

6-羟基烟碱与烟碱的安全性比较研究

马林, 寇霄腾, 帖金鑫, 张文龙, 张锐

(郑州轻工业学院 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450001)

摘要:通过毒理学试验比较6-羟基烟碱与烟碱的安全性;对SPF级雄性小白鼠(体重30~35 g)进行急性毒性试验,分别进行35 d连续灌胃每只1.00 mg,0.75 mg,0.50 mg,0.25 mg的烟碱和6-羟基烟碱试验(分别相当于每d抽吸20支烟的烟民烟碱接受量的8倍,6倍,4倍,2倍);计算各组心肝脾肺肾的脏器系数,检测血液中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、甘油三酯(TG)3项生化指标,并对小鼠活体解剖取肝、肺、肾组织作病理学检查.结果表明,6-羟基烟碱相比烟碱的毒性明显降低($P < 0.05$),低剂量的烟碱不会造成小鼠器官的病变.

关键词:6-羟基烟碱;烟碱;安全性;毒理学试验

中图分类号:TS41;S859.83 **文献标志码:**A **DOI:**10.3969/j.issn.2095-476X.2013.01.006

Study on the safety of 6-hydroxynicotine compared with nicotine

MA Lin, KOU Xiao-teng, TIE Jin-xin, ZHANG Wen-long, ZHANG Rui

(College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: The safety of 6-hydroxynicotine and nicotine was compared through toxicology test. The acute toxicity and accumulative test was carried out on SPF mice (each of 30 ~ 35 g). After 35 d intragastrically each of 1.00 mg, 0.75 mg, 0.5 mg, 0.25 mg of nicotine and 6-hydroxynicotine (about receive the amount of a man pumping 20 cigarettes a day 8, 6, 4, 2 times), the organ coefficient of heart, liver, spleen, lung and kidney were calculated and blood indicators of ALT, AST, TG were determined, the pathological examination was also done using liver, lung and kidney tissue. The results showed that 6-hydroxynicotine compared to nicotine significantly reduced in toxicity ($P < 0.05$), low doses of nicotine does not cause organ lesions in mice.

Key words: 6-hydroxynicotine; nicotine; safety; toxicology test

0 引言

吸烟与健康是人类关注的问题,争论的焦点之一在于烟草中存在烟碱.目前的研究认为,烟碱是一种水溶性、激动N胆碱受体的化学物质^[1].人吸入烟碱,极易被肺泡表面的黏液溶解和吸收,进而对人体各组织器官造成影响.过量吸入烟碱会抑制

中枢神经、麻痹心脏,甚至危及生命^[2];在吸烟过程中烟碱还会被亚硝化,生成有害的亚硝胺(TS-NA)^[3];烟碱也是一种环境有毒物质^[4].但是,烟碱对吸烟者的贡献在于增加烟味而感到生理功能(通常称为“劲头”),随着社会的发展和水平的提高,降解烟碱成为国内外研究的热点.控制烟碱将其降解到合适的程度,获得毒性显著降低且仍保持

一定生理功能的中间产物替代烟碱是减少吸烟危害的可行途径之一. 由此亟待解决的关键问题是: 烟碱生物降解中间产物的制备方法及其安全性与生理功能评价. 纵观国内外研究进展, 鲜有这方面的报道. 因此, 笔者将利用节杆菌 Z3 降解烟碱, 在节点上制备烟碱降解的中间产物 6-羟基烟碱进而对 6-羟基烟碱与烟碱的安全性进行初步的毒理学比较试验.

1 实验

1.1 材料与设备

材料: 试验动物为健康 SPF 级雄性小白鼠, 体重 30 ~ 35 g, 由河南省动物实验中心提供. 试验室温度为 (23 + 1) °C, 相对湿度为 40% ~ 70%, 自然照明, 自由摄食、饮水.

试剂: 烟碱(含量 > 99%), 郑州烟草研究院提供; 6-羟基烟碱(含量 > 98%), 郑州轻工业学院烟草生物技术实验室合成; 血清甘油三酯(TG)试剂盒、丙氨酸氨基转移酶(ALT)试剂盒、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)试剂盒, 均购于中生北控生物试剂有限公司; 乙醇、乙醚、NaCl 等试剂均为分析纯试剂, 天津科密欧试剂有限公司产.

仪器: YD—12P 型全自动生物组织脱水机, YD—6L 型全自动生物组织冷冻包埋机, YD—6D 型全自动生物组织包埋机, YD—B 型智能型生物组织烤片机, YD—A 型智能型生物组织摊片机, 均产于浙江金华益迪医疗设备厂; LEICA RM2235 型生物组织切片机, 德国 LEICA 公司生产; XSP—24N 型光学显微镜, 南京江南光电集团股份有限公司生产; DM—BA300 数码生物显微镜, 厦门麦克奥迪公司生产.

1.2 方法

1.2.1 样品的前处理 用 1 mL 生理盐水溶解不同剂量的烟碱及 6-羟基烟碱.

1.2.2 烟碱及 6-羟基烟碱的急性毒性试验^[5]

1) 预试验: 根据人与小鼠对药物耐受量的比例换算确定给药剂量^[6]. 剂量按成倍递减方式, 用烟碱及其降解产物的水溶液给小鼠一次灌胃. 烟碱剂量为每只鼠 5.00 mg, 2.50 mg, 2.00 mg, 1.00 mg; 6-羟基烟碱按烟碱同样剂量给小鼠灌胃, 观察小鼠的急性毒性反应和死亡情况.

2) 剂量探测试验: 配制烟碱及 6-羟基烟碱溶液, 按每只鼠 2.00 mg, 1.00 mg, 0.50 mg, 0.25 mg 烟碱 4 个剂量组, 分别给小鼠一次灌胃, 每组 4 只小

鼠. 烟碱降解产物按烟碱同样剂量给同样数量的小鼠灌胃, 观察 14 d, 记录动物饮食、生存、活动情况. 如有动物死亡, 立即进行解剖检查心、肺、肝、肾等重要脏器有无病变.

3) 限量试验: 按常规动物灌胃前先禁食 4 h, 给每只试验小鼠一次灌胃烟碱 0.75 mg, 观察 14 d, 记录动物饮食、生存、活动情况. 如有动物死亡, 立即进行解剖检查心、肺、肝、肾等重要脏器有无病变.

1.2.3 烟碱及 6-羟基烟碱的慢性毒性试验 将 72 只小鼠分为 9 组, 分别为空白对照组、4 个烟碱试验组和 4 个 6-羟基烟碱试验组, 每组 8 只并编号, 做好记录. 烟碱组按照 1.00 mg, 0.75 mg, 0.50 mg, 0.25 mg 烟碱 4 个剂量组, 编号为 1, 2, 3, 4, 分别每天给小鼠定时灌胃. 6-羟基烟碱组按烟碱同样剂量给同样数量的另外 4 组小鼠灌胃. 最后一组为空白对照组灌相同剂量的生理盐水. 为期 35 d, 72 只小鼠给予相同饲养条件. 试验期间观察并记录小鼠每天灌胃前后性情、竖尾程度、活动频率和行动速度等各方面的改变, 每 7 d 测一次体重. 给药期满 35 d, 禁食 12 h 后, 解剖试验小鼠. 每次解剖前眼球取血, 分离血清, 酶法测定血清甘油三酯(TG)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)3 项生化指标. 同时对脏器称重, 结果以脏器系数(%) = 器官质量(g)/体重(g) × 100% 表示, 并将各个脏器组织用 10% 甲醛溶液浸泡固定, 常规洗净、脱水、石蜡包埋, 10 μm 切片, 苏木精-伊红染色, 显微镜下观察.

1.2.4 统计学方法 用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理, 以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间差异比较用 LSD 方法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果与分析

2.1 烟碱及其降解产物的小鼠急性毒性试验

2.1.1 预试验 当烟碱灌胃剂量分别为 5.00 mg, 2.50 mg, 2.00 mg 和 1.00 mg 时, 立即可以观察到小鼠出现竖尾、心率加快、呼吸困难、全身剧烈抽搐、惊厥并死亡, 并且死亡时间随剂量的增大而缩短; 1.00 mg 灌胃后轻度抽搐, 5 min 后恢复正常, 无急性毒性反应. 烟碱降解产物 6-羟基烟碱按烟碱同样剂量给小鼠灌胃, 小鼠均表现正常, 未见急性毒性反应和急性死亡, 结果见表 1.

2.1.2 剂量探测试验 烟碱灌胃小鼠 2.00 mg, 1.00 mg 剂量组于给药当天各死亡 2 只; 0.50 mg 剂量组于给药第 2 d 死亡 1 只; 其余试验小鼠均存活

表1 烟碱和6-羟基烟碱对小鼠急性中毒的表现

系统	急性中毒表现		可能的靶器官	
	烟碱 5.00 mg	6-羟基烟碱 5.00 mg	烟碱	6-羟基烟碱
呼吸系统	呼吸困难(张口快速深大呼吸,鼻翼煽动)	*	肋肌麻痹,呼吸中枢受阻,胆碱能神经受累,心肺循环障碍	—
骨骼肌系统	竖尾迅速兴奋,全身剧烈抽搐,角弓反张等惊厥表现,之后死亡	*	神经肌肉、中枢神经系统受累	—
心血管系统	耳部黏膜变白,心率加快,眼睛暗淡无光	*	血管系统受累,中枢神经、循环障碍	—

注:“*”表示无任何中毒表现,“—”表示无靶器官的作用。

14 d至试验结束.存活小鼠饮食、生存、活动情况均正常,未见动物惊厥、抽搐、昏睡、倦怠、饮食减少、活动减少和体毛蓬松等异常情况.用药期间的死亡小鼠当即解剖以及全部存活动物处死解剖后,均未见心、肺、肝、肾等重要脏器有明显病变。

烟碱降解产物6-羟基烟碱按烟碱同样剂量给小鼠灌胃后,各剂量组小鼠均表现正常,未见急性毒性反应和急性死亡;14 d试验结束后全部存活动物解剖后,均未见心、肺、肝、肾等重要脏器有明显病变。

2.2 烟碱及其降解产物的小鼠慢性毒性试验

2.2.1 烟碱及6-羟基烟碱对小鼠脏器系数的影响

试验结束后,解剖小鼠,对心、肺、肝、肾、脾脏称重,计算各个脏器的脏器系数(见表2)。

与对照组比较,烟碱剂量组1和2小鼠肝脏、肺

脏、肾脏系数有显著性增加($P < 0.05$),其他组织的脏器系数差异无显著($P > 0.05$),烟碱剂量组3和4以及6-羟基烟碱组各个组织脏器系数都差异无显著($P > 0.05$)。

2.2.2 烟碱及6-羟基烟碱对小鼠血液ALT,AST,TG的影响

血液AST活性升高,除能反映肝细胞损伤外,对肌肉疾病、心肌功能受损等的诊断有一定的参考意义^[7].生理情况下,肝细胞内有较高浓度的AST和ALT,AST主要存在于线粒体内,而ALT则分布于细胞浆内.ALT缺乏特异性^[8],体重指数、饮酒、运动、疲劳、服用药物等均会影响其活性^[9].轻度肝脏受损时,仅损伤肝细胞膜,线粒体则保持完整,此时只有细胞浆内的酶(ALT)释放至血液;重型肝炎时,肝细胞损伤同时累及细胞膜和线粒体,使AST和ALT释放至血液增多^[10].甘油三酯(TG)水平是心血管病的独立危险因素^[11],TG水平可以促进血凝,增加血小板聚集,抑制纤溶^[12].检测结果见表3。

血清转氨酶ALT和AST,烟碱组3和4以及6-羟基烟碱组与空白对照组接近,烟碱组1和2显著高于其余各组,有统计学意义($P < 0.05$).血清TG,烟碱组2,3和4以及6-羟基烟碱组与空白对照组接近,烟碱组1显著高于其余各组,有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2.3 烟碱及6-羟基烟碱作用小鼠后肺脏病理学组织检查

1.00 mg/mL和0.75 mg/mL烟碱组肺泡壁毛细血管灶性增厚,管腔变窄.支气管壁增厚,上皮细胞肿胀,嗜酸性增强(见图1).1 mg/mL 6-羟基烟碱剂量组以及其余各剂量组及对照组各

表2 给药35 d后小鼠各脏器的脏器系数(n=8)

脏器系数/%	对照	烟碱				6-羟基烟碱			
		1	2	3	4	1	2	3	4
心	0.622 ± 0.32	0.652 ± 0.48	0.637 ± 0.41	0.633 ± 0.36	0.613 ± 0.42	0.663 ± 0.39	0.641 ± 0.37	0.640 ± 0.38	0.592 ± 0.41
肝	4.211 ± 0.31	4.899 ± 0.37	4.671 ± 0.36	4.416 ± 0.36	4.341 ± 0.34	4.288 ± 0.33	4.289 ± 0.32	4.225 ± 0.31	4.130 ± 0.32
肺	0.652 ± 0.13	0.752 ± 0.09	0.746 ± 0.11	0.684 ± 0.12	0.680 ± 0.11	0.706 ± 0.14	0.656 ± 0.11	0.647 ± 0.13	0.634 ± 0.10
脾	0.340 ± 0.05	0.357 ± 0.04	0.341 ± 0.03	0.334 ± 0.04	0.362 ± 0.04	0.354 ± 0.06	0.351 ± 0.04	0.322 ± 0.03	0.332 ± 0.06
肾	1.363 ± 0.13	1.638 ± 0.12	1.542 ± 0.11	1.432 ± 0.12	1.395 ± 0.11	1.440 ± 0.14	1.396 ± 0.13	1.372 ± 0.12	1.362 ± 0.11

表3 血清中ALT,AST,TG的变化(n=8, $\bar{x} \pm s$)

指标	对照	烟碱				6-羟基烟碱			
		1	2	3	4	1	2	3	4
ALT/(nmol · s ⁻¹ · L ⁻¹)	29.02 ± 2.51	37.53 ± 4.37	34.12 ± 3.43	30.75 ± 2.34	31.40 ± 3.67	30.48 ± 2.63	30.1 ± 2.35	29.5 ± 2.11	29.3 ± 2.23
AST/(nmol · s ⁻¹ · L ⁻¹)	105.5 ± 9.16	118.68 ± 11.25	112.75 ± 8.54	108.30 ± 7.07	106.25 ± 8.32	107.69 ± 7.42	107.45 ± 7.66	107.34 ± 7.77	106.39 ± 8.82
TG/(nmol · L ⁻¹)	1.24 ± 0.32	1.75 ± 0.50	1.43 ± 0.26	1.35 ± 0.34	1.25 ± 0.39	1.32 ± 0.36	1.29 ± 0.33	1.27 ± 0.24	1.25 ± 0.11

级支气管结构完整,细支气管管壁为单层方形纤毛上皮或单层方形上皮.肺泡管和肺泡结构完整,无变质、炎性浸润和增生等异常改变(见图2).

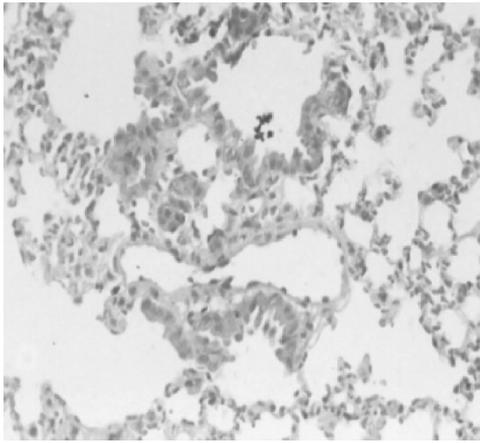


图1 1.00 mg/mL 烟碱对肺脏的影响(HE × 40)

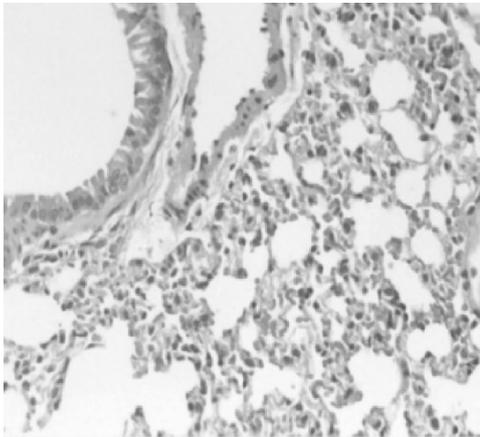


图2 1.00 mg/mL 6-羟基烟碱对肺脏的影响(HE × 40)

2.2.4 烟碱及6-羟基烟碱作用小鼠后肝脏病理学组织检查 1.00 mg/mL 和 0.75 mg/mL 的烟碱剂量组肝细胞肿大,肝窦变窄,以小叶中央部明显,中央静脉瘀血,小叶中心肝细胞颗粒变性和空泡变性(见图3).其余各剂量组及对照组肝小叶结构完整,肝索呈放射状排列,以中央静脉为中心放射状走行,肝细胞呈多边形,核圆形居中,无血管病变、萎缩、变性和坏死等改变(见图4).

2.2.5 烟碱及6-羟基烟碱作用小鼠后肾脏病理学组织检查 1.00 mg/mL 和 0.75 mg/mL 的烟碱剂量组出现不同程度肾小管上皮细胞肿胀变性,胞浆疏松,出现嗜酸性颗粒,部分上皮细胞核浓缩坏死,间质血管充血(见图5).其余各剂量组及对照组

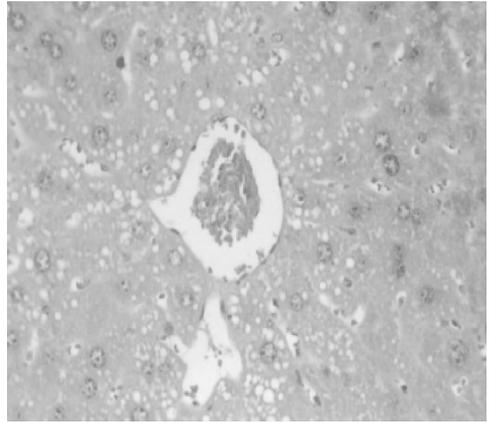


图3 1.00 mg/mL 烟碱对肝脏的影响(HE × 40)

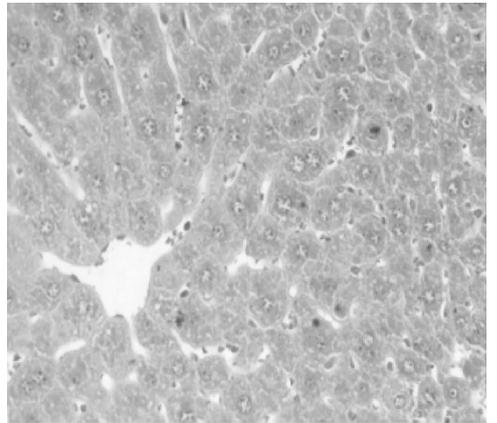


图4 1.00 mg/mL 6-羟基烟碱对肝脏的影响(HE × 40)

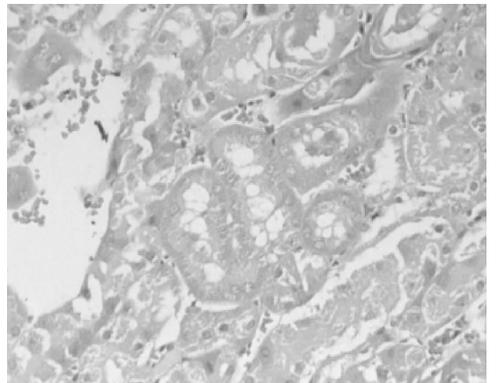


图5 1.00 mg/mL 烟碱对肾脏的影响(HE × 40)

在显微镜下可见皮、髓质分界清楚,肾小管各段结构清晰,肾小管上皮细胞无变性坏死,间质纤维组织少,无增生变化.肾小球分布均匀,体积正常,肾小球囊无粘连狭窄,无炎症改变,肾脏间质无炎性细胞浸润(见图6).

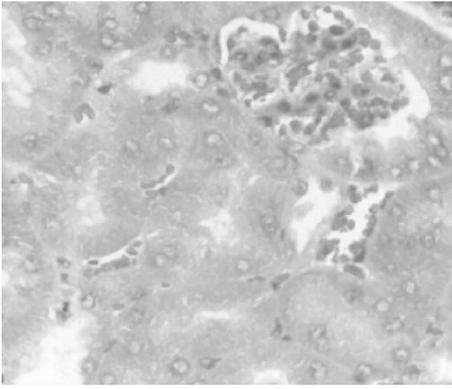


图6 1.00 mg/mL 6-羟基烟碱对肾脏的影响(HE × 40)

3 结论

通过烟碱和6-羟基烟碱的急性毒性试验、慢性毒性试验的对比均表明:1)低剂量的烟碱对小鼠的器官不会造成危害,长期摄入高剂量的烟碱会造成小鼠体内器官的病变;2)6-羟基烟碱相比于烟碱基本上不具有毒性.虽然国内外对烟碱降解机理研究比较清楚,但对代谢产物安全性研究不足,6-羟基烟碱由于其化学结构与烟碱的结构相似,因此相关6-羟基烟碱其他功能特性的研究需要进一步展开.

参考文献:

[1] 冀元棠,朱伟,张磊,等.用水螅再生试验评价香烟烟

雾的致畸性[J].中国公共卫生学报,2002,14(1):432.

- [2] 朱尊权.怎样解决吸烟与健康问题[J].烟草科技,1989(6):2.
- [3] 金闻博,刘春祥.被动吸烟[M].北京:轻工业出版社,1994:15-26.
- [4] 邵国泉,金闻博,戴亚,等.被动吸烟研究的若干进展[J].烟草科技,1996(1):19.
- [5] 黄幸纾,陈星若.环境化学物致突变、致畸、致癌试验方法[M].杭州:浙江科学技术出版社,1985:13-52.
- [6] 施新猷.医用实验动物学[M].西安:陕西科学技术出版社,1989.
- [7] 沈美雯.重型肝炎的预后进展[J].国外医学流行病学传染病分册,1988,15(3):138.
- [8] Dufour D R, Lott J A, Nohe F S, et al. Diagnosis and monitoring of hepatic injury II recommendations for use of laboratory tests in screening diagnosis and monitoring[J]. Clin Chem, 2000, 46(12):2050.
- [9] Lee D H, Ha M H, Christiani D C. Body weight alcohol consumption and liver enzyme activity—A 4-year follow-up study[J]. Int J Epidemiol, 2001, 30(4):766.
- [10] 郑松柏,王建兵,黄宪章,等.血清ALT与AST测定的基质效应评价[J].临床检验杂志,2011,29(5):391.
- [11] 胡适红.高甘油三酯血症和代谢综合征[J].医学综述,2000,6(8):383.
- [12] 张金枝.冠心病的新候选危险因素[J].心血管康复医学杂志,2003,12(S):496.

(上接第19页)

3 结论

采用无水乙醇为提取溶剂,研究超声波辅助萃取黑米中的花色苷工艺及其抗氧化性.结果表明,最优工艺为:提取温度为50℃,乙醇体积分数为35%,料液比为1:4,提取时间为30 min.与无超声波辅助提取相比较,超声波辅助提取黑米花色苷的超声功率为90 W条件下,超声提取时间为4 min,花色苷抗氧化能力最大,证明了超声波辅助提取黑米花色苷是一种有效方法.

参考文献:

- [1] Kong J M, Chia L S, Goh N K, et al. Analysis and biological activities of anthocyanins[J]. Phytochemistry, 2003, 64(5):923.
- [2] Corrales M, Toepfl S, Butz P, et al. Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high

hydrostatic pressure or pulsed electric field: a comparison[J]. Inno Food Sci Emerging Technol, 2008, 9(1):85.

- [3] Virot M, Tomao V, Bourvellec C Le, et al. Towards the industrial production of antioxidants from food processing by-products with ultrasound-assisted extraction[J]. Ultrason Sonochem, 2010, 17(6):1066.
- [4] Sivakumar V, Anna J L, Vijayeeswarri J, et al. Ultrasound assisted enhancement in natural dye extraction from beetroot for industrial applications and natural dyeing of leather[J]. Ultrason Sonochem, 2009, 16(6):782.
- [5] 章银良.食品与生物试验设计与数据分析[M].北京:中国轻工业出版社,2010.
- [6] Yen G C, Hsieh P P. Antioxidative activity and scavenging effects on active oxygen of xylose-lysine Maillard reaction products[J]. J Sci Food Agric, 1995, 67(3):415.
- [7] Yen G C, Duh P D. Antioxidant properties of methanolic extracts from peanut hulls [J]. J of the American Oil Chemists' Society, 1993, 70(4):383.