

烟草制品 体外毒性评价

谢复炜 李 翔 尚平平 | 主编

In vitro
toxicology
evaluation
of tobacco
products



中国轻工业出版社 | 全国百佳图书出版单位

烟草制品 体外毒性评价

谢复炜
李翔 主编
尚平平



 中国轻工业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

烟草制品体外毒性评价/谢复炜, 李翔, 尚平平主编. —北京: 中国轻工业出版社, 2019. 12

ISBN 978-7-5184-2706-2

I. ①烟… II. ①谢… ②李… ③尚… III. ①烟草制品—有毒物质—研究 IV. ①TS47

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2019) 第 245661 号

责任编辑: 张 靓 责任终审: 张乃柬 封面设计: 锋尚设计
版式设计: 砚祥志远 责任校对: 吴大鹏 责任监印: 张 可

出版发行: 中国轻工业出版社 (北京东长安街 6 号, 邮编: 100740)

印 刷: 三河市国英印务有限公司

经 销: 各地新华书店

版 次: 2019 年 12 月第 1 版第 1 次印刷

开 本: 720×1000 1/16 印张: 15

字 数: 310 千字

书 号: ISBN 978-7-5184-2706-2 定价: 58.00 元

邮购电话: 010-65241695

发行电话: 010-85119835 传真: 85113293

网 址: <http://www.chlip.com.cn>

Email: club@chlip.com.cn

如发现图书残缺请与我社邮购联系调换

190188K4X101ZBW

本书编写人员

主 编	谢复炜	李 翔	尚平平
副主编	赵俊伟	郭军伟	郭吉兆
参 编	颜权平	赵 阁	王 昇
	刘显军	华辰凤	杨 松

前言

P R E F A C E

吸烟有害健康已成社会共识。卷烟烟气、环境烟气（二手烟）、三手烟对人体和环境都带来了不利的健康影响。全球范围内的控烟运动日益高涨，来自大学、科研机构和烟草工业的科研团体一直都在开展吸烟与健康的研究。评价烟草烟气暴露的生物学效应，寻找吸烟相关疾病的分子机制以及有害结局路径，获得健康风险评估的科学数据，提供可控的干预措施，可为政府管控政策的制定以及工业减害技术的研发提供可靠的、客观的、科学的依据。

烟草烟气的暴露主要通过呼吸系统，吸入毒性的风险和健康危害是最直接的影响。卷烟烟气是一种复杂的、动态的气溶胶，这就注定了研究卷烟烟气吸入的暴露风险是困难的课题。卷烟烟气由粒相和气相组分组成，烟气颗粒物的尺寸效应，新鲜产生的烟气颗粒物的凝聚、碰撞、沉积和陈化等物理特性，以及颗粒物载带化学成分的复杂程度，直接影响了卷烟烟气的生物学效应。吸烟是烟草烟气的直接暴露，模拟实际烟气暴露的生理微环境，开展相关的毒理学实验研究，可以更好地理解烟草烟气导致的生理性和病理性的损伤效应，对于公众健康具有重大意义。

当前有关烟气吸入毒性的研究虽然较多，但并不系统全面，涉及从卷烟烟气气溶胶的理化特性到毒理学效应的综合分析较少，尤其是气溶胶粒径分布和生物学影响的相关性研究未见报道。传统的吸入毒性研究多利用动物模型，然而，随着实验动物使用“3R原则”的倡导与实施以及生物医学研究模式的转变，替代动物实验的体外模型研究已成为毒理学发展的重要方向。随着“21世纪毒性测试”理念的提出，在传统的烟气毒性评价方法的基础上发展了新的评估程序，并逐步形成了以基因组学、转录组学、蛋白组学和系统生物学为新的技术手段的评价策略；同时，不同学科交叉融合，多水平多维度的暴露评价模型及方法也逐步发展。2011年，美国FDA授权美国医学研究院（IOM）制订了“MRTP研究的科学标准”，提出MRTP的健康风险评估框架，其中体外毒性测试是评估框架的重要组成部分。近年来，新型烟草制品不断涌现，产品开发日益加速，对新产品的健康风险评估也受到关注，政府和管控机构对于新产品的上市提出了要求。国际上各个烟草公司都在积极发



展建立相应的新型烟草制品健康风险评估的方法和框架，以满足管控机构的管控要求。

本书围绕烟草烟气毒理学评价主题进行讨论，并以具体的实例做详细的分析。全书共分为6部分：第1部分概述了烟草烟气的化学组成和有害成分；第2部分介绍了卷烟烟气体外毒理学评价方法；第3部分讨论了卷烟主流烟气颗粒物的尺度、化学组成与生物毒性特征；第4部分介绍了基于气-液界面暴露的卷烟烟气体外毒性测试方法和研究进展；第5部分以具体实例讨论了微流控芯片暴露模型在卷烟烟气体外毒性测试中的应用；第6部分简要综述了新型烟草制品的毒理学评价研究。

书中若有不妥之处，恳请读者指正。

编者

第 1 部分 烟草及烟草制品危害性评价 / 1

- 1 烟草的使用历史 / 2
 - 2 烟草制品的化学组成 / 4
 - 2.1 烟草和烟气化学成分 / 5
 - 2.2 卷烟烟气的产生及测试 / 8
 - 2.3 烟草和烟气中的主要有害成分 / 11
 - 3 展望 / 40
 - 参考文献 / 41
-

第 2 部分 卷烟烟气体外毒性评价 / 43

- 1 体外毒性评价 / 43
- 2 卷烟烟气体外毒性评价 / 45
 - 2.1 细胞毒性 / 45
 - 2.2 遗传毒性 / 51
 - 2.3 细胞凋亡 / 59
 - 2.4 氧化应激 / 63
 - 2.5 炎症 / 64
 - 2.6 恶性转化 / 65
 - 2.7 免疫毒性 / 69
 - 2.8 分子生物学检测 / 73
 - 2.9 基于三维支架的体外毒性测试 / 75
- 3 展望 / 77
- 参考文献 / 78



第3部分 卷烟主流烟气颗粒物的尺度、化学组成与生物毒性研究 / 86

- 1 卷烟主流烟气中颗粒物的尺度分析与分布特征研究 / 87
 - 1.1 卷烟主流烟气的粒径分布和粒子浓度 / 91
 - 1.2 卷烟主流烟气逐口烟气的粒径分布和粒子浓度 / 93
 - 1.3 卷烟主流烟气粒子浓度与焦油和烟碱释放量的相关性 / 94
 - 1.4 小结 / 94
- 2 卷烟主流烟气中不同尺度颗粒物的化学成分分析 / 96
 - 2.1 卷烟主流烟气中不同尺度颗粒物的样品采集与化学成分分析 / 97
 - 2.2 小结 / 100
- 3 卷烟主流烟气中不同尺度颗粒物的体外生物毒性效应研究 / 101
 - 3.1 中性红细胞毒性试验 / 102
 - 3.2 Ames 试验 / 103
 - 3.3 体外微核试验 / 106
 - 3.4 细胞周期和凋亡分析 / 107
 - 3.5 小结 / 107
- 参考文献 / 109

第4部分 基于气-液界面暴露的卷烟烟气体外毒性测试 / 115

- 1 气-液界面暴露系统 / 116
 - 1.1 定制系统 / 117
 - 1.2 Borgwaldt 系统 / 118
 - 1.3 Burghart 系统 / 119
 - 1.4 Vitrocell®系统 / 120
 - 1.5 CULTEX®系统 / 120
- 2 基于气-液界面暴露的体外毒理学测试方法 / 121
 - 2.1 细胞毒性测试 / 122
 - 2.2 遗传毒性测试 / 122
 - 2.3 致突变性分析 / 122
 - 2.4 氧化应激和炎症反应测试 / 123



- 2.5 系统毒理学研究 / 123
 - 2.6 3D 培养模型应用 / 124
 - 2.7 烟气剂量学分析 / 124
 - 2.8 电子烟气溶胶评价 / 125
 - 3 全烟气暴露的体外毒理学测试方法 / 126
 - 3.1 全烟气暴露实验平台的建立 / 126
 - 3.2 基于全烟气暴露方式的卷烟烟气体外细胞毒性测试方法的建立 / 128
 - 3.3 基于全烟气暴露方式的卷烟烟气鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验方法的建立 / 139
 - 3.4 基于全烟气暴露方式的卷烟烟气体外微核测试方法的建立 / 152
 - 3.5 全烟气暴露方法与烟气冷凝物测试方法的比较 / 159
 - 3.6 全烟气暴露下的卷烟烟气剂量测定 / 162
 - 4 小结 / 166
 - 参考文献 / 166
-

第 5 部分 基于微流控芯片暴露模型的卷烟烟气体外毒性测试 / 172

- 1 微流控芯片简介 / 172
- 2 微流控芯片的应用 / 173
- 3 微流控芯片的制作 / 175
- 4 微流控芯片气液界面与细胞培养 / 177
 - 4.1 微流控芯片气液界面 / 177
 - 4.2 微流控芯片上细胞培养 / 179
- 5 器官芯片 / 180
- 6 微流控凝胶气液界面烟气暴露芯片的构建 / 181
 - 6.1 芯片设计方案 / 181
 - 6.2 上层芯片制作与优化 / 182
 - 6.3 中间层芯片制作与优化 / 188
 - 6.4 下层芯片制作与优化 / 193
 - 6.5 芯片结构定型 / 196



- 6.6 芯片上烟气暴露与细胞毒性检测 / 197
 - 6.7 芯片上烟气暴露与细胞氧化应激作用 / 204
 - 6.8 小结 / 207
 - 参考文献 / 207
-

第6部分 新型烟草制品毒理学评价研究进展 / 212

- 1 加热非燃烧型烟草制品毒理学评价 / 213
 - 1.1 碳加热型烟草制品毒理学评价 / 213
 - 1.2 电加热型烟草制品毒理学评价 / 214
 - 2 无烟气烟草制品毒理学评价 / 216
 - 3 电子烟毒理学评价 / 217
 - 4 展望 / 219
 - 参考文献 / 219
-

附录 缩略语 / 224

第 1 部分

烟草及烟草制品危害性评价

烟草及烟草制品对健康产生的影响在科技文献中多有报道，虑及国际社会关于烟草消费和接触烟草烟气对健康、社会、经济和环境造成的破坏性后果的关注，2003年5月21日世界卫生大会批准了《世界卫生组织烟草控制框架公约》[World Health Organization Framework Convention on Tobacco Control (WHO FCTC)]。公约呼吁所有国家开展尽可能广泛的国际合作，控制烟草的广泛流行。中国于2003年11月10日正式签署FCTC。2006年1月，FCTC在中国正式生效。2007年4月，国务院批准成立了FCTC履约工作部协调领导小组（简称“履约小组”），由国家发展和改革委员会牵头FCTC的履约职能；2008年，转由工业和信息化部牵头；2018年3月，国务院机构改革将FCTC履约职能划归国家卫生健康委员会。中国也积极履约FCTC，《中华人民共和国烟草专卖法》（2009年8月27日第十一届全国人民代表大会常务委员会第十次会议修订）的第五条规定，“国家加强对烟草专卖品的科学研究和技术开发，提高烟草制品的质量，降低焦油和其他有害成分的含量。国家和社会加强吸烟危害健康的宣传教育，禁止或者限制在公共交通工具和公共场所吸烟，劝阻青少年吸烟，禁止中小学生吸烟。”目前，中国已形成了包括有害成分分析和体外毒性评价的较为系统的烟草制品危害性评价方法，在降焦减害方面取得了显著成效。

烟草戒断存在很大的难度，在过去几十年，国际跨国烟草公司和中国均推出了低焦油、“淡”卷烟等风险改变烟草制品（Modified Risk Tobacco Products, MRTPs），此举被认为有误导消费者嫌疑。鉴于此，美国于2009年通过了《家庭吸烟预防与烟草控制法案》（以下简称《法案》），《法案》第911节对MRTPs做出了明确规定，并给出MRTPs的定义：任何销售或发行的，旨在降低吸烟者罹患烟草相关疾病风险或降低疾病危害的烟草制品。《法案》授权美国食品与药物管理局（FDA）对烟草制品的制造、发行与销售进行管制，并要求FDA编制科学评估MRTPs的管制措施或指导意见，同时强调，编制管



制措施或指导意见时，应向美国国家科学院医学研究所寻求咨询。

依照《法案》规定，美国国家科学院医学研究所召集了来自各个领域（包括成瘾研究、心脏病学、肺病学、肿瘤学、流行病学、方法设计研究、生物统计学、风险认知研究、青少年行为研究、药物与设备管理与立法研究、人群健康研究、吸烟与戒烟研究以及毒理学）的 15 名专家组成了风险改变烟草制品研究科学标准委员会。在为期 10 个月的时间内，委员会召开了 5 次会议，详细研究了以往的文献资料，分别听取了来自烟草行业、公共卫生宣传组织与监管机构代表的意见，并且听取了外部专家的建议，最终形成了 MRTPs 的评价方法，规定在健康效应、潜在致瘾能力以及公众对 MRTPs 的认知三个方面开展研究并且获取有利证据后，MRTPs 方能进入市场。

其中，健康效应的研究，即危害性评价。包括：

(1) 化学成分及有害成分分析。

(2) 临床前毒性研究 主要目的是鉴别出极端有害的产品，并将其排除在临床试验之外，以及鉴别出具有潜在减害能力的产品，并准许其进入临床戒断评估。烟草制品应进行的标准体外测试包括：细胞毒性、遗传毒性、细胞凋亡、氧化应激、炎症、恶性转化等实验。完成体外毒性测试后，方可开展动物实验。

(3) 临床研究 在评估人体与 MRTPs 特定成分的暴露程度时可使用暴露生物标志物，暴露生物标志物包括特定成分本身的代谢产物，或上述两种物质与 DNA 或蛋白质的加合物。在比较 MRTPs 和传统卷烟对人体健康的影响时，流行病学研究可提供更令人信服的证据，横断面调查、随机对照临床实验或前瞻性队列研究的证据性更强，并可用于风险评估。

本章主要对烟草使用、烟草烟气化学成分、有害成分等方面进行论述。

1 烟草的使用历史

烟草的历史已长达多个世纪，最初兴起于美洲，在 1492 年与欧洲人进行烟草贸易之前，西方国家的烟草商业已经有了千年历史。烟草是由美国中部与南部地区的美洲原住民开始种植的，据玛雅神庙的雕刻中描述，烟草常作为宗教用途^[1]。如图 1.1 所示为描绘玛雅统治者抽雪茄场景的宫殿纹陶罐，玛雅人常以雪茄、鼻烟或液体等方式单独食用或混合吸入烟草，产生一种迷幻和恍惚感。在宗教典礼中烟草也可以作为迷幻剂来使用，被认为是奉献给

神的祭品。

烟草从美洲流传到世界各地的时间可追溯到 1492 年 10 月 11 日，当时哥伦布在阿拉瓦克人的住宅中得到了一些干燥烟叶，并将这些烟叶带回了欧洲，可能同时也学会了抽烟的技巧^[2]。这种植物以一名法国驻葡萄牙大使的名字命名，称为 *nicotiana*，据说是这位大使将它引进法国。在法国与西班牙种植的烟草为红花烟草 (*Nicotiana tabacum*)，种子来自巴西与墨西哥，而在葡萄牙与英格兰种植的烟草为黄花烟草 (*Nicotiana rustica*)，种子分别来自佛罗里达州与弗吉尼亚州^[2]。烟草约在 16 世纪中、后期传入中国。

如表 1.1^[2] 所示，早期社会中烟草就已广泛分布，其广泛使用的原因包含了社会心理学因素以及药理学因素。对于许多吸烟者来说，烟碱很容易让人上瘾，另外烟草烟气中的其他成分、气味或添加剂也会对人产生影响。



图 1.1 玛雅宫殿纹陶罐

(8 月 24 日，深圳博物馆、湖北省博物馆与成都金沙遗址博物馆联名引进“自然的力量”：洛杉矶郡艺术博物馆藏古代玛雅艺术品)

表 1.1 早期烟草的种植与使用编年史

时间	事件
1492 年	哥伦布发现了阿拉瓦克人的住宅，并得到了一些干燥烟叶
1499 年	阿美利哥·韦斯普奇记录了委内瑞拉附近一座岛屿上的人嚼用烟草的行为
1545 年	加拿大蒙特利尔市附近的易洛魁印第安人被发现有吸烟习性
1556 年	法国开始种植烟草，烟草在法国初为人知
1558 年	烟草开始在巴西和葡萄牙盛行
1559 年	西班牙引进烟草
1560 年	中非引进黄花烟草
1565 年	英格兰引进烟草
1600 年	烟草被引入意大利、德国、挪威、瑞典、俄国、波斯、印度、印度支那、日本以及非洲西岸
1612 年	来自弗吉尼亚詹姆斯敦的约翰·罗尔夫最早将种植烟草用于出口贸易
1631 年	烟草生产开始扩展到马里兰州，并逐渐向其他地区延伸
17 世纪 50 年代	葡萄牙人将烟草带到南非及其他国家，西班牙人则将烟草运往菲律宾、危地马拉、其他美洲中部与南部国家以及西印度群岛。印度尼西亚开始种植烟草。烟草栽培扩展到欧洲



烟草的现代史始于 19 世纪中期，美国人詹姆斯·艾伯特·邦萨克 (James Albert Bonsack) 于 1880 年发明了连续成条卷烟机 (图 1.2)，并获得专利权，这一发明为烟草行业的工业化奠定了基础^[3]，确立了卷烟工业在烟草工业中的主导地位。1891—1892 年，美商老晋隆洋行在天津和上海开设卷烟厂，将邦萨克卷烟机带入中国，带动了中国烟草工业的发展。中华人民共和国成立后，历经半个世纪，烟草工业装备和技术总体上实现了跨越式发展，部分卷烟和复烤企业已达到国际先进水平。

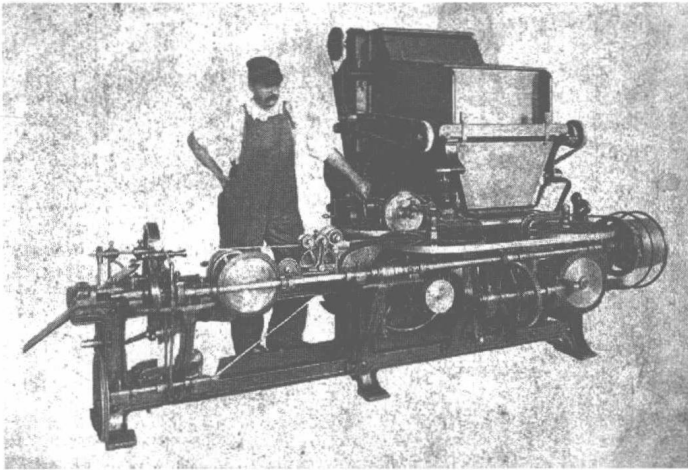


图 1.2 邦萨克卷烟机

([行业·设备] 卷烟机的历史发展[EB/OL]. <http://www.sohu.com/a/343418792/20066604>, 2019.09.25)

中国是世界烟草大国，烟叶总产量约占世界烟叶总产量的四分之一，从 1980 年起，中国烟叶种植面积和产销量均居世界第一位。中国烟草种植分布广泛，其中种植面积最大、产量最多的是烤烟，其次是晾晒烟、白肋烟、香料烟和少量黄花烟。

2 烟草制品的化学组成

烟草制品是以烟草为原料制成的嗜好性消费品，分为燃吸类烟草制品和非燃吸类烟草制品，前者包括卷烟、雪茄、水烟、旱烟等，后者包括鼻烟、嚼烟等。使用者暴露两种烟草制品的途径和物质存在差异，使用燃吸类烟草

制品是经呼吸系统暴露烟气，使用非燃吸类烟草制品是经消化系统直接暴露烟草。以下从烟草和烟气化学成分和有害成分两方面来介绍烟草制品的化学组成。

2.1 烟草和烟气化学成分

1950年5月27日，美国科学家 Levin 和 Wynder 在《美国医学会杂志》发表了吸烟与肺癌关系的病例。对照研究结果，首次将吸烟与肺癌联系起来^[4]。1948—1952年，英国科学家 Richard Doll 和 Austin Bradford Hill (图 1.3) 用回顾性配对调查方法研究吸烟与健康的关系，研究结果发表在《不列颠医学杂志》，论文指出吸烟与肺癌的发生有密切的联系，肺癌患者比对照者抽吸烟支数多、抽吸频率大、开始吸烟的年龄早、吸烟时间长，并采用相对危险度表示吸纸烟和患肺癌之间的关联高达 7 倍甚至十几倍，而且重度吸烟者得肺癌的几率是非吸烟者的 50 倍^[5]。这两项流行病学研究使人们认识到抽吸卷烟带来的健康风险。

为确定卷烟烟气导致癌症的机制，对不同品系的小鼠进行了一系列的试验研究，1953年，美国科学家 Wynder 等采用丙酮萃取卷烟烟气冷凝物 (Cigarette Smoke Condensate, CSC)，将其涂抹在小鼠的皮肤上，24 个月后，81 只小鼠中有 48 只发生皮肤乳头状瘤，36 只小鼠在染毒部位发生表皮样癌，这一试验结果从动物实验方面证实了吸烟对健康的不利影响^[6]。从此，烟草和烟气化学成分和有害成分的研究与鉴定工作广泛开展，人们对烟草和烟气的物理化学性质、尤其是化学成分的了解越来越深入。

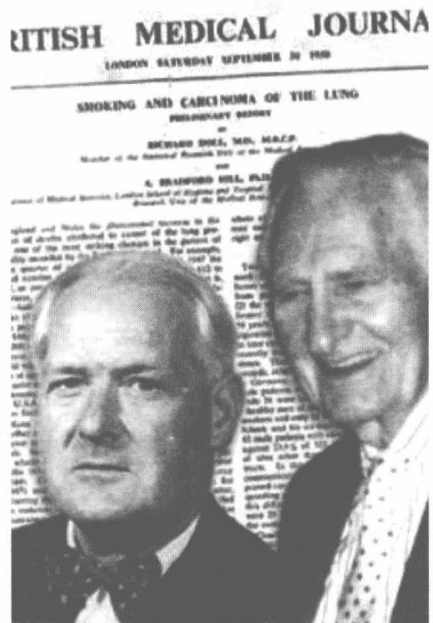


图 1.3 Richard Doll 和 Austin Bradford Hill
[. 流行病学 (第八版). 人民卫生出版社]

从 20 世纪 50 年代开始, 世界范围内的“吸烟与健康”研究发展迅速。到 1970 年, 关于“吸烟与健康”的论文就有 14500 多篇。而从 1970—2000 年的 30 年间, 研究人员发表了超过 10 万篇的论文, 研究向更高水平发展。卷烟烟气提取物或冷凝物的毒性作用也促进了烟草和烟气化学成分分析的发展。20 世纪 50 年代, 鉴于分析技术的限制, 虽然烟草和烟气被认为是极其复杂的混合物, 但对它的组成却知之甚少, 仅鉴定报道了不到 100 种物质。随着分析技术的提高, 烟草和烟气中鉴定出的化学成分呈逐年增加趋势, 如图 1.4 所示, 截至 2012 年, 烟草和烟气中鉴定出的化学成分分别为 5596 和 6010 种, 其中烟草和烟气共有的为 2215 种^[7]。

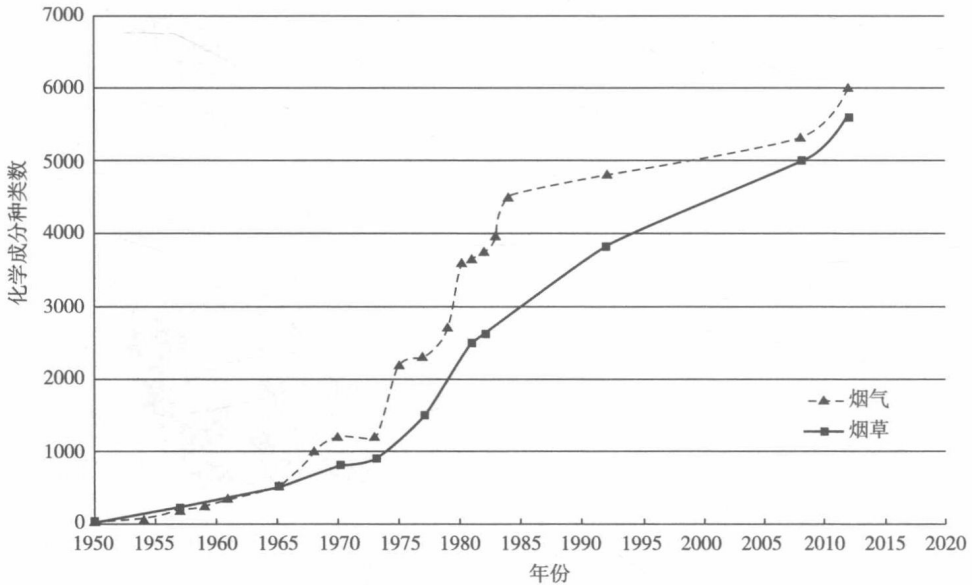


图 1.4 自 1954 年以来报道的烟草和烟气中鉴定出的化学成分

如表 1.2 所示为 Rodgman 等 2008 年对烟草和烟气中的主要化学成分进行的总结^[8]。已从烟草中鉴定出的化合物将近 5000 种, 从卷烟烟气中鉴定出的化学成分超过 5000 种。该表显示, 烟草和烟气中的成分主要有烃类, 如烷烃、烯烃和炔、烯类化合物; 含氧化合物, 如植物甾醇和衍生物、醛、酮、羧酸; 含氮组分, 如腈、蛋白质和胺、酰胺、酰亚胺类、亚硝酸胺; 杂环化合物, 如硫化物、含卤素和固定气体、金属、非金属和离子、农药残留。就烟草中已鉴定的成分而言, 其质量占烟草总质量的 98.7% 以上, 而已鉴定出的

烟气中化学成分的质量则超过总烟气质量的99%。

表 1.2 烟草和烟气中的化学成分 (2008 年)

化合物	烟草中成分	烟气中成分
烃类		
烷烃	20	31
烯烃和炔	16	320
烯类化合物	42	76
单环芳烃	8	58
多环芳烃	12	570
小计	98	1055
含氧组分		
醇	875	542
植物甾醇和衍生物	63	9
醛	119	62
酮	418	514
羧酸	368	275
脂类和树脂	—	—
氨基酸	69	1
酯	388	123
内酯	133	118
酸酐	6	7
碳水化合物	230	6
酚类	107	363
醌	14	26
醚	466	392
小计	3256	2438
含氮类化合物		
腈	9	111
蛋白质和胺	198	177
酰胺类	88	106
酰亚胺类	19	44
N-亚硝胺	13	15