DOI:10.12441/spyswjs.20230313005 [文章编号] 1673-1689(2024)12-0110-09

打叶复烤烟叶逸出物的成分分析及VC对其诱导的EA.hy926细胞损伤的保护作用

李伟雪 顾丽莉* 姚 雯 杨发容 刘 洋

(昆明理工大学化学工程学院,云南 昆明 650500)

摘要:【目的】探索打叶复烤烟叶逸出物的成分及其对人血管内皮(EA.hy926)细胞损伤的影响。**【方法】**用打叶复烤烟叶逸出物建立EA.hy926细胞毒性损伤模型,经VC预处理后,采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法评估EA.hy926细胞存活率,并检测EA.hy926细胞内活性氧(ROS)相对含量。**【结果】**打叶复烤烟叶逸出物刺激24 h可造成明显的细胞损伤,成功建立血管内皮细胞毒性损伤模型,VC预处理可以明显逆转上述变化。**【结论】**VC对打叶复烤烟叶逸出物诱导的EA.hy926细胞毒性损伤有明显的保护作用,其作用机制与降低细胞内活性氧水平相关。

关键词:复烤烟叶逸出物;气相色谱-质谱联用;活性氧;维生素C

Components in Exudates from Threshing and Redrying Tobacco Leaves and Protective Effect of VC on EA.hy926 Cell Damage Induced by the Exudates

LI Weixue GU Lili YAO Wen YANG Farong LIU Yang*

(Faculty of Chemical Engineering, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

Abstract: [**Objective**] This study aimed to explore the components in the exudates from threshing and redrying tobacco leaves and their effects on human vascular endothelial (EA.hy926) cell damage. [**Method**] The EA.hy926 cell model of cytotoxic damage was established with the exudates from threshing and redrying tobacco leaves. After pretreatment with VC, the methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method was employed to evaluate the viability of EA.hy926 cells, and the relative content of reactive oxygen species (ROS) in EA.hy926 cells was determined. [**Result**] Obvious cell damage was observed after 24 h of stimulation with the exudates from threshing and redrying tobacco leaves, which indicated the cell model of cytotoxic damage was successfully established. VC pretreatment significantly reversed the above changes. [**Conclusion**] VC exerts obvious protective effect on the cytotoxic damage of EA.hy926 cells that is induced by the exudates from threshing and redrying tobacco leaves by reducing the ROS level.

Keywords: exudates from threshing and redrying tobacco leaves; GC-MS; reactive oxygen species; vitamin C

打叶复烤是卷烟工业中的重要环节,是将烟叶从农业产品转变为工业原料的重要加工过程[1],该过程导致烟叶内在的化学物质和致香成分发生变化[2]。瞿永生等[3]对打叶复烤烟叶逸出物进行捕集和检测,发现其中含有苯甲醇、苯乙醇、苯甲醛、糠醛、2,3-丁二酮、蒎烯等香味成分。直接将打叶复烤烟叶逸出物排入大气中不仅会导致环境污染,同时会造成其中挥发性致香成分的浪费。因此,将打叶复烤烟叶逸出物进行捕集和回收可实现该副产物的资源化利用,但其中的挥

基金项目:云南省烟草公司科技计划项目(2018530000242025)。

通信作者:顾丽莉(1963—),女,博士,教授,硕士研究生导师,主要从事化学工程研究。E-mail:liligu001@163.com

收稿日期:2023-03-13 **修回日期:**2023-05-16

发性碳氢化合物和苯系物等均具有细胞毒性[4]。

VC是人体必需的微量元素之一，具有增强骨骼肌功能、防治坏血病、提高人体免疫力、预防心脏病、预防神经系统病变、预防癌症等生理功能[5-9]。VC主要参与生命体内的物质代谢和氧化还原反应，可降低ROS水平和提高抗氧化酶的活性[10-11]。作者以EA.hy926细胞为研究对象，考察打叶复烤烟叶逸出物对EA.hy926细胞的毒性作用和VC对打叶复烤烟叶逸出物诱导的EA.hy926细胞损伤的保护作用。通过检测打叶复烤烟叶逸出物染毒前后及VC干预前后EA.hy926细胞ROS相对含量的变化，探讨打叶复烤烟叶逸出物对人血管内皮细胞的毒性作用机制以及VC对该种毒性损伤是否具有保护作用。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

EA.hy926细胞：昆明动物研究所；样品1：云南宣威中部烟叶的打叶复烤烟叶逸出物；样品2：云南普洱、曲靖、红河、楚雄中部烟叶的打叶复烤烟叶逸出物。

乙醇、二甲基亚砜（DMSO）：天津市致远化学试剂有限公司；MTT、2’,7’-二氯荧光黄双乙酸盐（DCFH-DA）：美国Sigma-Aldrich公司；VC：西陇化工股份有限公司；高糖DMEM培养基、胎牛血清（FBS）、磷酸盐缓冲液（PBS）：美国康宁公司；胰蛋白酶：上海碧云天生物技术有限公司。

1.2　仪器与设备

冻干机：Lab-1C-50E型，北京博医康实验仪器有限公司；电子分析天平：BSA224S型，赛多利斯科学仪器（北京）有限公司；细胞CO_2培养箱：MCO-170ML-PC型，昆明倍捷科技有限公司；生物安全柜：AC2-6S1AlrstreamA2型，新加坡ESCO公司；全波长酶标仪：SpectraMax M5型，美国加州森尼维耳市生物仪器有限公司；Countstar细胞计数仪：IC1000型，美国Countstar公司；流式细胞仪：Guava easyCyte 6-2L型，美国Millipore公司；微量台式高速离心机：H1650-W型，湖南湘仪实验室仪器开发有限公司；气相色谱-质谱联用仪（GC-MS）：Agilent 7890B-5977A型，上海安捷伦科技有限公司。

1.3　试验方法

1.3.1　打叶复烤烟叶逸出物样品的制备

根据作者所在课题组之前的研究[12]获得打叶复烤烟叶逸出物的浓缩液，将浓缩液冷冻干燥48 h后得到两种样品（样品1和样品2），密封后于4 ℃条件下储存备用。

1.3.2　打叶复烤烟叶逸出物的成分检测

GC-MS分析条件：色谱柱为HP-5MS（30 m×0.25 mm×0.25 μm），进样口温度260 ℃。升温程序：柱温80 ℃，保持1 min；以6 ℃/min升温至200 ℃，保持3 min；最后以10 ℃/min升温至280 ℃，保持5 min。载气为氦气，流量为1.0 mL/min，采用不分流的进样方式，进样体积0.2 μL。

以EI源为离子源，离子源温度230 ℃，四极杆温度150 ℃，电离能70 eV，全离子扫描检测m/z为50~550，溶剂延迟时间为3 min。

1.3.3　细胞培养

在DMEM培养基中加入双抗和体积分数10%的FBS，用于培养EA.hy926细胞，当细胞的贴壁密度为70%~80%时，用含有质量分数0.25%的EDTA的胰酶轻轻吹打消化，随后传代至培养皿中进行试验。

1.3.4　MTT法测定打叶复烤烟叶逸出物对细胞存活率的影响

将EA.hy926细胞以6×10^4个/mL接种于96孔板，每孔200 μL。接种24 h后，弃去培养基，分别加入含不同质量浓度（25、50、100、150、200、250 μg/mL）的两种打叶复烤烟叶逸出物样品的培养基，培养24 h，每孔加入200 μL质量浓度0.5 mg/mL的MTT，避光培养4 h，弃去96孔板中的液体，每孔加200 μL的DMSO，在微型振荡器上振荡10 min，用酶标仪于570 nm下检测吸光度，每组设置6孔平行，按照公式（1）计算细胞存活率。

$$P=(A_1/A_0)\times100\% \quad (1)$$

式中：

P——细胞存活率，%；

A_1——样品组的吸光度；

A_0——空白组的吸光度。

1.3.5　MTT法测定VC对细胞的毒性作用

将EA.hy926细胞以6×10^4个/mL接种于96孔板，每孔200 μL。接种24 h后，弃去培养基，加入含不同浓度（20、40、60、80、100、120 μmol/L）的VC培

养 24 h 后，每孔加入 200 μL 质量浓度为 0.5 mg/mL 的 MTT，避光培养 4 h，弃去 96 孔板中的液体，每孔加 200 μL 的 DMSO，在微型振荡器上振荡 10 min，用酶标仪于 570 nm 下检测吸光度，每组设置 6 孔平行，计算细胞存活率。

1.3.6 VC 预处理对打叶复烤烟叶逸出物诱导的 EA.hy926 细胞的 ROS 相对含量的影响

将 EA.hy926 细胞以 1×10^5 个/mL 接种于 6 孔板，每孔 2 mL。接种 24 h 后，用含 VC 的培养基预处理 24 h，然后吸出培养基，再加入含样品的培养基，样品处理的剂量为半抑制质量浓度（IC_{50}）。分为 11 组：空白组、样品 1 组（样品 1 的 IC_{50} 为 239 μg/mL）、样品 2 组（样品 2 的 IC_{50} 为 185 μg/mL）、VC（40 μmol/L）+ 样品 1 组、VC（60 μmol/L）+样品 1 组、VC（80 μmol/L）+样品 1 组、VC（100 μmol/L）+样品 1 组；VC（40 μmol/L）+样品 2 组、VC（60 μmol/L）+样品 2 组、VC（80 μmol/L）+样品 2 组、VC（100 μmol/L）+样品 2 组。分组给药后，在 37 ℃细胞培养箱中培养 24 h，弃去 6 孔板中的液体，用 PBS 清洗 3 次，每孔加入 1 mL 的 DCFH-DA 荧光探针（10 μmol/L），在 37 ℃细胞培养箱中避光染色 30 min，加入 PBS 清洗 3 次，最后采用流式细胞仪检测每组的荧光信号，计算细胞内 ROS 的相对含量。

1.4 统计学处理

运用 Origin 2018 和 SPSS 15.0 软件处理分析数据，以均值±标准差表示，多组间比较采用单因素方差分析，两组间比较采用 *t* 检验。

2 结果与讨论

2.1 打叶复烤烟叶逸出物的成分分析

采用 GC-MS 对打叶复烤烟叶逸出物中沸点较低的挥发性成分进行检测，并通过质谱数据库检索各个组分的 CAS 编码，根据 CAS 编码查询各组分名称[13]，采用峰面积归一化法估算各组分的相对含量，2 种打叶复烤烟叶逸出物的组成成分见表 1~2。

打叶复烤烟叶逸出物样品 1 共含有 55 种物质，其中主要有烟碱（49.62%）、新植二烯（11.79%）、3,4,4*α*,5,6,7-六氢-4*α*,5-二甲基-3-（1-甲基乙烯基）-1（2H）-萘酮（7.56%）、（2*E*,6*E*,11*Z*）-3,7,13-三甲基-10-（2-丙基）-2,6,11-环十四碳三烯-1,13-二醇（6.08%）、2,2'-（1,2-乙二基）双[6,6]-二甲基-二环[3.1.1]庚-2-烯（4.20%）、烟酸（4.00%）、7-（5-己炔基）-三环[4.2.20（2,5）]癸-7-烯（4.00%）、异瑟模环烯醇（3.69%）、4-羟基-*β*-二氢大马酮（3.56%）、2,3'-联吡啶（3.16%）、可替宁（3.12%）等。打叶复烤烟叶逸出物样品 2 共含有 45 种物质，其中主要有烟碱（54.48%）、可替宁（14.09%）、N-甲基异烟酰胺（9.30%）、新植二烯（8.56%）、烟呋喃糖（7.42%）、己内酰胺（6.67%）、苯甲醇（5.76%）、2,3'-联吡啶（4.68%）等。打叶复烤烟叶逸出物中含有的烟碱、可替宁和 2,3'-联吡啶等均易造成细胞损伤；4-羟基-*β*-二氢大马酮、巨豆三烯酮等酮类物质和苯甲酸、正十六烷酸等酸类物质是重要的致香成分[14-15]；新植二烯作为烟草中重要的烃类化合物，能够醇和烟气、柔和烟香，对烟叶质量和香气风格具有重要影响[16-17]。

表 1 打叶复烤烟叶逸出物样品 1 的组成成分

Table 1 Components in sample 1 of the exudates from threshing and redrying tobacco leaves

序号	化合物	保留时间/min	匹配度	相对含量/%
1	硅酸四乙酯	3.611	76.71	0.14
2	苯甲醇	4.779	93.44	2.33
3	2-乙酰基吡咯	5.332	85.94	1.29
4	对异丙基苯胺	5.717	70.96	0.26
5	3-乙酰基吡啶	6.165	83.69	0.88
6	苯乙醇	6.255	85.29	2.36
7	反式-4*α*-甲基-癸二氢萘	7.241	73.23	0.13
8	烟酸乙酯	8.334	81.11	0.36
9	3-乙基-4-甲基吡咯-2,5-二酮	9.261	83.28	1.28
10	烟酸	9.565	82.45	4.00
11	苯甲酸	9.798	82.84	1.42

续表

序号	化合物	保留时间/min	匹配度	相对含量/%
12	乙磺酰亚胺	10.036	70.32	0.42
13	己内酰胺	10.543	77.93	0.79
14	对薄荷烷-1,8-二醇	10.913	72.20	0.29
15	壬酸	10.966	70.41	0.62
16	3-苯甲酰氨基-4-甲基三氟化苯	10.988	70.70	0.17
17	苯醋酸	11.040	84.89	2.00
18	烟呋喃糖	11.379	77.11	2.01
19	烟碱	11.969	78.24	49.62
20	3-[2-(二甲基氨基)乙烯基]-2-吡啶甲腈	13.795	70.38	0.84
21	3-甲基-1-苯基吡唑	14.372	81.50	2.23
22	2-乙基苯并[b]噻吩	15.404	73.21	0.48
23	二氢猕猴桃内酯	15.466	87.81	2.22
24	2,3'-联吡啶	15.672	92.62	3.16
25	9-乙酰基-9-氮杂-1-甲基双环[3.3.1]壬-3-酮	16.162	72.04	0.46
26	巨豆三烯酮	16.309	88.59	1.83
27	4-羟基-β-二氢大马酮	17.117	81.54	3.56
28	2-呋喃基-[4-(3-硝基-苯磺酰基)-1-哌嗪基]-甲酮	17.196	70.10	0.22
29	(3*S*,5*R*,8*S*,7*Z*,9ζ)-5,6-环氧-7-巨豆烯-3,9-二醇	18.392	73.01	0.70
30	4-(3-羟基丁基)-3,5,5-三甲基-2-环己烯-1-酮	18.996	82.42	1.98
31	可替宁	19.285	83.24	3.12
32	2-羟基-5-(1-甲基乙基)-2,4,6-环庚三烯-1-酮	20.280	77.10	0.71
33	3,4,4α,5,6,7-六氢-4α,5-二甲基-3-(1-甲基乙烯基)-1(2H)-萘酮	20.742	73.37	7.56
34	新植二烯	21.281	83.96	11.79
35	植酮	21.326	73.62	0.37
36	异喇叭烯	21.346	73.13	1.83
37	邻苯二甲酸庚-4-基异丁基酯	21.676	82.19	0.28
38	丁二酸二(香叶基)酯	22.709	70.53	0.17
39	十六烷酸甲酯	23.025	76.29	0.38
40	3,5,11,15-四甲基1-十六烷-3-醇	23.544	71.02	0.42
41	7-(5-己炔基)-三环[4.2.20(2,5)]癸-7-烯	23.754	76.82	4.00
42	邻苯二甲酸丁酯	23.805	82.83	0.57
43	3-(4,8,12-三甲基十三烷基)呋喃	24.044	80.42	1.80
44	正十六烷酸	24.294	78.32	1.51
45	十六烷酸乙酯	24.687	75.19	0.30
46	乙基二甲基硼酸	26.052	73.68	1.16
47	(1*S*,2*E*,4*S*,5*R*,7*E*,11*E*)-十六烷-2,7,11-三烯-4,5-二醇	26.311	74.43	1.60
48	(2*E*,6*E*,11*Z*)-3,7,13-三甲基-10-(2-丙基)-2,6,11-环十四碳三烯-1,13-二醇	26.446	76.82	6.08
49	2,2'-(1,2-乙二基)双[6,6]-二甲基-二环[3.1.1]庚-2-烯	26.594	81.45	4.20
50	异瑟模环烯醇	26.944	72.58	3.69
51	1,1,6-三甲基-3-亚甲基-2-(3,6,9,13-四甲基-6-乙烯-10,14-二亚甲基-五癸-4-烯基)环己烷	28.911	71.73	0.97
52	(*Z*)-13十八烯醛	30.432	72.57	0.47
53	己二酸二辛酯	30.750	83.04	0.22
54	邻苯二甲酸二(2-丙基戊基)酯	32.297	89.59	1.21
55	对苯二甲酸二辛酯	34.826	71.18	0.23

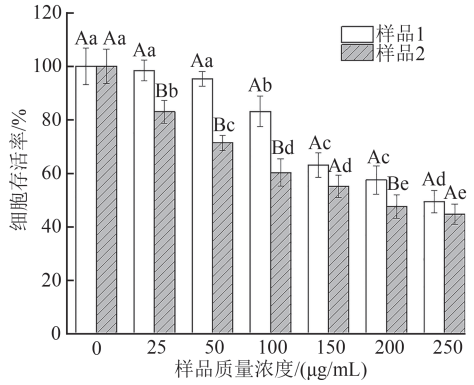
表 2　打叶复烤烟叶逸出物样品 2 的组成成分

Table 2　Components in sample 2 of the exudates from threshing and redrying tobacco leaves

序号	化合物	保留时间/min	匹配度	相对含量/%
1	硅酸四乙酯	3.633	79.96	0.18
2	苯甲醇	4.851	85.55	5.76
3	2-乙酰基吡咯	5.414	72.64	1.26
4	3-乙酰基吡啶	6.233	79.29	2.46
5	苯乙醇	6.700	86.85	1.47
6	对甲苯酚	7.007	75.76	0.45
7	琥珀酰亚胺	8.153	87.5	0.40
8	3-乙基-4-甲基-吡咯-2,5-二酮	10.069	81.67	2.73
9	己内酰胺	10.284	82.64	6.67
10	乙琥胺	10.707	70.95	0.99
11	苯甲酸	10.808	89.08	1.71
12	烟呋喃糖	11.734	80.60	7.42
13	烟碱	12.202	88.41	54.48
14	(*E*)-5-异丙基-8-羟基-8-甲基-壬-6-烯-2-酮	13.399	80.83	0.58
15	N-甲基异烟酰胺	14.179	86.17	9.30
16	4-甲基-反式-5-苯基-2-(4-氰基苯基)-1,3-恶唑烷	14.312	84.55	1.04
17	5,6,7,7*α*-四氢-4,4,7*α*-三甲基-2(4H)-苯并呋喃酮	15.429	88.17	3.22
18	2,3'-联吡啶	15.534	91.99	4.68
19	3,4-二氢-4,4,6-三甲基-2H-1-苯并吡喃-2-酮	16.282	74.80	0.39
20	呋喃-2-基-[4-(3-硝基-苯磺酰基)-哌嗪-1-基]-甲酮	16.444	70.50	1.53
21	4-羟基-*β*-二氢大马酮	17.027	82.51	3.44
22	巨豆三烯酮	17.234	84.57	0.35
23	9-羟基-4,7-巨豆二烯-3-酮	17.724	72.03	1.20
24	1-十六烷醇	19.278	75.38	0.42
25	2-羟基-5-(1-甲基乙基)-2,4,6-环庚三烯-1-酮	20.202	79.32	0.41
26	可替宁	20.563	76.36	14.09
27	吉马酮	20.716	75.09	1.11
28	新植二烯	21.202	84.62	8.56
29	邻苯二甲酸异丁酯	21.659	74.44	0.26
30	10,13-二甲基十四烷酸甲酯	23.011	73.40	0.17
31	邻苯二甲酸-6-乙基-3-辛基丁酯	23.772	83.57	0.50
32	3-(4,8,12-三甲基十三烷基)呋喃	24.010	78.89	0.68
33	地乐胺	25.031	71.02	0.17
34	4-甲基-1-(1,2,2-三甲基环戊基)环己-3-烯醇	26.005	74.08	0.65
35	(2*E*,6*E*,11*Z*)-3,7,13-三甲基-10-(2-丙基)-2,6,11-环十四碳三烯-1,13-二醇	26.159	76.14	3.70
36	亚麻醇	26.651	75.80	0.23
37	反式油酸甲酯	26.776	76.17	0.27
38	羊角拗醇	26.904	75.04	2.28
39	1,1,6-三甲基-3-亚甲基-2-(3,6,9,13-四甲基-6-乙基-10,14-二亚甲基-五癸-4-烯基)环己烷	28.373	70.24	1.42
40	叶绿醇	29.225	73.40	0.79
41	对甲氧基肉桂酸异辛酯	29.987	72.74	0.20
42	(*Z*)-13十八烯醛	30.434	78.01	3.99
43	己二酸二辛酯	30.749	85.34	0.71
44	邻苯二甲酸二(6-甲基庚-2-基)酯	32.290	84.57	0.36
45	对苯二甲酸二辛酯	34.832	78.03	0.29

2.2　打叶复烤烟叶逸出物诱导EA.hy926细胞损伤模型的建立

向EA.hy926细胞中加入不同质量浓度的2种打叶复烤烟叶逸出物样品，并采用MTT法测定细胞存活率，结果见图1。2种打叶复烤烟叶逸出物对EA.hy926细胞均有一定的毒性，主要是由于其含有的烟碱、可替宁和2,3'-联吡啶等含氮杂环化合物的相对含量较高，这些物质可导致细胞损伤。随着打叶复烤烟叶逸出物质量浓度的提高，其细胞毒性进一步增强，呈现出明显的剂量依赖关系。样品1对EA.hy926细胞的毒性小于样品2，可能是由于样品2中含氮杂环化合物的相对含量高于样品1。通过SPSS软件计算得出样品1的IC_{50}为（239±20）μg/mL，样品2的IC_{50}为（185±20）μg/mL，成功构建了打叶复烤烟叶逸出物诱导EA.hy926细胞损伤模型。



不同大写字母代表组间数据差异显著（$P<0.05$）；不同小写字母代表组内数据差异显著（$P<0.05$）。

图1　不同质量浓度打叶复烤烟叶逸出物样品对EA.hy926细胞的毒性作用

Fig. 1　Toxic effects of different mass concentrations of samples of the exudates from threshing and redrying tobacco leaves on EA.hy926 cells

为确定打叶复烤烟叶逸出物造成EA.hy926细胞损伤的原因，测定了2种样品质量浓度分别为150 μg/mL和250 μg/mL时对EA.hy926细胞中ROS相对含量的影响，结果见图2~3。

由图2可知，与空白组相比，加入2种打叶复烤烟叶逸出物样品的荧光信号明显向右偏移，且样品质量浓度越大，向右偏移程度越高，说明细胞内产生了大量的ROS。样品1的偏移程度小于样品2，表明样品2使EA.hy926细胞产生了更多的ROS。由图3可知，加入打叶复烤烟叶逸出物样品之后，EA.hy926细胞的ROS相对含量均有不同程度增加，呈现出明显的剂量依赖关系。表明打叶复烤烟叶逸出物对EA.hy926细胞的毒性作用可能与细胞内ROS水平的升高有关，进而引发氧化应激，造成细胞损伤。研究表明，烟气会消耗和抑制细胞内的抗氧化物质，导致细胞内的ROS自由基含量增加，其抑制的效果随烟气质量浓度的增加而更加显著[18-21]。

VC是还原剂，也是一种水溶性低分子物质[22]，具有抗氧化、增强机体免疫能力、延缓衰老等多种功能[23]。选择2种打叶复烤烟叶逸出物样品的IC_{50}建立EA.hy926细胞毒性损伤模型，探讨VC预处理对打叶复烤烟叶逸出物诱导的EA.hy926细胞毒性损伤模型的ROS相对含量的影响。

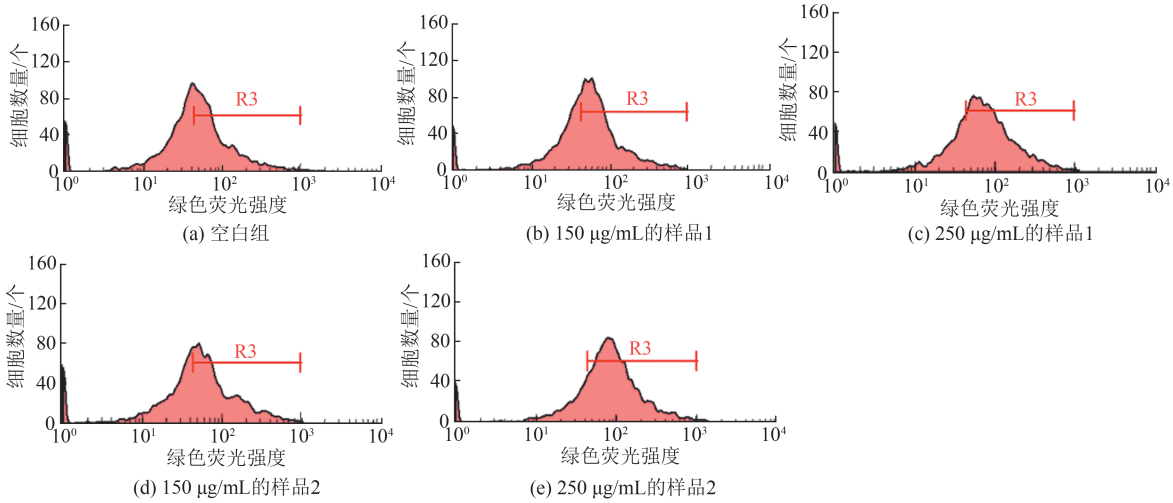
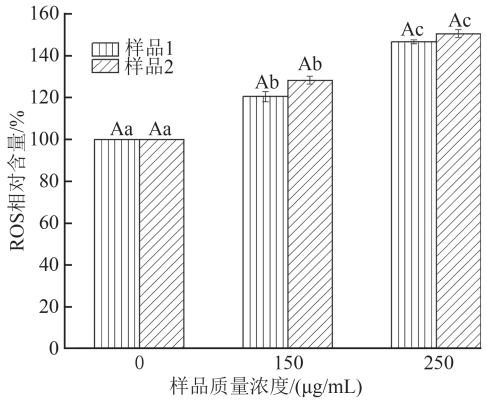


图2　不同样品处理后的流式细胞图

Fig. 2　Flow cytometry results of different samples after treatment



不同大写字母代表组间数据差异显著（$P<0.05$）；不同小写字母代表组内数据差异显著（$P<0.05$）。

图 3　不同质量浓度打叶复烤烟叶逸出物样品对 EA.hy926 细胞中 ROS 相对含量的影响

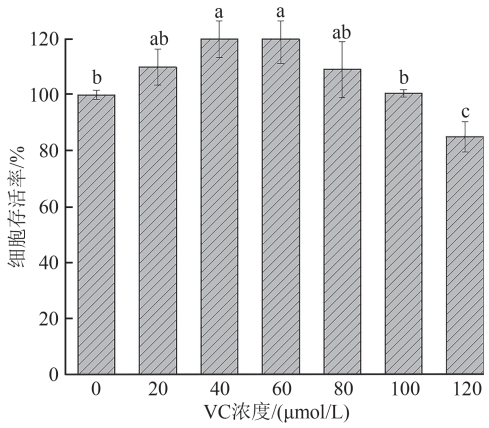
Fig. 3　Effects of different mass concentrations of samples of the exudates from threshing and redrying tobacco leaves on the relative content of ROS in EA.hy926 cells

2.3　不同浓度 VC 对 EA.hy926 细胞存活率的影响

如图 4 所示，随着 VC 浓度的增加，EA.hy926 细胞的存活率呈现先增加后减少的趋势，VC 浓度≤100 μmol/L 时，细胞存活率≥100%，即促进 EA.hy926 细胞的增殖；VC 浓度为 120 μmol/L 时，细胞存活率低于 100%，即抑制细胞增殖。研究表明，低浓度 VC 的保护作用较弱[23]，故选择 VC 浓度为 40、60、80、100 μmol/L 作为检测 ROS 相对含量的试验浓度。

2.4　VC 预处理对 EA.hy926 细胞中 ROS 相对含量的影响

如图 5 所示，与空白组相比，加入 2 种打叶复烤烟叶逸出物样品的荧光信号明显向右偏移，细胞内产生了大量的 ROS，经不同浓度的 VC 预处理



不同字母代表各组数据差异显著（$P<0.05$）。

图 4　不同浓度 VC 对 EA.hy926 细胞增殖的影响

Fig. 4　Effects of different concentrations of VC on the proliferation of EA.hy926 cells

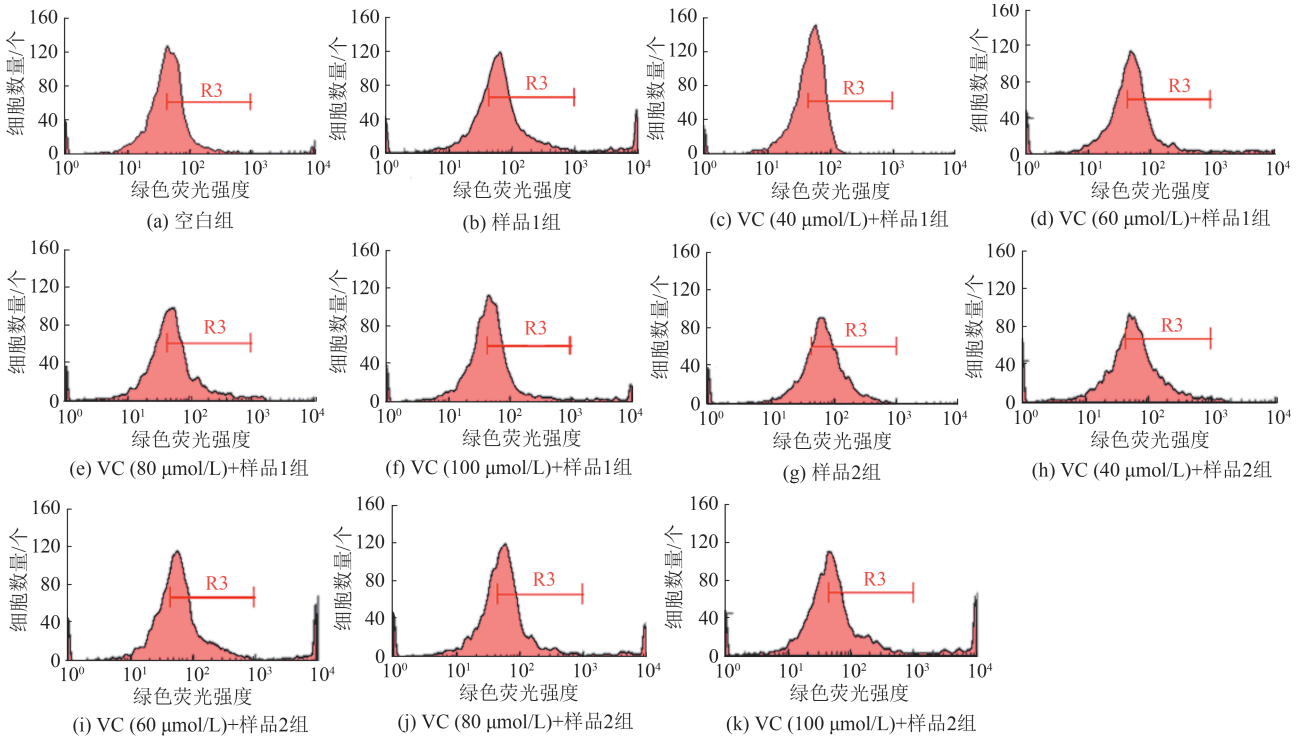
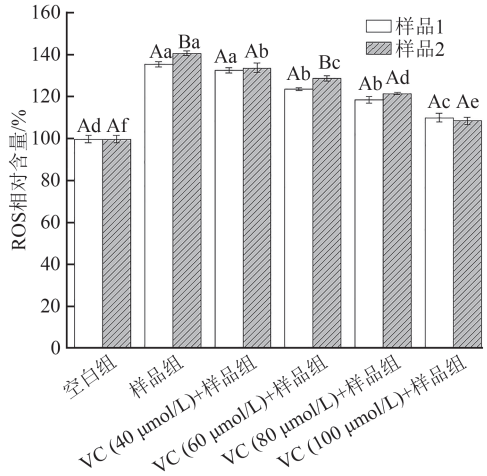


图 5　不同条件处理后样品的流式细胞图

Fig. 5　Flow cytometry results of samples treated with different conditions

后，相较于样品组，其荧光信号均不同程度地向左偏移，表明VC预处理能缓解细胞损伤后ROS的产生。如图6可知，与空白组相比，打叶复烤烟叶逸出物使EA.hy926细胞的ROS相对含量明显提高。经一定浓度的VC预处理后，2种样品的ROS相对含量均有降低，且VC预处理浓度越高，ROS相对含量降低的幅度越大，表明VC预处理能够降低打叶复烤烟叶逸出物对EA.hy926细胞的毒性作用，并存在剂量依赖关系。VC预处理浓度为100 μmol/L时，2种样品的ROS相对含量均高于空白组，表明VC只能在一定程度上缓解打叶复烤烟叶逸出物对EA.hy926细胞的毒性作用，但不能完全消除。



不同大写字母代表组间数据差异显著（$P<0.05$）；不同小写字母代表组内数据差异显著（$P<0.05$）。

图6　VC预处理对EA.hy926细胞中ROS相对含量的影响

Fig. 6　Effect of VC pretreatment on the relative content of ROS in EA.hy926 cells

3　结论

2种打叶复烤烟叶逸出物中含有的烟碱、可替宁和2，3’-联吡啶等含氮杂环化合物可对EA.hy926细胞造成损伤，其损伤机制为逸出物致使细胞内ROS增多，导致细胞发生氧化应激反应。但经VC预处理后，EA.hy926细胞的ROS相对含量显著降低。因此，在细胞水平上，VC可在一定程度上减轻打叶复烤烟叶逸出物对EA.hy926细胞的毒性作用。

参考文献

[1] 战磊，尹智华，肖明礼，等. 打叶复烤工艺发展及现状研究[J]. 广东化工，2014，41(11)：134，140.
ZHAN L，YIN Z H，XIAO M L，et al. Development and present situation of the threshing and redrying process[J]. Guangdong Chemical Industry，2014，41(11)：134，140.(in Chinese)

[2] 李天诚，王建民，欧明毅，等. 打叶及复烤强度对烟叶致香成分的影响[J]. 湖北农业科学，2021，60(1)：77-79，130.
LI T C，WANG J M，OU M Y，et al. Effect of threshing and redrying intensity on aroma components of tobacco leaves[J]. Hubei Agricultural Sciences，2021，60(1)：77-79，130.(in Chinese)

[3] 瞿永生，梁国海，任雯黎，等. 打叶复烤过程中烟草逸出香味成分的捕集与分析[J]. 烟草科技，2015，48(4)：32-36.
QU Y S，LIANG G H，REN W L，et al. Trapping and analysis of aroma components released from tobacco during redrying [J]. Tobacco Science & Technology，2015，48(4)：32-36.(in Chinese)

[4] 夭建华，米其利，耿永勤，等. 剑桥滤片-液-液捕集系统各部分烟气捕集物的细胞毒性比较[J]. 烟草科技，2012，45(4)：51-55.
YAO J H，MI Q L，GENG Y Q，et al. Comparison on cytotoxicity of cigarette smoke components trapped at each stage in Cambridge filter-solvent-solvent systems [J]. Tobacco Science & Technology，2012，45(4)：51-55.(in Chinese)

[5] 廖林，吕淑霞，张云鹤，等. 响应面法优化胶红酵母伴生的维生素C混菌发酵培养基[J]. 食品与生物技术学报，2020，39(2)：54-65.
LIAO L，LYU S X，ZHANG Y H，et al. Optimization of medium by response surface methodology for vitamin C mixed culture fermentation with a new companion strain *Rhodotorula mucilaginosa*[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2020，39(2)：54-65.(in Chinese)

[6] 张元元，张映曈，胡花丽，等. 草莓汁贮藏期维生素C的降解动力学研究[J]. 现代食品科技，2020，36(1)：120-126.
ZHANG Y Y，ZHANG Y T，HU H L，et al. Degradation kinetics of vitamin C in strawberry juice during storage[J]. Modern Food Science and Technology，2020，36(1)：120-126.(in Chinese)

[7] TAKISAWA S，TAKINO Y，LEE J，et al. Vitamin C is essential for the maintenance of skeletal muscle functions [J]. Biology，2022，11(7)：955.

[8] WILSON M K，BAGULEY B C，WALL C，et al. Review of high-dose intravenous vitamin C as an anticancer agent [J]. Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology，2014，10(1)：22-37.

[9] HARRISON F E，MAY J M. Vitamin C function in the

brain: vital role of the ascorbate transporter SVCT2[J]. Free Radical Biology & Medicine, 2009, 46(6): 719-730.

[10] 王佳琪, 李娜, 魏鹏超, 等. Ce^{3+}、VC 和 Ac-DEVD-CHO 浸种对沙葱种子抗氧化系统的影响[J]. 北方农业学报, 2021, 49(4): 76-82.
WANG J Q, LI N, WEI P C, et al. Effects of soaking with Ce^{3+}, VC and Ac-DEVD-CHO on antioxidant system of *Allium mongolicum* Regel. seeds[J]. Journal of Northern Agriculture, 2021, 49(4): 76-82.(in Chinese)

[11] ZHANG Y Y, MA C Y, XIAO Y H, et al. Dual role of vitamin C utilization in NO_2-induced oxidative stress in lung tissues of mice[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2010, 84: 662-666.

[12] 姚雯, 彭健, 张花, 等. 复烤烟叶尾气中挥发性物质的捕集与回收工艺[J]. 化学工程, 2022, 50(2): 5-8, 42.
YAO W, PENG J, ZHANG H, et al. Trapping and recovery process of volatile substances from redrying tobacco exhaust[J]. Chemical Engineering (China), 2022, 50(2): 5-8, 42.(in Chinese)

[13] 陆欢, 徐宁, 刘建辉, 等. 基于 HS-SPME-GC-MS 法分析春生田头菇子实体不同部位挥发性成分[J]. 食品与生物技术学报, 2021, 40(8): 95-104.
LU H, XU N, LIU J H, et al. Analyses of volatile components in different parts of *Agrocybe praecox* by HS-SPME-GC-MS[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2021, 40(8): 95-104.(in Chinese)

[14] 叶建斌, 齐晓娜, 张婷婷, 等. 红茶菌发酵制备特色酸香型烟草浸膏[J]. 食品与生物技术学报, 2021, 40(10): 104-111.
YE J B, QI X N, ZHANG T T, et al. Production of characteristic acid fragrance tobacco extract by fermentation using microbe from *Kombucha*[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2021, 40(10): 104-111.(in Chinese)

[15] 黄贺敏, 吴丽香, 邓梅忠, 等. 不同品质烟叶微生物群落与其挥发性成分的关联研究[J]. 食品与生物技术学报, 2022, 41(12): 85-95.
HUANG H M, WU L X, DENG M Z, et al. Study on the correlation between microbial communities and volatile aroma compounds in tobacco leaves of different qualities[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2022, 41(12): 85-95.(in Chinese)

[16] 罗昌荣, 张乾, 印黔黔, 等. 多步逐级裂解技术研究卷烟燃时香味成分形成与温度之间的关系[J]. 食品与生物技术学报, 2022, 41(12): 96-104.
LUO C R, ZHANG Q, YIN Q Q, et al. Relationship between volatiles formation and temperature during cigarette smoking investigated by multi-step pyrolysis technology[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2022, 41(12): 96-104.(in Chinese)

[17] 王冰, 赵乐, 余晶晶, 等. 不同生态区烟叶新植二烯含量的反吹气相色谱法检测与分析[J]. 中国烟草科学, 2021, 42(6): 66-73.
WANG B, ZHAO L, YU J J, et al. Determination and analysis of neophytadiene in tobacco leaves from different ecological regions by gas chromatography using back-flushing technique[J]. Chinese Tobacco Science, 2021, 42(6): 66-73.(in Chinese)

[18] LI X, LIN B C, ZHANG H S, et al. Cytotoxicity and mutagenicity of sidestream cigarette smoke particulate matter of different particle sizes[J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2016, 23(3): 2588-2594.

[19] KHALIL C, CHAHINE J B, CHAHLA B, et al. Characterization and cytotoxicity assessment of nargile smoke using dynamic exposure[J]. Inhalation Toxicology, 2019, 31(9/10): 343-356.

[20] SUN P J, YANG S, SUN X H, et al. Preparation of PolyHIPE scaffolds for 3D cell culture and the application in cytotoxicity evaluation of cigarette smoke[J]. Polymers, 2019, 11(6): 959.

[21] FIELDS W, FOWLER K, HARGREAVES V, et al. Development, qualification, validation and application of the neutral red uptake assay in Chinese Hamster Ovary (CHO) cells using a VITROCELL® VC10® smoke exposure system[J]. Toxicology *in Vitro*, 2017, 40: 144-152.

[22] 魏倩, MUHAMMAD Umar, 姜苹哲, 等. 海藻糖氧钒对小鼠胃肠道的氧化损伤以及 VC 和 GSH 的抗氧化保护作用[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2018, 39(6): 810-815.
WEI Q, UMAR M, JIANG P Z, et al. Vanadyl trehalose-induced oxidative stress in mouse gastrointestinal tract and the protective functions of vitamin C and reduced glutathione[J]. Journal of Xi'an Jiaotong University (Medical Sciences), 2018, 39(6): 810-815.(in Chinese)

[23] 任亚璐, 朱芝娴, 秦园, 等. 抗坏血酸(VC)对氯化锂诱导的腹腔巨噬细胞氧化损伤的保护作用[J]. 现代预防医学, 2012, 39(5): 1202-1203, 1211.
REN Y L, ZHU Z X, QIN Y, et al. The protection of ascorbic acid (VC) to oxidative damage of abdominal macrophages inducted by LiCl[J]. Modern Preventive Medicine, 2012, 39(5): 1202-1203, 1211.(in Chinese)

(责任编辑: 闫林红)