

电子烟基因毒性评价方法概述

严大为, 郑赛晶*

(上海新型烟草制品研究院, 上海 200082)

摘要: 为了解电子烟的基因毒性及其评价方法, 按照受试对象分类进行了综述。其中以细菌为受试对象的试验方法有细菌回复突变试验和 DNA 损伤分析等; 以离体细胞为受试对象的试验方法有微核试验、DNA 双链断裂试验、RNA 转录测序试验、定向基因检测分析和 Bhas 细胞转化试验等; 以模式动物为受试对象的试验方法有长期吸入毒性试验和生殖发育毒性试验等; 以人体为受试对象的主要是临床试验和流行病学调查研究等。由于受试对象和试验方法的差异性, 导致电子烟基因毒性结果的可信度和可比性较差, 因此建议在评价电子烟基因毒性的过程中, 应至少考虑细菌、离体细胞、模式动物和临床试验等 4 个层次的受试对象, 通过回复突变试验、微核试验、长期吸入毒性试验和临床试验等多种试验方法获得多个基因毒性的试验终点, 科学、客观和全面地综合评价电子烟的基因毒性。

关键词: 电子烟; 体内试验方法; 体外试验方法; 基因毒性

The Overview of Evaluation Methodology on E-cigarette Genotoxicity

YAN Dawei, ZHENG Saijing*

(Research Department of Chemistry, Shanghai New Tobacco Product Research Institute, Shanghai 200082, China)

Abstract: In order to understand the genotoxicity of e-cigarettes and its evaluation methodology, a review was conducted according to the classification of study subjects. The test methods using bacteria as the study subjects include bacterial reversion mutation test and DNA damage analysis. Methods using isolated cells as study subjects include micronucleus test, DNA double-strand breaking test, RNA transcriptional sequencing test, targeted gene detection and analysis, and Bhas cell transformation test. Long-term inhalation toxicity test and reproductive development toxicity test were used in the model animals. The human body as the study subject are mainly clinical trials and epidemiological investigations. Due to the differences of study subjects and test methods, the credibility and comparability of e-cigarettes genotoxicity results is poor. Therefore, it is recommended that in the process of e-cigarettes genotoxicity evaluation, at least bacteria, isolated cell, animal models and clinical trials should be considered. Multiple genetic toxicity test endpoints can be obtained through a variety of test methods, such as reverse-mutation test, micronucleus test, long-term inhalation toxicity test, and clinical trial, which help to make a scientific, objective and comprehensive evaluation of e-cigarettes genotoxicity.

Keywords: E-cigarette; *in vivo* methodology; *in vitro* methodology; genotoxicity

基因毒性是指外源性因素能直接或间接损伤细胞 DNA, 产生致突变和致癌作用的程度。一般外源性因素, 如某些化学物质等可在染色体水平、分子水平和碱基水平上造成基因损伤, 从而引起致癌、致畸和致突变等毒性作用^[1]。与此同时, 随着近年来电子烟的快速流行和传播, 其对人体健康的影响引起了公共卫生组织和其他相关方的密切关注^[2]。大部分研究表明电子烟的基因毒性较小, 远低于传统卷烟^[3-6]; 但也有一些研究表明电子烟对基因表达的影响远大于传统卷烟^[7]。社会各界对于电子烟基因毒性的研究日益关注, 但是采用的评价方法多参考医药或化学物质基因毒性的评价, 没有统一的受试对象、暴露方法和试验终点指标等规范。因此本

文对已发表的相关电子烟基因毒性的研究方法进行了综述, 并通过分析认为电子烟的基因毒性评价应至少考虑细菌、离体细胞、模式动物和临床试验等 4 个层次的受试对象, 通过回复突变试验、微核试验、长期吸入毒性试验和临床试验等多种试验方法获得多个基因毒性试验终点, 科学、客观和全面地评价电子烟的基因毒性。

1 以细菌为受试对象

细菌回复突变试验作为致突变物的早期筛选和研究手段, 主要利用营养缺陷型菌株, 在选择培养基上经外源性物质处理后, 观察菌株的回复突变的情况, 用来判断外源性物质的致突变能力, 是科

作者简介: 严大为 (1985-), 男, 工程师, 硕士, 主要从事新型烟草制品风险评估研究。E-mail: yandw@sh.tobacco.com.cn

*通信作者, E-mail: zhengsj@sh.tobacco.com.cn

收稿日期: 2019-09-26

修回日期: 2020-02-11

研机构和政府公认的测定新化学物质和新药潜在致突变的检测方法^[8]。对于电子烟基因毒性的评价,可以通过将电子烟气溶胶整体看作外源性物质,通过细菌回复突变试验检测碱基水平上的基因毒性作用^[9]。

THORNE 等^[6]使用吸烟机采用加拿大深度抽取的方法产生电子烟气溶胶,采取气-琼脂界面暴露染毒的方法,研究了电子烟气溶胶和参比卷烟(3R4F)气溶胶对 TA98 和 TA100 菌株致突变的影响,试验结果表明在暴露浓度为 1 L/min 电子烟气溶胶 3 h 后,两种菌株均未发生突变现象,而同等条件下暴露相同浓度的参比卷烟气溶胶 3 h 后的菌株发生突变现象。虽然该研究仅采用两个菌株进行研究,且电子烟样品种类较少,但是也从某种程度上说明电子烟在致基因突变方面,可以通过此类方法进行评价。同时他们还研究了极端试验条件下的未稀释电子烟气溶胶的致突变性,研究结果表明在长达 112.5 min 的未稀释电子烟气溶胶暴露后,5 种菌株均未发现致突变现象,该结果进一步说明电子烟气溶胶致细菌回复突变能力较弱和该检测方法的适用性^[10]。

MANOJ 等^[11]通过细菌回复突变试验,对电子烟和卷烟气溶胶进行体外遗传毒性的比较研究发现,电子烟气溶胶捕集提取物的生物毒性比卷烟气溶胶提取物低 6000 倍。同时试验结果还显示电子烟气溶胶捕集提取物和电子烟烟液本身不存在可检测的生物毒性差异。但 BHARADWAJ 等^[12]利用重组大肠杆菌研究了电子烟烟液和电子烟气溶胶毒性作用时发现,在暴露 480 min 的 1/4 的稀释电子烟气溶胶后,大肠杆菌出现 DNA 损伤、离子稳态、氧化应激和膜损伤等非致死影响。

由此可见,电子烟对细菌的基因毒性,与试验方法中的菌株种类、试验对象形态和暴露时间有一定的关系,因此在进行评价时,应选取公认的标准菌株 TA98、TA100 等,结合消费者的实际消费情况,采取气-琼脂界面暴露染毒的方法,选择符合实际的暴露时间,观察菌株的基因毒性情况,并在此基础上对电子烟的基因毒性进行初步评价。

2 以细胞为受试对象

非临床安全评价中采取离体细胞进行体外试验研究广泛应用于单一化学物质和复杂混合物的

毒理学评价,常见的有染色体畸变试验和微核试验,均是检测外源性物质基因毒性的试验方法。此类试验方法在电子烟气溶胶总粒相物的基因毒性评价方面也有着成功的应用^[13]。

2.1 哺乳动物细胞

微核试验是检测染色体或有丝分裂器损伤的一种遗传毒性试验方法。无着丝粒的染色体片段或因纺锤体受损而丢失的整个染色体,在细胞分裂后期仍留在子细胞的胞质内成为微核。通过检测哺乳动物细胞分裂期间细胞质中微核情况的体外微核试验,可以检测电子烟对染色体的损伤情况。有研究表明参比卷烟 3R4F 气溶胶中的总粒相物可导致 DNA 损伤,进而导致染色体断裂形成微核,其微核形成率最大的剂量为 0.12 mg/mL,高于此剂量则会引起细胞的大量死亡。而电子烟气溶胶总粒相物浓度高达 20 mg/mL 时,仍未观察到有微核的形成。认为电子烟气溶胶总粒相物对细胞遗传物质 DNA 的损伤显著低于参比卷烟^[11,14]。

2.2 人源支气管上皮细胞

DNA 的损伤有很多不同形式,如碱基修饰、DNA 单链断裂、DNA 链内和链间交联以及 DNA 双链断裂等,其中 DNA 双链断裂被认为 DNA 最严重的损伤。细胞在 DNA 双链断裂发生后,产生一系列的应激反应,其中一个主要的反应就是毛细血管共济失调突变基因(Ataxia Telangiectasia Mutated, ATM)起始的信号级联反应,它可以使细胞周期停顿直到损伤修复。而 H2AX 是这一信号级联反应中的一个主要成员,它会被 ATM 磷酸化(称为 γ H2AX 或 gammaH2AX),并在随后的损伤修复过程中发挥着重要的作用^[15],因此可以通过检测 γ H2AX 的含量对 DNA 的损伤情况进行评价^[16]。研究人员发现,参比卷烟在细胞暴露界面沉积量 0~26.9 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 的范围内均出现 γ H2AX 的阳性反应,而电子烟气溶胶暴露达到 85.7 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 的情况下,并未发现 γ H2AX 的阳性反应结果^[17]。因此通过检测 γ H2AX 的方法判断电子烟气溶胶对细胞的 DNA 损伤情况具有一定的可行性。

对离体细胞中 RNA 转录组进行测序,以判断基因表达量的变化,最近也应用于电子烟气溶胶的基因毒性研究^[18]。通过 RNA 转录组进行测序发现,与空气对照组相比,参比卷烟组有 873 个 RNA 基

因表达出现极显著性差异 ($p < 0.01$ 且差异倍数 > 2)，经过 48 h 的恢复期后，仍有 205 个 RNA 基因表达出现极显著性差异。而在同等尼古丁浓度的电子烟气溶胶暴露后，未发现有 RNA 基因表达出现极显著性差异 ($p < 0.01$ 且差异倍数 > 2)，进一步研究发现，参比卷烟气溶胶对肺癌、炎症和纤维化相关的基因有明显的影 响，而电子烟气溶胶则对生物代谢合成过程、细胞外膜、细胞凋亡、细胞缺氧、氧化应激、生长因子受体基因和三酰甘油脂肪酸代谢路径的相关基因等有一定的影响^[18-24]。

2.3 其他人源细胞

电子烟的基因毒性研究除选取常用的呼吸系统组织上皮细胞作为受试对象外，也可选取其他细胞系作为受试对象。如研究发现牙龈上皮细胞在暴露电子烟气溶胶 3 d 后，其形态和乳酸脱氢酶的活性发生变化，基因 *caspase-3* 的表达显著性增加，并与牙龈上皮细胞凋亡存在一定的关联^[25]。

在低浓度 (25 $\mu\text{mol/L}$) 情况下，卷烟气溶胶提取物会造成血管内皮细胞 DNA 损伤，电子烟气溶胶提取物未发现相关毒性。该损伤一般由自由基的产生所引起，最终会影响内皮细胞的活性^[26]。但 JACK 等^[27]研究发现在冠状动脉内皮细胞暴露电子烟后，并未引起细胞应激反应，相关应激基因 *NFR2* 的表达也未出现差异。

对人肺成纤维细胞(HFL-1)的研究发现，与空气对照组相比，在电子烟气溶胶暴露 10~20 min 后，会导致细胞线粒体内的活性氧 (ROS) 增加，降低细胞核 DNA 片段的稳定性，同时细胞炎症因子 IL-8 和 IL-6 的水平上升，这可能引起一系列的炎症产生^[28-30]。

关于非遗传致癌毒性，Bhas 细胞转化试验是一种非常有效的检测方法。Bhas42 细胞是将 *v-Ha-ras* 基因导入 Balb/c3T3 细胞中而建成的细胞系，已处于启动状态，在非遗传毒性致癌物暴露影响下不经过启动剂的预处理便可引起细胞恶性转化。 H_2O_2 可以杀死未发生转化的正常细胞，而对转化细胞不产生影响。供试品处理后的细胞经 CCK-8 染色后，根据其存活率确定细胞转化程度，从而判定供试品的非遗传毒性^[31]。研究表明参比卷烟烟气的总颗粒物具有可以引起 Bhas 细胞转化的能力，最低浓度达

到 6 $\mu\text{g/mL}$ ，相反电子烟气溶胶总颗粒物则未引起 Bhas 细胞转化，试验浓度高达 120 $\mu\text{g/mL}$ ^[32]。

从上述研究来看，通过对微核试验、RNA 转录组测序和特定基因的检测等试验方法，可以检测电子烟的相关基因毒性^[33]。同时离体细胞成本低廉，操作相对简单，试验周期较短，是进行电子烟基因毒性评价的理想受试对象。

3 以模式动物为研究对象

由于离体细胞或组织不能模拟人体内部各个系统相互作用的复杂过程，更无法预测电子烟气溶胶对人体内部的各个器官产生的基因毒性作用，因此一般将体内毒性试验作为电子烟基因毒性研究的标准方法^[34]。

在呼吸系统方面，有研究表明长期暴露电子烟气溶胶后，发现肺部致癌相关的 P450 代谢酶系 CYP1A1/2、CYP2B1/2、2C11 和 CYP3A 等代谢酶的数量显著增加，活性氧 (ROS) 水平也显著增加。同时还发现血液样品中存在较高的微核率，尿液中的 DNA 出现点突变等遗传毒性^[35]。同时 DNA 甲基化受到影响，进一步影响小鼠的肺部功能，造成 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 等炎症因子的大量增加^[36]。支气管功能也受到干扰，可导致产生系统性炎症和器官纤维化等情况^[37]。

在中枢神经系统发育毒性方面，发现仔鼠脑部前额组织有 109 个基因表达存在显著性差异 ($p < 0.01$)，这些基因表达的差异与后续神经系统发育毒性具有一定的相关性^[38]。进一步研究发现，母鼠暴露电子烟气溶胶后可以导致仔鼠的认知能力退化，这可能是由于与调节神经活动相关的基因 *Aurka*、*Aurkb*、*Aurkc*、*Kdm5c*、*Kdm6b*、*Dnmt3a*、*Dnmt3b* 和 *Atf2* 表达发生了显著变化所引起^[39]。取小鼠大脑中海马组织后发现，*Ngfr* 和 *Bdnf* 基因表达也受到影 响，这对中枢神经系统正常发育存在潜在威胁^[40]。在子代的胚胎发育过程中暴露电子烟气溶胶，可引起一定的出生缺陷^[41]。除了在生殖发育方面的基因毒性影响，电子烟气溶胶还可引起肝功能异常。研究发现肝脏功能的生物标志物 *GSK3* 在暴露电子烟气溶胶后，该基因的表达显著上升^[42]。

综上所述，通过模式动物整体暴露试验，可以评价电子烟气溶胶对动物体内不同系统的基因毒

性大小,但由于模式动物和人类存在暴露方式差异,应考虑与人类吸食电子烟类似的方式进行暴露,选取可靠公认的基因毒性指标,观察模式动物的时效和量效效应,以获得准确可比的电子烟基因毒性试验数据。

4 以人体为受试对象

2011—2014年间,美国食品药品监督管理局发起了一项烟草与公众健康评估研究(PATH, Population Assessment of Tobacco and Health)。通过对32 320名国民调查研究发现,当前使用电子烟的主要原因是消费者认为电子烟比传统卷烟对身体健康的危害小,如由于基因毒性引起的致癌等疾病可能性较低^[43]。但一些媒体、政府和医疗网站却报道使用电子烟后呼吸系统、消化系统、心血管系统、神经系统和免疫系统等会产生基因毒性影响^[44]。为了解电子烟的真实基因毒性情况,尤其是对免疫系统基因表达的影响,MELANIE等^[45]进行了一项临床试验研究。他们收集了非吸烟者(13人)、传统卷烟消费者(14人)和电子烟消费者(12人)的鼻腔表面刮擦组织、鼻灌洗液、尿液和血清等样本,对样本中免疫基因表达谱的变化进行分析,并比较电子烟和传统卷烟对呼吸系统的生物效应。通过对597个免疫相关基因检测研究发现,与非吸烟者相比,电子烟消费者有358个与免疫相关的基因发生表达量下调,而传统卷烟消费者仅有53个基因发生表达差异,并且全部包含于电子烟消费者表达差异的基因之中,这说明从传统卷烟转吸电子烟时,未能改变免疫系统的基因表达量减少的情况,还可能对消费者免疫功能调节产生更多的不利影响。此类临床试验结果可直观反映电子烟的基因毒性,但往往临床样本相对较少,且样本个体差异性较大,

代表性较差,试验数据的充分性和可靠性需要进一步扩大临床试验进行验证。

5 小结与展望

一般而言,电子烟基因毒性的研究层次包括体外试验、体内试验、人体试验和流行病学研究,研究结果的权重由小到大,且各有优缺点(表1)。常见试验方法有AMES试验、哺乳动物细胞基因突变试验(TK试验)、染色体畸变试验、微核试验、显性致死试验、程序外DNA合成试验、姐妹染色单体交换试验、单细胞凝胶电泳试验和转基因动物致突变试验等。电子烟的基因毒性产生的原因较多,除电子烟中尼古丁本身对神经系统基因有一定的影响之外^[46],电子烟烟液中的溶剂和添加剂也是影响因素,如电子烟气溶胶中的肉桂醛具有一定基因毒性,可损伤呼吸系统中免疫细胞的正常功能^[47-49]。一些香精香料添加剂还可引起口腔上皮细胞和牙周纤维细胞的炎症反应以及DNA损伤等症状^[50-51],因此电子烟的基因毒性难以通过单一的毒性机制进行阐述,是多种化学物质共同作用的结果。但也有研究表明添加剂对线虫的基因毒性效应影响不大,这可能与添加剂的种类和添加量有关^[52]。因此,对于电子烟气溶胶整体的基因毒性评价较为困难。同时电子烟气溶胶的基因毒性还可能与电子烟的使用频率、使用时烟具工作条件以及气溶胶产生过程等多种因素相关,因此需要对电子烟基因毒性的评价方法进行规范和总结,如确定电子烟器具的工作模式和抽吸模式,电子烟气溶胶的暴露方式和暴露时间,以及受试对象的种类。虽然文献中通过一些特定方式,发现相关电子烟气溶胶的基因毒性,但是这些毒性评价是否对电子烟整体的基因毒性具有代表性和权威性,仍然值得商榷。

表1 不同受试对象的电子烟基因毒性评价方法及其优缺点

Table 1 The advantages and disadvantages of methods for evaluating genotoxicity of e-cigarettes with different subjects

评价方法 Method	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
细菌 Bacteria	方法灵敏、操作简单、试验条件易于控制、基因突变检出率高。	受试对象为原核生物, DNA 修复系统简单,不能完整的代表真核生物的情况。
离体细胞 Cell	影响因素少、可进行基因毒性机制研究、试验周期短、成本较低。	不能全面的反应基因毒性效应和作为基因毒性评价最终依据。
模式动物 Model animal	易于控制暴露条件、可综合评价基因毒性效应,试验成本和周期相对较低。	暴露方式与人类存在差异、试验条件与人实际情况存在不一致性。
人体 Human	暴露条件严格受控、人体毒性反应可准确测定、研究结果相对可靠。	试验成本高、受试对象较少、仅可做低浓度、短时间暴露。

总之，目前关于电子烟的基因毒性，虽然在不同研究水平上均有一些研究方法和成果，但是可利用文献和数据数量较少，大量文献研究还是体外基因毒性研究方法，临床基因毒性研究和流行病学调查研究相对较少，并且每个研究层次水平上研究方法还未形成共识^[53-57]。从研究结果的代表性、科学性、真实性和规范性等方面来说，目前的科研结果还难以对电子烟基因毒性做出客观评价。应在电子烟基因毒性的受试对象、暴露方式、暴露剂量、试验指标和结果评价等方面形成一致的标准方法，至少考虑细菌、离体细胞、模式动物和临床试验等 4 个层次的受试对象，通过回复突变试验、微核试验、长期吸入毒性试验和临床试验等多种试验方法获得多个基因毒性试验终点，科学、客观和全面地评价电子烟的基因毒性，构建电子烟基因毒性评价的科学体系，才是客观评价电子烟基因安全性的当务之急。

参考文献

- [1] ZOUNKOVA R, KOVALOVA L, BLAHA L, et al. Ecotoxicity and genotoxicity assessment of cytotoxic antineoplastic drugs and their metabolites[J]. *Chemosphere*, 2010, 81(2): 253-260.
- [2] CHARLOTTA P, MARTIN D. A systematic review of health effects of electronic cigarettes[J]. *Preventive Medicine*, 2014, 69: 248-260.
- [3] LI X, XIE F W, LIU H M. Recent advances in toxicological evaluation of novel tobacco products[J]. *Tobacco Science & Technology*, 2016, 49(1): 88-93.
- [4] GILLMAN I G, KISTLER K A, STEWART E W, et al. Effect of variable power levels on the yield of total aerosol mass and formation of aldehydes in e-cigarette aerosols[J]. *Regulatory Toxicology & Pharmacology*, 2016, 75: 58-65.
- [5] CALLAHAN L P. Electronic cigarettes: human health effects[J]. *Tobacco Control*, 2014, 23: 36-40.
- [6] THORNE D, CROOKS I, HOLLINGS M, et al. The mutagenic assessment of an electronic-cigarette and reference cigarette smoke using the Ames assay in strains TA98 and TA100[J]. *Mutation Research/genetic Toxicology & Environmental Mutagenesis*, 2016, 8(12): 29-38.
- [7] MARTIN E M, CLAPP P W, REBULI M E, et al. E-cigarette use results in suppression of immune and inflammatory-response genes in nasal epithelial cells similar to cigarette smoke[J]. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2016, 311(1): L135-L144.
- [8] SCOTT K, SAUL J, CROOKS I, et al. The resolving power of *in vitro* genotoxicity assays for cigarette smoke particulate matter[J]. *Toxicology in Vitro*, 2013, 27(4): 1312-1319.
- [9] KADIMISETTY K, MALLA S, RUSLING J F. Automated 3-D printed arrays to evaluate genotoxic chemistry: e-cigarettes and water samples[J]. *ACS Sensors*, 2017, 2(5): 670-678.
- [10] THORNE D, HOLLINGS M, SEYMOUR A, et al. Extreme testing of undiluted e-cigarette aerosol in vitro using an Ames air-agar-interface technique[J]. *Mutation Research*, 2018, 828: 46-54.
- [11] MANOJ M, LEVERETTE R D, COOPER B T, et al. Comparative *in vitro* toxicity profile of electronic and tobacco cigarettes, smokeless tobacco and nicotine replacement therapy products: e-liquids, extracts and collected aerosols[J]. *International Journal of Environmental Research & Public Health*, 2014, 11(11): 11325-11347.
- [12] BHARADWAJ S, MITCHELL R J, QURESHI A, et al. Toxicity evaluation of e-juice and its soluble aerosols generated by electronic cigarettes using recombinant bioluminescent bacteria responsive to specific cellular damages[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2016, 90: 53-60.
- [13] JOHNSON M D, SCHILZ J, DJORDJEVIC M V, et al. Evaluation of *in vitro* assays for assessing the toxicity of cigarette smoke and smokeless tobacco[J]. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 2009, 18(12): 3263-3304.
- [14] GANAPATHY V, MANYANGA J, BRAME L, et al. Electronic cigarette aerosols suppress cellular antioxidant defenses and induce significant oxidative DNA damage[J]. *Plos One*, 2017, 12(5): 1-20.
- [15] ROGAKOU E P, PILCH D R, ORR A H, et al. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(10): 5858-5868.
- [16] GARCIA-CANTON C, ANADON A, MEREDITH C. Assessment of the *in vitro* γ H2AX assay by high content screening as a novel genotoxicity test[J]. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2013, 757(2): 158-166.
- [17] THORNE D, LARARD S, BAXTER A, et al. The comparative *in vitro* assessment of e-cigarette and cigarette smoke aerosols using the γ H2AX assay and applied dose measurements[J]. *Toxicology Letters*, 2017, 265: 170-178.
- [18] SHEN Y F, WOLKOWICZ M J, KOTOVA T, et al. Transcriptome sequencing reveals e-cigarette vapor and mainstream-smoke from tobacco cigarettes activate different gene expression profiles in human bronchial epithelial cells[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 23984.
- [19] HASWELL L E, BAXTER A, BANERJEE A, et al. Reduced biological effect of e-cigarette aerosol compared to cigarette smoke evaluated *in vitro* using normalized nicotine dose and RNA-seq-based toxicogenomics[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 888.
- [20] MOSES E, WANG T, CORBETT S, et al. Molecular impact of electronic cigarette aerosol exposure in human bronchial epithelium[J]. *Toxicological Sciences*, 2017, 155(1): 248-257.
- [21] SOLLETTI S K, BHATTACHARYA S, AHMAD A, et al. MicroRNA expression profiling defines the impact of electronic cigarettes on human airway epithelial cells[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 1081.
- [22] TAYLOR M, CARR T, OKE O, et al. E-cigarette aerosols induce lower oxidative stress *in vitro* when compared to tobacco smoke[J]. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 2016, 26(6): 465-476.
- [23] HWANG J H, LYES M, SLADEWSKI K, et al. Electronic cigarette inhalation alters innate immunity and airway cytokines while increasing the virulence of colonizing bacteria[J]. *Journal of Molecular Medicine*, 2016, 94(6): 667-679.
- [24] STABILE A M, MARINUCCI L, BALLONI S, et al. Long term effects of cigarette smoke extract or nicotine on nerve growth factor and its receptors in a bronchial epithelial cell line[J]. *Toxicology in Vitro*, 2018, 12(53): 29-36.
- [25] ROUABHIA M, PARK H J, SEMLALI A, et al. E-Cigarette vapor induces an apoptotic response in human gingival epithelial cells through the caspase-3 pathway: effect of e-cigarette on epithelial cells[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2017, 232(6): 1539-1547.
- [26] ANDERSON C, MAJESTE A, HANUS J, et al. E-cigarette aerosol exposure induces reactive oxygen species, DNA damage, and cell death in vascular endothelial cells[J]. *Toxicological Sciences*, 2016, 154(2): 332-340.
- [27] JACK E T, NEWBY A C, TIMPSON N J, et al. Cigarette smoke but not electronic cigarette aerosol activates a stress response in human coronary artery endothelial cells in culture[J]. *Drug and Alcohol Dependence*, 2016, 163: 256-260.
- [28] LERNER C A, RUTAGARAMA P, AHMAD T, et al. Electronic cigarette aerosols and copper nanoparticles induce mitochondrial stress and promote DNA fragmentation in lung fibroblasts[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016, 477(4): 620-625.
- [29] SCOTT A, LUGG S T, ALDRIDGE K, et al. Pro-inflammatory effects of e-cigarette vapour condensate on human alveolar macrophages[J].

- Thorax, 2018, 73: 1161-1169.
- [30] LEE H W, PARK S H, WENG M W, et al. E-cigarette smoke damages DNA and reduces repair activity in mouse lung, heart, and bladder as well as in human lung and bladder cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2018, 115(7): E1560-E1569.
- [31] WEISENSEE D, POTH A, ROEMER E, et al. Cigarette smoke-induced morphological transformation of Bhas 42 cells in vitro[J]. Altern Lab Anim, 2013, 41(2): 181-189.
- [32] BREHENY D, OKE O, PANT K, et al. Comparative tumor promotion assessment of e-cigarette and cigarettes using the in vitro Bhas 42 cell transformation assay[J]. Environmental and Molecular Mutagenesis, 2017, 58(4): 190-198.
- [33] TOMMASI S, BATES S E, BEHAR R Z, et al. Limited mutagenicity of electronic cigarettes in mouse or human cells, in vitro[J]. Lung Cancer, 2017, 112: 41-46.
- [34] CURTIS D, KLAASSEN O B, WATKINS III. Casarett & Doull's essentials of toxicology[M]. Third edition. New York: McGraw-Hill Education/Medical, 2015.
- [35] CANISTRO D, VIVARELLI F, CIRILLO S, et al. E-cigarettes induce toxicological effects that can raise the cancer risk[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 2028.
- [36] CHEN H, LI G, CHAN Y L, et al. Maternal e-cigarette exposure in mice alters DNA methylation and lung cytokine expression in offspring[J]. American Journal of Respiratory Cell & Molecular Biology, 2017, 58(3): 1-17.
- [37] CROTTY A L E, DRUMMOND C A, MARK H, et al. Chronic inhalation of e-cigarette vapor containing nicotine disrupts airway barrier function and induces systemic inflammation and multiorgan fibrosis in mice[J]. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2018, 314(6): R834-R847.
- [38] DANA L, PAMELLA T, KEVIN C, et al. Frontal cortex transcriptome analysis of mice exposed to electronic cigarettes during early life stages[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2016, 13(4): 417-431.
- [39] TARA N, LI G E, HUI C, et al. Maternal E-cigarette exposure results in cognitive and epigenetic alterations in offspring in a mouse model[J]. Chemical Research in Toxicology, 2018, 31: 601-611.
- [40] ZELIKOFF J T, PARMALEE N L, CORBETT K, et al. Microglia activation and gene expression alteration of neurotrophins in the hippocampus following early-life exposure to E-cigarette aerosols in a murine model[J]. Toxicological Sciences, 2018, 162(1): 276-286.
- [41] KENNEDY A E, SURAJ K, RENE O N, et al. E-cigarette aerosol exposure can cause craniofacial defects in *Xenopus laevis* embryos and mammalian neural crest cells[J]. PLOS ONE, 2017, 12(9): 1-25.
- [42] EL G N, DKHILI H, DALLAGI Y, et al. Comparison between electronic cigarette refill liquid and nicotine on metabolic parameters in rats[J]. Life Sciences, 2016, 146: 131-138.
- [43] RODU B, PLURPHANSWAT N. E-cigarette use among US adults: population assessment of tobacco and health (PATH) study[J]. Nicotine & Tobacco Research, 2018, 20(8): 940-948.
- [44] HUA M, TALBOT P. Potential health effects of electronic cigarettes: A systematic review of case reports [J]. Preventive Medicine Reports, 2016, 4: 169-178.
- [45] MELANIE M, ARIEL S, MADISON L, et al. Developmental nicotine exposure affects larval brain size and the adult dopaminergic system of *Drosophila melanogaster*[J]. BMC Developmental Biology, 2018, 18(1): 13-15.
- [46] MASSARSKY A, ABDEL A, GLAZER L, et al. Neurobehavioral effects of 1,2-propanediol in zebrafish (*Danio rerio*)[J]. Neuro Toxicology, 2018, 3(65): 111-124.
- [47] LECHASSEUR A, ÉRIC J, ROUTHIER J, et al. Exposure to electronic cigarette vapors affects pulmonary and systemic expression of circadian molecular clock genes[J]. Physiological Reports, 2017, 5(13): 1-13.
- [48] BEHAR R Z, LUO W, LIN S C, et al. Distribution, quantification and toxicity of cinnamaldehyde in electronic cigarette refill fluids and aerosols[J]. Tobacco Control, 2016, 25(Suppl 2): ii94-ii102.
- [49] CLAPP P W, PAWLAK E A, LACKEY J T, et al. Flavored e-cigarette liquids and cinnamaldehyde impair respiratory innate immune cell function[J]. AJP Lung Cellular and Molecular Physiology, 2017, 8, 313(2): L278-L292.
- [50] SUNDAR I K, JAVED F, ROMANOS G E, et al. E-cigarettes and flavorings induce inflammatory and pro-senescence responses in oral epithelial cells and periodontal fibroblasts[J]. Oncotarget, 2016, 7(47): 77196-77204.
- [51] WELZ C, CANIS M, SCHWENK-ZIEGER S, et al. Cytotoxic and genotoxic effects of electronic cigarette liquids on human mucosal tissue cultures of the oropharynx[J]. J Environ Pathol Toxicol Oncol, 2016, 35(4): 343-354.
- [52] PANITZ D, SWAMY H, NEHRKE K. A *C. elegans* model of electronic cigarette use: physiological effects of e-liquids in nematodes[J]. BMC Pharmacology and Toxicology, 2015, 16: 32.
- [53] KOPA P N, PAWLICZAK R. Effect of smoking on gene expression profile—overall mechanism, impact on respiratory system function and reference to electronic cigarettes[J]. Toxicology Mechanisms and Methods, 2018, 28(6): 397-409.
- [54] ANTHÉRIEU S, GARAT A, BEAUVAL N, et al. Comparison of cellular and transcriptomic effects between electronic cigarette vapor and cigarette smoke in human bronchial epithelial cells[J]. Toxicology in Vitro, 2017, 12(45): 417-425.
- [55] OTRĘBA M, KOŚMIDER L, KNYSAK J, et al. E-cigarettes: voltage- and concentration-dependent loss in human lung adenocarcinoma viability[J]. Journal of Applied Toxicology, 2018, 38(8): 1135-1143.
- [56] SHAHAB L, GONIEWICZ M L, BLOUNT B C, et al. Nicotine, carcinogen, and toxin exposure in long-term e-cigarette and nicotine replacement therapy users: a cross-sectional study[J]. Annals of Internal Medicine, 2017, 166(6): 390-400.
- [57] HOLLIDAY R, KIST R, BAULD L. E-cigarette vapour is not inert and exposure can lead to cell damage[J]. Evidence-based dentistry, 2016, 17(1): 1-3.