合物结构。用 NMR 和质谱分析所得的 80%~85% 的主要加合物，分别为 anti-BPDE-dGua 和 anti-BPDE-dAde（图 1-3）。以及已发现的其他一些类似

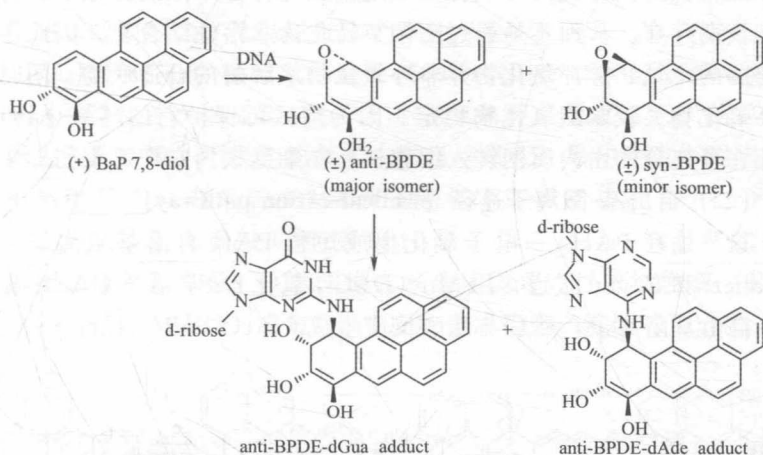


图 1-3 BaP-7,8-二氢二醇通过 CYP 代谢生成反式-BaP 和顺式-BaP 二醇环氧化物 (anti-and syn-BP DE)

的加合物。另外，BaP 在啮齿类、牛和人细胞中代谢也鉴定出上述类似 DNA 加合物。

Anti-和 syn-BPDE 在细菌和哺乳动物细胞中是强致突变物。在哺乳动物细胞，anti-BPDE 致突变活性明显强于 syn-BPDE；(+) -anti-BPDE 致突变活性明显强于 (-) -anti-BPDE。在小鼠皮肤涂抹致癌性实验中发现，(±) -anti-BPDE 的致肿瘤性明显强于 (±) -syn-BPDE。PAHs 中的某些致癌物，如 DMBA、DBC、5-甲基蒽、苯并[a] 蒽的二氢二醇-环氧化物已被合成。由此可见，二氢二醇-环氧化物代谢途径在 PAHs 的致癌中具有非常重要的意义。但不能排出 PAHs 其他代谢途径的作用。根据 Jerina 和 Daly (1977 年) 提出的“湾区理论”，依据分子轨道理论计算，具有湾区结构的二氢二醇-环氧化物，可预测为强致癌物。它们能很快从内质网转入细胞核。在细胞核内与 DNA 反应生成加合物。BaP 和 DMBA 若具有 K 区氧化物结构，也能与核酸反应生成加合物。苯醌氧化物快速转变为酚，或转化为二氢二醇，不会在体内与 DNA 反应形成加合物。另外一种设想是，具有湾区的二氢二醇环氧化物能对抗酶的解毒作用，因此可在体

内保留较长时间。同时环氧化区域定位在主体分子限制区域,也有利于其长期存在。从而不易通过酶调节转化为水溶性结合物。因此,具有湾区的二氢二醇环氧化物并非环氧化物水解酶合适底物。同时湾区环氧化物又较苯醌氧化物稳定。因为湾区可保护它的环氧化物环,保证它可充分的由内质网转入细胞核,在细胞核内它们可损伤 DNA。

(二) 自由基-阳离子途径 (radical-cation pathway)

这一途径 PAHs 一电子氧化生成短暂 PAH 自由基阳离子。据 Cavalieri 和 Rogan 报道,用 Mn (DAC) 氧化 BaP,在 HOAc 中提供 BaP 自由基阳离子,然后与醋酸反应生成 6-AcO-BaPc (图 1-4)。

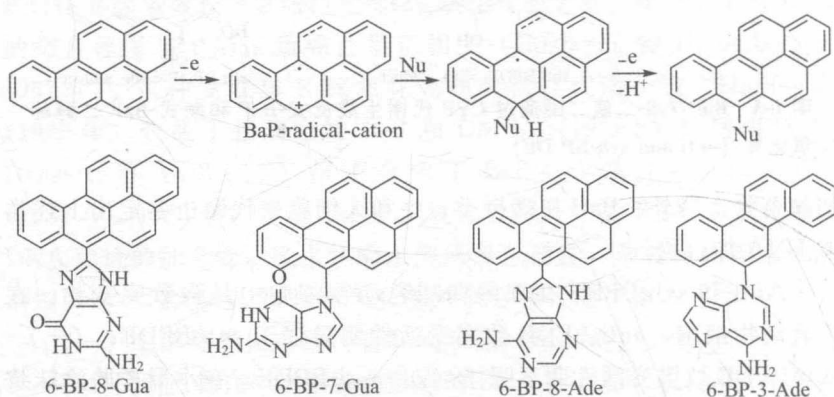


图 1-4 BaP 阳离子自由基与亲核物反应生成的几种脱嘌呤加合物

通过细胞色素 P450 过氧化酶可氧化 BaP 和 PAHs。同样也可提供同样的 PAH 自由基阳离子,进一步与 DNA 起反应生成脱嘌呤加合物。在体外大鼠肝细胞和小鼠皮肤都证实 BaP 可形成脱嘌呤加合物 (图 1-4)。DBC-电子氧化也可产生类似加合物。近年来已有效合成了 BaP 与鸟嘌呤和腺嘌呤加合物。

对于自由基阳离子途径仍有争议。高度活性自由基阳离子可在非常短的时间与细胞核和 DNA 反应,备受关注。值得怀疑的是,是否脱嘌呤水平能有效的超过本底水平,有人估计正常细胞中脱嘌呤速度

约有 10 000 次/ (细胞·天)。推测 PAH 自由基阳离子脱嘌呤起着重要作用。脱嘌呤速度足以超过这个本底水平。

(三) 氧化还原-活化苯醌途径 (redox-active quinone pathway)

这一途径首次被证实, BaP-7,8-二氢二醇, 通过二氢二醇脱氧酶转化为邻苯二酚。不稳定的邻苯二酚自动氧化, 最初生成半醌阴离子自由基和 H_2O_2 , 随后转变为苯醌和超氧阴离子自由基 (图 1-5)。第一步, 一电子氧化提供 O-半醌和 H_2O_2 ; 第二步, 一电子氧化提供 O-苯醌和超氧阴离子。O-苯醌进入氧化还原环, 促进活性氧 (ROS) 生成并消耗 NADPH, 或与 DNA 反应生成稳定的脱嘌呤加合物。

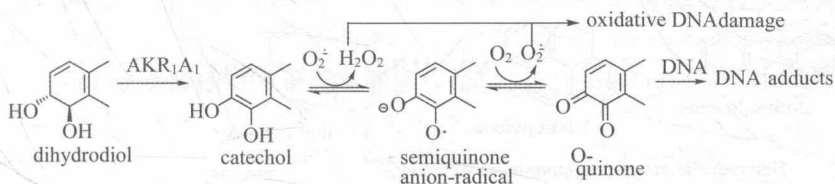


图 1-5 氧化-还原-活化苯醌途径

已知 ROS 可致 DNA 氧化性损伤, 形成 8-OXO-dGuo, 导致 G-T 转换。少量 PAH 苯醌通过这一途径可诱发大量 ROS 生成, 可致大量 DNA 损伤。据 Park 等 (2008 年) 报道, 这种活化途径在人肺癌腺癌细胞 (A549) 中起作用。推测可能在人肺癌发生中起重要作用。

第三节 芳香胺、酰胺与硝基芳烃类

一、芳香胺与酰胺

对于芳香胺的致癌性, 应该追溯到 1895 年 Rehn 的发现, 在德国染料工业中, 作业工人出现膀胱癌高发现象。后来鉴定出致癌物是 α -aminonaphthylamine、4-aminobiphenyl 和 benzidine (图 1-6)。

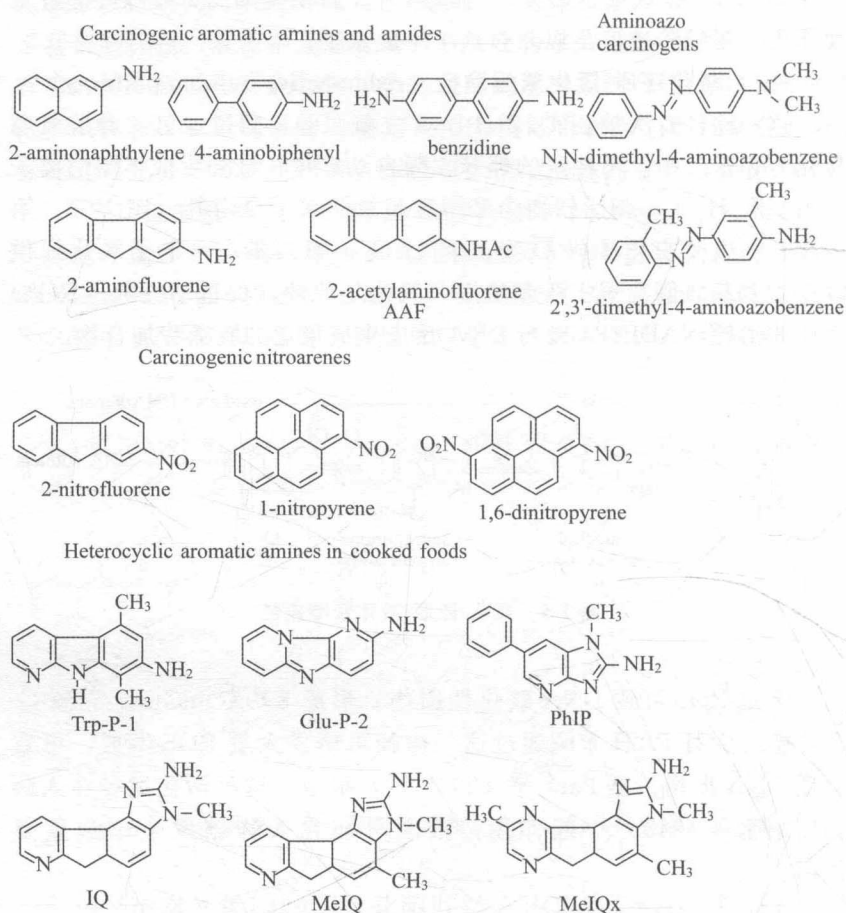


图 1-6 致癌性芳香胺、酰胺类、氨基偶氮化合物和硝基芳烃

Yoshida (1933 年) 报道, 用 O-aminazotolune 和 2,3'-dimethyl-4-aminoazobenne 可诱发大鼠和小鼠发生肝癌。Kinosita 报道, N,N-dimethyl-4-aminoazobezene 为强膀胱致癌物。最初作为杀虫剂使用的 2-acetylaminofluorene (AAF), 后来显示也为强致癌物 (Wieson 等, 1941 年)。

Miller 在 20 世纪 60 年代报道, 给大鼠喂饲 AAF, 在体内可转化为 N-hydroxy-AAF, 其致肝和其他器官肿瘤的作用比 AAF 更强。近年的证据表明, AAF 代谢主要在肝, 通过细胞色素 P450 进行 N-羟化作用 (Beland 和 Kadlubar, 1990 年)。AAF 的 N-羟化代谢产物转化为乙酸酯或硫酸酯, 然后与 DNA 反应。这条代谢途径具有种属特性 (Freudenthal 等, 1999 年), 在啮齿类动物主要致肝癌、肺癌和乳腺癌, 但膀胱癌少见。在狗致膀胱癌。值得注意的是, 在狗所致膀胱癌类似于人膀胱癌 (diechmann 等, 1965 年)。肿瘤发生的种属差异, 与所用研究动物的品系具有不同的活化途径有关。例如, 在啮齿类动物, N-HO-AAF 的进一步转化通过 3 条途径 (图 1-7):

(1) 经硫酸酯酶转化为硫酸酯 (Lai 等, 1985 年);

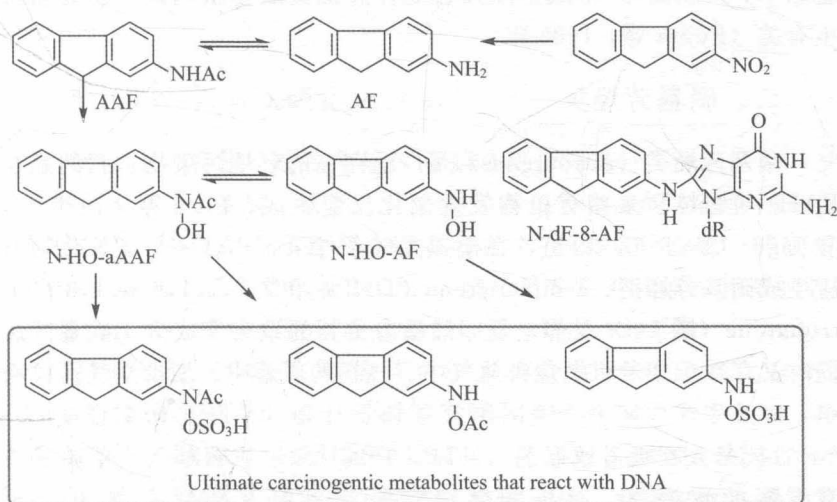


图 1-7 2-乙酰氨基芴 (AAF) 代谢活化

(2) N,O-乙酰转移酶催化乙酰基从氮转向氧, 形成 N-AcO-amino-fluorene (King 和 Glowinski, 1983 年);

(3) N-hydroxy-2-aminofluorene (A-HO-AF) 脱乙酰化。

N-HO-AF 转化为活性 N-次硫酸酯 (N-sulfoxy ester) (Beland 和 kadlubar, 1990 年)。在狗体内的主要转化途径为形成 N-glucuronide (Pouko 等, 1979 年)。转运至肾后, 被水解而丧失与 DNA 反应活性。

N-HO-AF 与 DNA 反应, 生成 dGuo-C-8 加合物 N-(deoxyguano-sin-8-yl)-2-aminofluorene (N-dG-8-AF) (Beland 和 Kadlubar, 1990 年) (图 1-7)。

整体动物实验, 给予 AAF, 2-minofluorene, 2-nitrofluorene, N-hydroxy 衍生物 (N-HO-AAF、N-HO-AF) 均可生成上述加合物 (Beland 和 Kadlubar, 1990 年; Lai 等, 1985 年; Poirier 等, 1988 年)。

dG-C-8 芳基胺加合物可在细菌和哺乳动物细胞诱发突变, 这类突变主要是 G-T 转换。在 N-HO-AAF 诱发小鼠肝肿瘤期间, 在原癌基因 ras 的编码 61 形成这类加合物。类似突变作用与人类膀胱癌发生有关 (Fujita 等, 1985 年)。

二、硝基芳烃类

硝基芳烃类 (nitroarenes) 是广泛存在的环境污染物。它们是在 PAHs 与燃料和某些有机物发生硝化反应生成。Pitts 等 (1978 年) 和 Jager (1978 年) 报道, 在模拟大气条件下, PAHs 与氮氧化物反应生成硝基芳烃类。1-nitropyrene (1-NP) 和 1,3-、1,6 和 1,8-dinitropyrene (图 1-6) 是静电复印油墨中主要的致突变成分。硝基芳烃同时又存在于柴油机燃烧排放气中、飞扬的煤烟中、城市空气颗粒物中, 以及香烟烟雾中。美国国家毒理学计划 (NTP) 研究证实, 1-NP 可能是人呼吸道致癌剂 (NTP, 1996 年)。二硝基苈比单硝基苈有更强的致癌性。有机物燃烧时所产生的其他致癌物 6-nitrochrysene、2-nitrofluene、4-nitrobiphenyl、2-nitrofluoranthene 和 3-nitrobenzanthrone, 在人体内通过肝细胞色素 P-450 硝基还原为 N-hydroxy-1-aminopyrene (N-HO-AP)。随后通过 O-乙酰化生成具有遗传毒性的 N-acetoxy-1-aminopyrene (N-AcO-AP) (Hatanaka 等, 2001 年; Sugimura 等, 2004 年)。N-AcO-AP 与 DNA 反应生成 de-

oxyguanosine 类似物, 再通过 N-HO-AF 与 DNA 反应生成 N-dG-8-AF (图 1-7)。

第四节 N-亚硝基化合物

Magee 和 Narnes (1956 年) 首先证实了 N-亚硝基化合物 (N-nitroso compounds) 是致癌物。用 N-亚硝基二甲胺 (NDMA) 喂饲大鼠可诱发大鼠肝肿瘤。同时 Magee 及其同事还发现 NDMA 进入大鼠肝产生活性形式, 可甲基化蛋白质和核酸。随后发现, 用亚硝酸钠防腐的鱼肉喂饲绵羊, 导致羊发病并死于肝毒性。最后证实鱼肉中含 NDMA, 推测 NDMA 是由二甲胺与亚硝酸盐反应生成, 但最初是有争议的。因为亚硝化作用在酸性条件下发生, 而鱼肉是中性或碱性, 后来证实, 亚硝化作用需在甲醛存在的条件下, 在 $\text{pH}=7$ 时才能发生。

一、饮食中 N-亚硝基化合物

人们对人类食物中是否含有 N-亚硝基化合物进行了深入研究, 发现广泛用于熏肉、火腿、香肠、烤牛排和烤鱼等食品的亚硝酸钠未受到严格控制。因此在上述食品中存在各种 N-亚硝基化合物, 特别是 NDMA 及其含二乙基类似物 NDEA。随后又鉴定出其他一些类似 N-亚硝基化合物, 并且多数具有致癌性 (Lawley, 1990 年; Lijinsky, 1999 年)。随后在啤酒和其他饮料中发现存在 N-亚硝基化合物。Spizegelhalder 等 (1980 年) 分析了不同类型啤酒样品 200 多份, 几乎都含有 NDMA, 其中黑啤酒含量最高, 甚至高于肉类中 NDMA 含量。啤酒中 NDMA 最初来源于用燃气加热麦芽, 麦芽中生物碱发生亚硝化作用而产生的。要解决这个问题, 需将燃气与麦芽分离。

二、烟草特异的 N-亚硝基化合物

最早在 20 世纪 70 年代的先驱研究者 Hechek 等发现, 烟草中的亚硝酸盐可诱发肺癌。烟草生物碱、烟碱与亚硝酸盐反应生成 N-亚

硝化合物 NNN、NNK 和 NNA (图 1-8)。

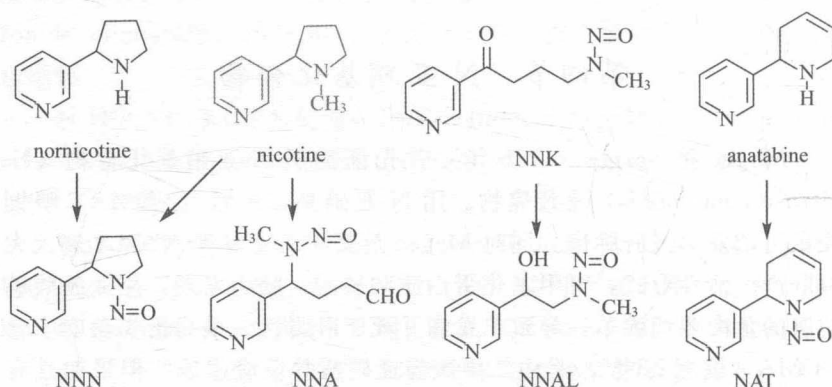


图 1-8 烟草中特异的 N-亚硝基化合物

最后鉴定出 7 种存在于烟草中的亚硝胺，其中 NNN 和 NNK 是最重要的致癌物。它们通常存在于主流烟、测流烟和未燃烧的烟草中。NNK 在所研究的多种动物中均可致肺癌，尤其对大鼠具有特别强的致癌性。同时 NNK 还可致胰腺癌、鼻咽癌和肝癌。NNN 对大鼠可致食管癌、鼻腔癌，对小鼠和仓鼠可致呼吸道肿瘤。

NNK 和 NNN 已被国际癌症研究所 (IARC, 2007 年) 归入 1 类，人类致癌物。

三、N-亚硝基化合物代谢活化

已知二烷基亚硝胺，无论在甲基，还是在亚甲基位置上，通过 CYP450 2A6 羟化生成 α -羟基-二烷基亚硝胺 (图 1-9)。

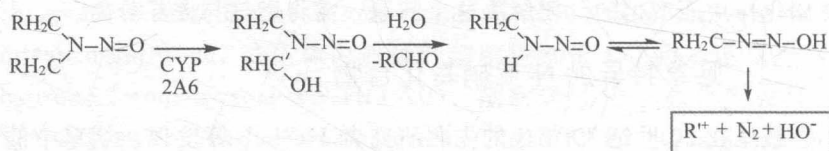


图 1-9 N-亚硝基化合物代谢活化

分解生成相应的乙醛和二烷基亚硝胺，并与二烷基重氮氢氧化物处于动态平衡 (Preussmann 和 Stewart, 1984 年)，这些中间代谢产物是前致癌物，它们降解失去 N_2 ，生成高活性终致癌物烷基阳离子。它们有足够存在条件到达细胞核，并与 DNA 反应。

第五节 自然界与生活中生成的致癌物

在人类活动环境中产生的致癌物，公众通常产生一种概念，认为“自然”与“安全”是相同意义的。然而，某些潜在致癌物正是一些自然产物。其中包括霉菌代谢产物，例如黄曲霉毒素；各种草药和香料，例如黄樟素、蒿脑；植物产物，例如吡咯里西啶生物碱 (PAs)。

一、黄曲霉毒素

黄曲霉毒素 (aflatoxins, AF) 是由丝状霉菌产生的霉菌毒素。它们通常是生长在谷物和其他农作物上的霉菌，如黄色曲霉菌 (*aspergillus flavus*) 和寄生曲霉 (*aspergillus parasiticus*) 的代谢产物。黄曲霉毒素主要分为 B_1 、 B_2 、 G_1 和 G_2 (图 1-10)

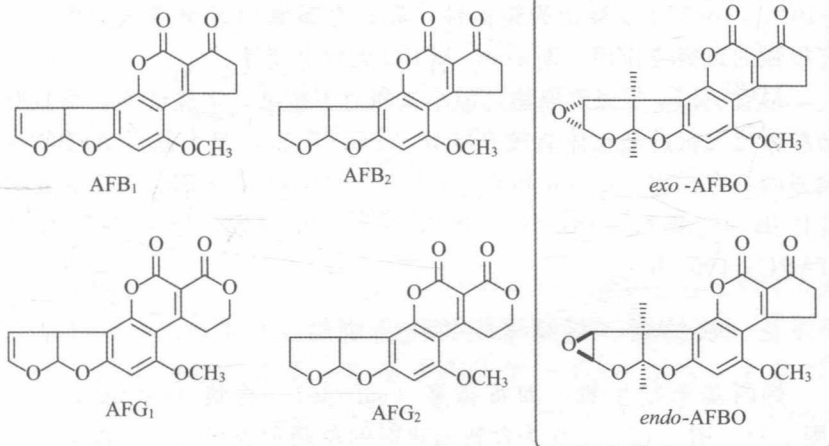


图 1-10 黄曲霉毒素主要成分

图中字母代表在紫外线下荧光颜色。B 为蓝色，G 为绿色。B 毒素有一个附着在香豆素内酯环上的环戊烯酮环。而 G 毒素具有一个替代的内酯环。黄曲霉毒素的活性主要与 AFB₁ 有关，已知 AFB₁ 为最强肝致癌物。黄曲霉毒素的荧光特性为筛查存在于谷物和各种商品中的黄曲霉毒素提供理论基础。

根据世界不同区域研究发现，食物中黄曲霉毒素的含量与肝癌发生率的关系，证实黄曲霉毒素是人类肝癌的主要致癌因素。研究证实，在非洲许多国家、中国和泰国，肝癌的发生与黄曲霉毒素有关。在美国东南部地区肝癌发生率高达 10%，可能与该地区每日平均摄入较高含量黄曲霉毒素有关。黄曲霉毒素影响全球健康问题，尤其是发展中国家。在这些国家中作为主要食物的谷物，多贮存在高热、高湿，有利于霉菌生长的条件下。IARC 认为，黄曲霉毒素是自然产生的毒素，是人类致癌物。已知 AFB₁ 需要通过 CYP450 代谢活化为基因毒性物。根据其代谢产物与 DNA 反应，生成的 DNA 加合物，推测其主要代谢产物是 8,9-环氧化物 (AFBO)。研究者最初试图合成 AFBO，但失败了，最终还是合成了 (Iyer 等，1994 年)。首先，AFB₁ 氧化为 2-甲基-2-环氧乙烷；随后通过 MFO 细胞色素 P450 代谢。通过这两种反应生成 exo-AFBO 和 endo-AFBO 两种异构体 (图 1-10)。exo-AFBO 被认为是活性产物，在碱基回复突变试验中，具有很强的致突变作用。而 endo-AFBO 无致突变性。

尽管 AFB₁ 是强致癌物，但小鼠相对不敏感。实验证实，小鼠肝微粒体比大鼠肝微粒体有较高特异 AFBO 产物，但小鼠对 AFBO 有较强的解毒作用 (Eaton 和 Gallagher，1994 年)。AFB₁ 诱发的致突变作用，主要与 AFBO 结合在 dGuo 位置一致，导致 G-T 转换 (IARC，1993 年)。

二、黄樟素、蒿脑与相关化合物

烯丙基苯衍生物，如黄樟素 (safrole)、蒿脑 (estragole) 等 (图 1-11，图 1-12) 是作为食物调味剂的草药和香料成分。桉本油中含 93% 以上的黄樟素，龙蒿油含蒿脑高达 60% 以上，而罗勒属植物

油含蒿脑 20%~70%。甲基木精是罗勒属植物肉桂、香茅和甘淑树油的主要成分。肉豆蔻在欧芹中占 10%~30%，在肉豆蔻核仁和肉豆蔻皮中占 4%~8%。

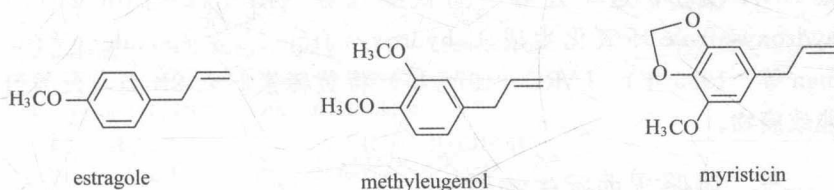


图 1-11 蒿脑可能转化的致癌物结构

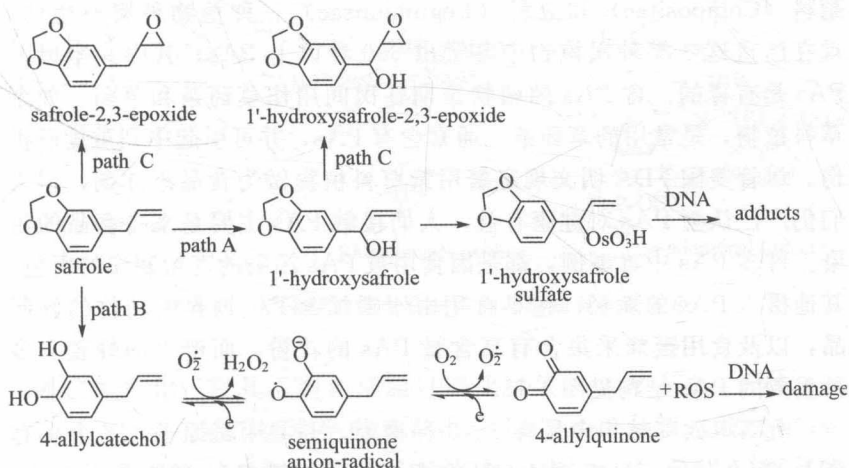


图 1-12 黄樟素的主要代谢途径

黄樟素 (图 1-12, path A) 的主要生物活化途径是经 CYP450 羟化为 1'-hydroxysafrole, 随后, 经硫酸转移酶转化为硫酸酯, 硫酸酯分解生成烯丙基碳离子, 并在 dGUO 位与 DNA 反应, 生成 N_2 -(trans-isosafrol-3-yl)-dGUO 和 N_2 -(safrol-1-yl)-dGuo (Chung 等, 2008 年)。