

烟草特有亚硝胺 NNK 与肺癌的关系

张同梅 赖百塘

肺癌是一种常见的恶性肿瘤,其发病率和死亡率在发达国家和我国的大中城市已占恶性肿瘤的首位。流行病学调查显示,人类大约 1/3 的癌症与吸烟相关,其中吸烟与肺癌的关系极为密切。在美国男性肺癌的 90%、女性肺癌的 75%~80% 均由吸烟所致。全世界约有十亿人吸烟,其中 1/3 在中国^[1,2],从流行病学角度来看,未来几十年我国肺癌及其与烟草有关疾病的发生将十分严峻。WHO 估计到 2020 年末或 2030 年的早期,在世界范围内由吸烟所致的死亡人数将达到每年 1000 万人^[3]。现已证明,在烟雾中大约有 4000 多种化合物,其中 55 种被国际癌症研究理事会确定为致癌物。

烟草中致肺癌因子主要有三环芳香族碳水化合物 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAH)、Asz-芳烃、亚硝胺类、各种有机化合物和无机化合物^[4,5]。经过大量的研究和积累,最后统一把烟碱来源的亚硝胺称为烟草特有亚硝胺 (tobacco-specific N-nitrosamines, TSNA)。PAH 和 TSNA 在烟草所致肺癌中起着非常重要的作用,其中 4-甲基亚硝胺基-1-(3-吡啶)-1-丁酮 [4-methylnitrosamino-1-(3-pyridyl)-1-butanone, NNK] 及其尿中的代谢产物 4-甲基亚硝胺基-1-(3-吡啶)-1-丁醇 [4-methylnitrosamino-1-(3-pyridyl)-1-butanol, NNAL] 具有特异的致肺癌性,本文主要综述 NNK 及其代谢产物 NNAL 在致肺癌方面的特性及其预防进展。

一、NNK 和 NNAL 的致癌性

NNK 是尼古丁亚硝基化或微量烟碱亚硝基化形成的,它仅发现于烟草产品中或可能存在于含尼古丁的其他产品中,从未在饮食或普通无烟雾污染的环境中发现,其简写 NNK 是为了强调它与尼古丁的关系,即指尼古丁来源的亚硝胺基酮,其来源和代谢途径参见文献^[4]。

Hecht 等通过大量实验研究了烟草特有亚硝胺与动物癌症的关系,发现不同动物(小鼠、大鼠、仓鼠、貂及猿类等)不同的给药途径(包括静脉、灌注、皮肤接触、腹腔注射及面颊涂拭等)均能导致实验动物癌症的发生,其中多数动物均能发生肺腺癌或肺腺鳞癌^[4,6]。2003 年 Zhou 等^[7]报道,用 100 mg/ml 或 400 mg/ml 的 NNK 处理永生化人类支气管上皮细胞 7 天后均可见此类细胞发生恶性转化,这充分说明了 NNK 能诱导支气管上皮细胞的恶性转化。

有资料表明,吸烟者每天吸入 NNK 的量约为 28 nmol,40 年内吸入 NNK 的量约为 85 mg (1.1 mg/kg)^[4],这些数据

与 NNK 在鼠体内的最小致肺癌量 1.8 mg/kg 相当。因为 NNK 仅存在于烟草产品中,所以尿中 NNAL 及其氧化葡萄糖产物 NNAL-Gluc 是人们暴露于烟草致癌物 NNK 特有的生物标记物,是检测吸烟者和环境烟雾 (environmental tobacco smoke, ETS) 暴露者代谢解毒 NNK 最有用的生物标记物。

1. NNK 和 NNAL 在体内的代谢: NNK 在体内的半衰期极短,很快代谢转化为 NNAL、NNAL-Gluc 和其他产物。NNK 在动物体内主要有三条代谢途径: 碳基还原反应、吡啶氮氧化反应和 α -羟化反应。这些反应是在细胞色素 P450 酶类和谷胱甘肽转硫酶 (GSTS) 的调控下完成的^[8]。NNAL 在体内进一步代谢为 NNAL-Gluc, 国外学者普遍认为 NNAL-Gluc 可能是 NNK 在体内的解毒产物。研究发现 NNAL 有一手性中心,有两种对映体 (R)-NNAL 和 (S)-NNAL, 其中 (S)-NNAL 比 (R)-NNAL 的致癌性更大。两种对映体在动物和人体内所占比例不同, (S)-NNAL 所占的比例大于 (R)-NNAL。2002 年, Hecht 等^[9] 研究发现, 在人肺脏内可能有 (S)-NNAL 的受体, 此受体可特异性结合 (S)-NNAL, 这就在理论上增加了 NNAL 特异致肺癌的能力。

还原反应和羟化反应是人体代谢 NNK 的两条重要途径, 这两条途径活跃程度的不同决定着个体患肺癌敏感性的不同。在大量的吸烟者中, 仅有极少数吸烟者 (<20%) 最终发展为肺癌, 表明个体内有对肺癌敏感的基因。Finckh 等^[10] 研究显示, NNK 碳基还原酶在不同的个体, 其表达和活性不同。这种不同可能是决定个体对 NNK 解毒能力不同的重要因素, 与个体患烟草有关肺癌的敏感性相关。

2. NNK 和 NNAL 在体内的加合物:

(1) DNA 加合物: 通过 α -羟化反应形成 DNA 加合物, 主要形成甲基加合物和吡啶氧化丁基加合物, 甲基加合物主要有 7-mG、3-mA、O⁶-mG 三种形式, 吡啶氧化加合物不但是致癌性的加合物, 而且还能阻止甲基化的修复^[11]。加合物的形成主要在 NNK 致癌的靶组织肺、鼻黏膜和肝等。

(2) 血红蛋白加合物: NNK 和 NNAL 在体内也可与血红蛋白结合, 形成血红蛋白加合物。认为血红蛋白加合物作为代谢活性的生物标记物比 DNA 加合物更有意义, 是因为血红蛋白的数量相对容易获得, 红细胞在人体内缺少修复能力和有相对长的寿命 (120 天), 允许加合物在体内聚积, 使得血红蛋白加合物更容易测定。

(3) 其他类型的 DNA 损伤: 在 NNK 诱导的其他 DNA 损伤中, 最常见的是 DNA 的单链断裂 (single-strand break,

SSB)。SSB 可能是通过加合物(如 7-mG 和 3-甲基腺嘌呤)自动降解或酶解而产生的,此过程最终导致 DNA 甲基化途径。

3. NNK 诱导的肺癌基因突变:在 NNK 诱导的动物肺癌中均发现了基因的突变,在 NNK 诱导的小鼠肺癌中发现有 Kras 基因的 12 位密码子 GGT→GAT 的转变^[4]。在人的肺腺癌中 Kras 基因 12 位密码子的突变约 24%~50%,而在其他类型的肺癌中这种突变很少见^[12,13]。这种突变在吸烟者和被动吸烟者比在不吸烟者中更常见。最常见的突变为:GGT→TGT(60%),其次为 GGT→GAT(20%)和 GGT→GTT(15%)。

二、NNAL-Gluc/NNAL 作为 NNK 生物标记物的意义

Hecht 等在吸烟者、被动吸烟者、母亲吸烟的新生儿尿中测到了 NNAL 和 NNAL-Gluc,而在不吸烟者的尿中未检测到 NNK 的代谢产物 NNAL 和 NNAL-Gluc 或检测到少量,这种量的差异有统计学意义^[14-17]。

不同的个体其尿中 NNAL-Gluc/NNAL 的比值差异很大,分两个等级:0~6 和 6~11,其中 80% 的吸烟者此比值在 0~6 之间,但此比值在个体内较恒定^[18]。在美国,黑人肺癌的发病率和死亡率远远大于白人,Richie 等^[19]报告黑人吸烟者尿中 NNAL-Gluc/NNAL 的比值显著小于白人,多在 0~6 之间,且此差异有统计学意义。因此,他们预测此比值可能与患肺癌的敏感性和预后有关,此比值高,说明患者对 NNK 的解毒能力强,NNK 在此类患者体内多代谢为其解毒产物 NNAL-Gluc。

Hecht 等^[20]在 1999 年报告,吸烟者戒烟 1 周后,仍可测到吸烟时 34.5% 的 NNAL 和 NNAL-Gluc,戒烟 6 周后,在吸烟者体内仍有吸烟时 7.6% 的 NNAL 和 NNAL-Gluc,甚至个别吸烟者戒烟 281 天后,仍能在体内检测到 NNAL 和 NNAL-Gluc。这说明体内有组织对 NNAL 和 NNAL-Gluc 有高度的亲和性,使得它们在戒烟后仍在体内滞留,缓慢从组织释放。虽然在戒烟者体内仍可测到 NNAL 和 NNAL-Gluc,但戒烟者暴露致癌物的总量已显著减少,也就是说戒烟后,机体逐渐排出致癌物,降低了危险性。

Hecht 等^[9]报道,NNAL 和 NNAL-Gluc 在吸烟者血浆中的半衰期要比尿中短,戒烟 1 周后,吸烟者血中测不到 NNAL 和 NNAL-Gluc,但尿中仍可测到,说明 NNAL、NNAL-Gluc 是低清除率的物质。NNAL 的肾脏清除率显著低于肾小球的滤过率表明肾小管对其有大量的重吸收,这种重吸收在理论上增加了它们的致癌性,可能是 NNAL 在体内缓慢释放的另一个原因。

NNAL 和 NNAL-Gluc 作为 NNK 的生物标记物有下列优势:NNAL-Gluc/NNAL 是 NNK 在体内特有的代谢产物,而 NNK 在体内的半衰期短,很快代谢为 NNAL 和 NNAL-Gluc,所以只能通过 NNAL-Gluc/NNAL 致癌的机制来了解 NNK 的致癌作用机理;吸烟者尿中 NNAL 和 NNAL-Gluc 的总量大小与吸烟者吸烟量的大小成正比,通过测定它们,可了解吸烟者暴露致癌物的剂量和患肺癌危险性的量化信息;

24 h 尿量多,能获得足够量的致癌物,同时尿样的收集相对比较容易,受试者容易依从合作;NNAL-Gluc/NNAL 的比值在个体内较稳定,而在个体间和种间差异很大,这种差异可能是了解 NNK 致癌机制的一个突破点。把 NNAL 和 NNAL-Gluc 作为 NNK 吸入和代谢解毒程度的生物标记物惟一的缺陷在于尿本身是一过性的,吸烟者尿中此两物质的水平可能不稳定,但是由于吸烟者大多均为长期吸烟,能弥补此缺陷。

三、烟草有关肺癌的预防

流行病学的调查显示,吸烟者戒烟后患肺癌的危险性逐渐降低,并且随着戒烟年限的增加危险性逐年降低。故由吸烟导致的肺癌,戒烟是最好最有效的办法。但对于 10 亿烟民这支庞大的队伍,要求他们完全戒烟是不可能的,所以对于这些无法戒烟的烟民来说,在患肺癌之前的早期预防和早期诊断就显得尤为重要。目前研究最多的是用化学预防的方法来阻断烟草特异性亚硝胺的致癌性,在实验动物中取得了显著的成绩。

苯己基异硫氰酸盐(PEITC)是十字花科蔬菜的一种成分,能有效降低 NNK 的致癌性。现已发现在 A/J 小鼠体内 PEITC 是 NNK 诱导肺癌的最强的阻断剂,甚至 0.04~0.1 μl 的 PEITC 就能阻断单剂量 10 μmol NNK 诱发的肺肿瘤^[4]。PEITC 阻断肺肿瘤的能力取决于它与谷胱甘肽的亲脂力和反应力,高亲脂力与阻断活性相关,然而高反应力则降低阻断能力。在人类,PEITC 可以抑制 NNK 的氧化代谢,减少了 NNK 与 DNA 和血红蛋白加合物的形成,增加了 NNAL、NNAL-Gluc 从尿中的排泄。

PEITC 在 F-344 鼠和 A/J 鼠内能抑制 NNK 诱导肺肿瘤,而异硫氰酸苯甲酯(BITC)在 A/J 鼠能抑制苯并芘(BaP)诱导的肺肿瘤,非毒性剂量的 PEITC 和 BITC 能有效抑制 NNK 和苯并芘(BaP)在鼠体内的代谢活化和其致癌性。如果联合 PEITC 和 BITC,能在人体内抑制 NNK 和 B(a)P 诱导的肺肿瘤,将会为吸烟导致肺癌的预防带来新的防治措施。

吡啶-3-甲醇(13C)也是人类食物中的一种成分,它是一些十字花科蔬菜中以结合形式存在,它主要通过增加肝脏清除 NNK 的能力来阻断 NNK 诱导的实验鼠的肺肿瘤,同样能增加吸烟者肝脏代谢 NNK 的能力和尿排泄 NNAL 和 NNAL-Gluc 的能力。还有研究提示一些药物如维生素 C、维生素 E、阿司匹林及黄绿色蔬菜水果等均能减少和预防动物肺肿瘤的发生^[4]。维生素 E 是通过调节多胺的代谢,而阿司匹林是通过抑制环氧酯酶的活性来实现其抑制 NNK 的致癌性的。

四、前景与展望

由于肺癌是一种多因素疾病,它与遗传、环境及生活行为方式等密切相关,而且它还是一种慢性疾病,是多种因素和自身机制紊乱的结果,其病理过程相当复杂。我们单从某一方面着手都无法掌握肺癌发生的全过程,这就需要我们综

合多方面的资料,从不同的角度来预防肺癌的发生。在分子生物学技术飞速发展的今天,通过测定 NNAL-Gluc/NNAL 可在高危人群中筛选出对肺癌高敏感的个体,结合螺旋 CT、分子生物学手段的检查,可望在部分病例中作到早期发现和早期诊断,为肺癌的二级预防打下基础。NNAL/NNAL-Gluc 的比值与患肺癌的危险性和预后密切相关,作为早期诊断和预防肺癌的生物标记物,临床应用中,结合此比值可估计患者的预后。

流行病学资料表明,由吸烟导致肺癌的人数随着烟草销售量的增加而增长,所以我们进一步理解吸烟导致肺癌的机制对今后预防与吸烟有关肺癌的发生有十分重要的作用。检测人类尿中烟草特异性致肺癌因子的代谢产物是了解烟草导致肺癌机制最有用的途径。其中 NNAL 和 NNAL-Gluc 是这些代谢物中最有价值的,它们是烟草特有亚硝胺 NNK 特有的代谢产物,它们的测定对于吸烟者和被动吸烟者具有高度的敏感性和特异性,这些致癌物的尿代谢产物对我们今后防治烟草有关肺癌至关重要。

参 考 文 献

- 1 Wald NJ, Hackshaw AK. Cigarette smoking: an epidemiological overview. *Br Med Bull*, 1996, 52:3-11.
- 2 Peto R, Lopez AD, Boreham J, et al. Mortality from smoking worldwide. *Br Med Bull*, 1996, 52:12-21.
- 3 World Health Organization. The tobacco epidemic: a global public health emergency. *Tobacco Alert*. April 1998. <http://www.who.int/archives/tobalert/apr96/fulltext.htm>
- 4 Hecht SS. Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific N-Nitrosamines. *Chem Res Toxicol*, 1998, 11:559-603.
- 5 赖百塘. 烟草特有亚硝胺类中特异性致肺癌因子研究进展. *结核病与胸部肿瘤*, 2000, 4:225-233.
- 6 Hoffmann D, Brunnemann KD, Prokopczyk B, et al. Tobacco-specific N-nitrosamines and areca-derived N-nitrosamines: chemistry, biochemistry, carcinogenicity, and relevance to humans. *J Toxicol Health*, 1994, 41:1-52.
- 7 Zhou H, Calaf GM, Hei TK. Malignant transformation of human bronchial epithelial cells with the tobacco-specific nitrosamine, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Int J Cancer*, 2003, 106:821-826.
- 8 Carmella SG, Borukhova A, Akerkar SA, et al. Analysis of human urine for pyridine-N-oxide metabolites of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, a tobacco-specific lung carcinogen. *Cancer*

- Epidem Biomar Prev*, 1997, 6:113-120.
- 9 Hecht SS, Carmella SG, Ye M, et al. Quantitation of metabolites of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone after cessation of smokeless tobacco use. *Cancer Res*, 2002, 62:129-134.
- 10 Finckh C, Atalla A, Nagel G, et al. Expression and NNK reducing activities of carbonyl reductase and 11beta-hydroxy steroid dehydrogenase type 1 in human lung. *Chem Biol Interact*, 2001, 130-132(1-3):761-773.
- 11 Westra WH, Baas IO, Hruban RH, et al. K-ras oncogene activation in atypical alveolar hyperplasias of the human lung. *Cancer Res*, 1996, 56:2224-2228.
- 12 Hechet SS. DNA adduct formation from tobacco-specific N-nitrosamines. *Mutat Res*, 1999, 24:127-142.
- 13 Mills XE, Fishman CL, Rom WN, et al. Increased prevalence of k-ras oncogene mutations in lung adenocarcinoma. *Cancer Res*, 1995, 55:1444-1447.
- 14 Carmella SG, Akerkar S, Hecht SS. Metabolites of the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in smokers' urine. *Cancer Res*, 1993, 53:721-724.
- 15 Hecht SS, Carmella SG, Murphy SE, et al. A tobacco-specific lung carcinogen in the urine of men exposed to cigarette smoke. *New Eng J Med*, 1993, 329:1543-1546.
- 16 Willam DP, Carmella SG, Akerkar S, et al. A metabolite of the tobacco-specific lung carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in the urine of hospital workers exposed to environmental tobacco smoke. *Cancer Epidem Biomar Prev*, 1998, 7:257-260.
- 17 Milunsky A, Carmella SG, Ye M, et al. A tobacco-specific carcinogen in the fetus. *Prenat Diagn*, 2000, 20:307-310.
- 18 Carmella SG, Akerkar SA, Richie JP, et al. Intraindividual and interindividual difference in metabolites of the tobacco-specific lung carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone(NNK) in smokers' urine. *Cancer Epidem Biomar Prev*, 1995, 4:635-642.
- 19 Richie JP, Carmella SG, Muscat JE. Difference in the urinary metabolites of the tobacco-specific lung carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in black and white smokers. *Cancer Epidem Biomar Prev*, 1997, 6:783-790.
- 20 Hecht SS, Carmella SG, Chen M, et al. Quantitation of urinary metabolites of a tobacco-specific lung carcinogen after smoking cessation. *Cancer Res*, 1999, 59:590-596.

(收稿日期:2003-10-28)

(本文编辑:尹廉)