植物学通报 *Chinese Bulletin of Botany* 2007, **24** (4): 544–552, www.chinbullbotany.com

·专题介绍·

烟草去甲基尼古丁产生的机理

安佰义[1], 席景会[1, 2], 杨朔[1], 郝东云[1 *]

[1] 吉林大学分子酶学工程教育部重点实验室, 长春 130021; [2] 吉林大学植物科学学院, 长春 130062

摘要 烟叶的采收后处理和加工过程中, 大量的尼古丁经去甲基化作用生成了去甲基尼古丁, 后者是烟草特有的亚硝胺类(tobacco-specific nitrosamines, TSNAs)致癌物——亚硝基去甲基尼古丁(nitrosonornicotine, NNN)的前体, 与人类健康息息相关。由于尼古丁去甲基化反应在基础理论研究和商业上的重要价值, 长期以来关于这个反应的机制研究一直是学术界的热点。本文讨论了尼古丁去甲基化反应研究的历史概况、反应机制假说的演变及影响该反应的因素, 期望通过对烟草尼古丁去甲基化反应研究的总结, 为烟草品质提高和低毒害烟草制品的研究与开发提供一定的参考。

关键词 去甲基化, 尼古丁, 尼古丁去甲基化酶, 去甲基尼古丁, 烟草

安佰义, 席景会, 杨朔, 郝东云 (2007). **烟草去甲基尼古丁产生的机理**. **植物学通报 24**, 544–552.

烟碱(尼古丁)(nicotine)是主要存在于茄科烟草属植物中的一种天然生物碱。包括尼古丁在内, 已有45种不同的生物碱在烟草属植物中被鉴定出来, 而烟碱、降烟碱(去甲基尼古丁)(nornicotine)、假木贼碱(anabasine)和新烟草碱(anatabine)是烟草中的4种主要生物碱(Leete, 1983)。烟草中生物碱的组成和含量是衡量烟叶品质的重要指标之一。在大多数商业烟草品种中, 尼古丁是主要的生物碱, 占生物碱总含量的90%-95%, 另外3种仅占生物碱总含量的5%-10%。烟草在采收后处理和加工过程中, 叶片中部分生物碱发生亚硝基化, 导致烟草特有亚硝胺类物质(tobacco-specific nitrosamines, TSNAs)的形成(Hecht, 1998)。众多研究表明TSNAs具有致癌特性。在烟草中已检测出7种亚硝胺类化合物, 但是因其亚硝基去甲基尼古丁(nitrosonornicotine, NNN)和4-甲基亚硝氨基-1-3-吡啶-1-丁醛(4-*N*-methylnitrosamino-1-3-pyridyl-1-butanone, NNK)含量和致癌力而被公认为是烟草制品中最危险的物质(Hecht, 1998, 2003)。

亚硝基去甲基尼古丁的形成是由于去甲基尼古丁的亚硝基化作用, 而去甲基尼古丁来源于尼古丁的*N*-去甲基化反应: 尼古丁脱去其吡咯环氮原子上的甲基转化为去甲基尼古丁(图1)(Bush et al., 2001)。研究表明, 去甲基尼古丁的水平与NNN水平呈显著正相关关系。虽然在通常情况下栽培烟草中去甲基尼古丁占总生物碱含量的比例低于5%, 但是在某些烟草植株的叶片中发生的*N*-去甲基化反应可以使最高达95%的尼古丁代谢转化为去甲基尼古丁。

控制较低水平的去甲基尼古丁不仅是因为它作为NNN的前体物质对人体具有潜在的致癌性, 而且最新研究表明, 去甲基尼古丁本身对人体的健康也具有直接的负面影响。Dickerson和Janda(2002)的研究结果表明, 去甲基尼古丁可以导致蛋白质的异常糖基化。Dickerson和Janda(2002)在吸烟人群的血浆中发现蛋白质糖基化水平增加, 而且去甲基尼古丁可以同常用的类固醇药物, 比如强的松(一种肾上腺皮质激素)发生共价反应, 从而改变这类药物的药效和毒理。因此烟草尼古丁去甲基化反应机制的研究就成为国际烟草工业界和学术界关注的热点问题之一。

收稿日期: 2006-09-18; **接受日期**: 2006-12-04

* **通讯作者**。E-mail: hao@jlu.edu.cn

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t26-315



图1　尼古丁*N*-去甲基化及其产物的亚硝基化

Figure 1　Nicotine *N*-demethylation and nornicotine nitrosation

1　尼古丁去甲基化研究的历史

尼古丁*N*-去甲基过程是烟草体内重要的次生代谢反应之一，人们对尼古丁去甲基化反应机制的研究由来已久。自从20世纪40年代Dawson(1945)发现耳状烟草(*N. otophora*)和粘毛烟草(*N. tomentosformis*)中去甲基尼古丁来源于尼古丁的去甲基化作用以来，研究人员从化学角度和生物学角度对这一机制进行了广泛深入的研究，并取得了一定的成果。多数有关尼古丁去甲基化的研究是在具有活跃的尼古丁转化能力的烟草上进行的(Goossens et al., 2003)。研究人员普遍认为尼古丁转化的主要部位为叶片，去甲基尼古丁含量的增加与尼古丁含量的降低相伴随，但学术界对尼古丁去甲基途径及反应机制一直争论不休。化学家争论的焦点主要集中在“供体和受体之间的甲基转移”和“氧化脱甲基化”两种假说上，其中氧化脱甲基化假说又可进一步分为“吡咯环开环氧化过程”和“不经过开环直接氧化过程”两种推理。而生物学家更关心的是，无论是转甲基反应还是氧化去甲基反应，其反应的催化动力是什么，换句话说，这是一个一级化学反应还是酶促反应(Chelvarajan et al., 1993)?

2　甲基转移假说和氧化去甲基化假说

2.1　甲基转移假说

尼古丁向去甲基尼古丁的转化早期被认为是甲基转移反应，尼古丁吡咯环氮原子上的甲基转移到某种受体上生成去甲基尼古丁(Dawson, 1945)。Bose等(1956)报道了烟草(*N. tabacum*)的细胞粗匀浆在甲基受体乙醇胺存在的条件下能够促进尼古丁转化为去甲基尼古丁，在实验上对尼古丁的甲基转移假说提供了证据。Leete 和 Bell(1959)的研究结果进一步支持了这一看法。他们发现，用^{14}C-甲基标记的尼古丁喂饲烟草，90%的放射性活性出现在分离出的胆碱甲基上。据此，他们推测尼古丁甲基参与可逆转化是烟草植物体内的一种生化反应。另外，James(1975)在烟草(*N. tabacum*)的叶片细胞匀浆中发现氨基乙酸和乙醇胺与尼古丁生物转化活动相关，表明尼古丁去甲基化反应可能是甲基转移反应。然而，根据人们对化学反应的一般认识，一个甲基转移过程必须存在一个有效的甲基受体，在尼古丁*N*-去甲基化过程中尼古丁是甲基的供体，但是，至今人们还没有发现甲基受体。在烟草细胞匀浆中研究尼古丁转化为去甲基尼古丁时发现，添加诸如氨基乙酸、氨基乙醇和腐胺这些典型的甲基受体并没有促进尼古丁去甲基化作用，甚至氨基乙醇还表现出抑制效应(Hao and Yeoman, 1998)。

2.2　氧化去甲基化假说

1978年，Wallex和Nowacki研究发现尼古丁的去甲基化伴随着氧气的吸收。这表明尼古丁去甲基化反应可能是一种氧化反应(Wallex and Nowicki, 1978)。除此之外，还有许多其它证据支持氧化去甲基化假说。Kisaki和Tamaki(1961)报道，将含有(-)-尼古丁(天然尼古丁仅存在(-)消旋体)的烟草 *N. tabacum* 和烟草 *N. glutinosa*接穗嫁接到番茄的根上，结果发现部分去甲基

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t26-315

尼古丁发生了消旋作用。显然, 这种消旋作用发生在去甲基化过程中, 因为用(-)-nornicotine喂饲嫁接苗没有回收到发生旋光化学变化的去甲基尼古丁。为此, 他们认为尼古丁在去甲基过程中, 可能发生了吡咯烷环开环作用。

十年后, 这一推论被 Leete 和 Chedekel (1974)接受, 并得到进一步补充。他们提出了一种假说(图2), 解释来源于尼古丁的去甲基尼古丁所发生的部分消旋作用。根据这一假说, 去甲基化过程中会产生一种稳定的中间产物, 如(-)- 尼古丁 -*N*′- 氧化物((-)-nicotine-*N*′-oxide)。虽然这一化合物是动物体内尼古丁代谢常见的中间产物(Booth and Boyland, 1971; Nwosu et al., 1988), 但是在植物体内是否存在这一假定的中间产物目前尚不清楚。特别是有人用被标记的尼古丁-*N*′-氧化物喂饲烟草嫁接苗, 仅在尼古丁分子中而不是在去甲基尼古丁中检测到放射性(Nwosu et al., 1988), 这表明尼古丁- *N*′-氧化物似乎不可能是尼古丁去甲基化反应过程中的中间产物。那么尼古丁去甲基化过程中是否存在其它类型的中间产物呢？Hao和Yeoman (1996a)在烟草悬浮培养细胞的尼古丁去甲基化代谢研究中发现了一种化合物——甲酰去甲基尼古丁(*N*′-formylnornicotine), 由于-NH基团与甲醛的反应在有机合成中很容易发生, 因此当时推测甲酰去甲基尼古丁可能是去甲基尼古丁与细胞内甲醛进一步反应的产物, 而不是尼古丁去甲基化反应的中间产物。Bartholomeusz等(2005a)利用气质联用技术(GC-MS)对烟草(*N. plumbaginifolia*)悬浮细胞尼古丁去甲基化的研究进一步证明, 甲酰去甲基尼古丁不是尼古丁去甲基化反应的中间产物, 而是去甲基尼古丁的代谢产物。另外, Leete 和 Chedekel (1972)还发现了一个难以解释的现象, 在去甲基化过程中来源于C/H-2′尼古丁的去甲基尼古丁保留了手性碳上最初的氢原子, 而(+)-去甲基尼古丁却失去了氢原子。这一结果很难通过开环假说得到解释。

Leete(1977)提出了一种不涉及吡咯环开环的机制以修正自己先前的假说。根据这一假说, 消旋的去甲基尼古丁是通过(-)- 尼古丁的亚胺盐异构转换而形成的(图3)。虽然这种异构转换在体外是可能发生的, 但是没有证据支持他的这种假说。在烟草悬浮细胞中, 通过旋光光谱和手性气相色谱的研究数据表明, 来源于(-)-尼古丁的去甲基尼古丁只有一种对映体(Hao and Yeoman, 1996a)。Mesnard 等(2001)在对烟草(*N. plumbaginifolia*)悬浮培养细胞的研究中也发现, (±)-尼古丁的降解具有立体专一性, 分别产生各自的(±)-去甲基尼古丁。这些结果都表明, 烟草悬浮细胞的尼古丁去甲基化不涉及吡咯烷环的开环和随后的闭环过程。

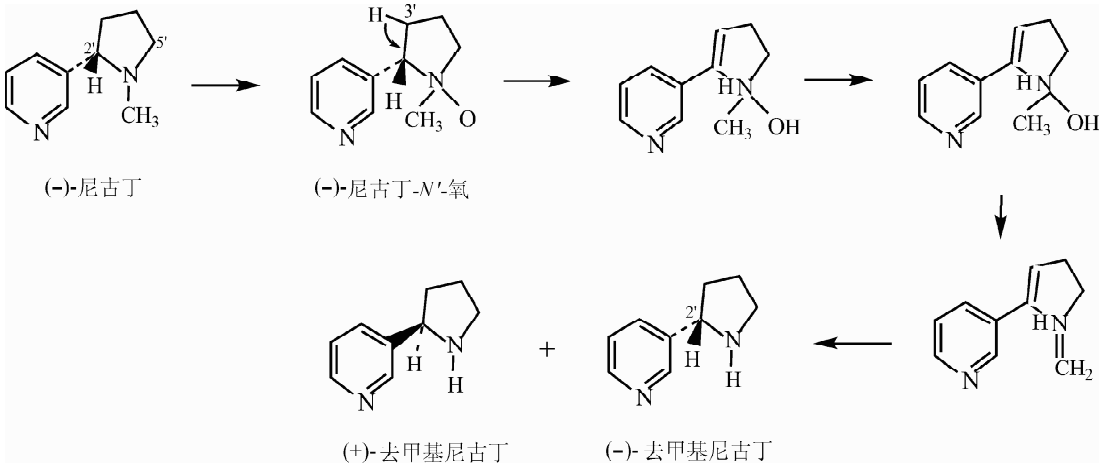

图2 尼古丁氧化去甲基化假说

Figure 2 Hypothesis for demethylation of nicotine (Leete and Chedekel, 1974)

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t26-315

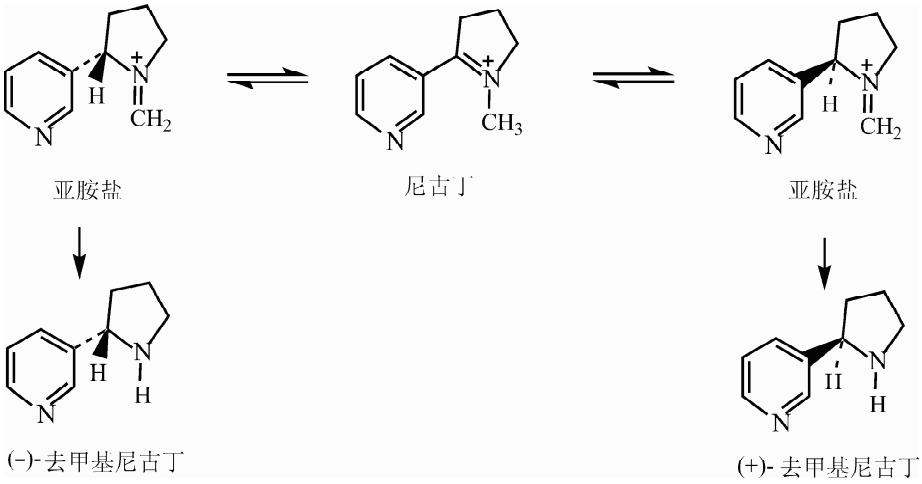

图3　尼古丁氧化去甲基化亚胺盐互变假说

Figure 3　Hypothesis for demethylation of nicotine to racemic nornicotine *via* the iminium salt (Leete, 1977)

3　酶促氧化去甲基化

早在1955年, Griffith 等在对烟草(*N. tabacum*)的一项育种研究中发现, 尼古丁去甲基化反应受单一的显性基因控制, 推测可能存在一种能够催化尼古丁去甲基化生成去甲基尼古丁的酶。但是这一位点是代表尼古丁 *N*-去甲基化酶基因本身还是代表去甲基尼古丁合成过程的上游调控因子, 还不得而知。1993年, Hao和 Yeoman 在烟草悬浮细胞中证明了催化尼古丁去甲基化酶的存在, 并对尼古丁去甲基化酶进行了阐述和部分的特性分析, 第一次提出尼古丁去甲基化反应是酶促过程(Hao and Yeoman, 1993, 1996b)。几乎在同一时间, 有研究报道在烟草植株中也发现了尼古丁去甲基化的酶(Chelvarajan et al.,1993)。

尼古丁去甲基化酶的存在被证实后, 尼古丁去甲基化反应的研究也被从化学领域带入生物学领域。随后, Hao 和 Yeoman (1996b)详细地表征了尼古丁去甲基化酶在无细胞匀浆中的理化性质(如 K_m 值、最适反应温度、pH 及辅因子等)及催化能力, 证明了尼古丁去甲基化需要NADPH和O_2, 并在亚细胞水平上将尼古丁去甲基化酶定位于微体组分中。而且, 交联葡聚糖凝胶过滤实验的结果表明, 小于5 000 MW的分子不可能参与*N′*-去甲基化(Hao and Yeoman, 1998)。这些研究发现进一步证实了尼古丁去甲基化过程是一种氧化去甲基化反应, 并且细胞色素 P450 酶系在此过程中起重要作用。据此, 一种新的酶促尼古丁氧化去甲基化机制被提出来(图4), 催化尼古丁去甲基化过程的酶可能是一种与细胞色素 P450 关联的单氧酶(有时也称混合功能氧化酶)。尼古丁经过氧化*N′*-去甲基化转化为去甲基尼古丁的过程起始于尼古丁分子上*N′*-甲基的羟基化作用。在这个过程中, 细胞色素 P450 在 NADPH-细胞色素 P450 还原酶(细胞色素P450 复合体的另一成员)的催化下被β-NADPH还原, 转移2个电子给氧分子, 随后一个氧原子生成水分子, 另一个氧原子同*N′*-甲基发生羟基化作用。生成的羟基衍生物不稳定, 可通过非酶促分解生成去甲基尼古丁和甲醛(Hao and Yeoman, 1998)。

近年来越来越多的文献报道倾向于尼古丁去甲基化反应过程发生在细胞内部(Bartholomeusz et al., 2005b), 是一个起始于*N′*-甲基羟基化的氧化脱甲基过程, *N′*-去甲基化不涉及吡咯环开环, 尼古丁被酶促氧化脱去甲基, 直接转化为去甲基尼古丁, 没有任何中间步骤和中间产物, 被氧化的甲基生成甲醛重新回到初级代谢

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t26-315

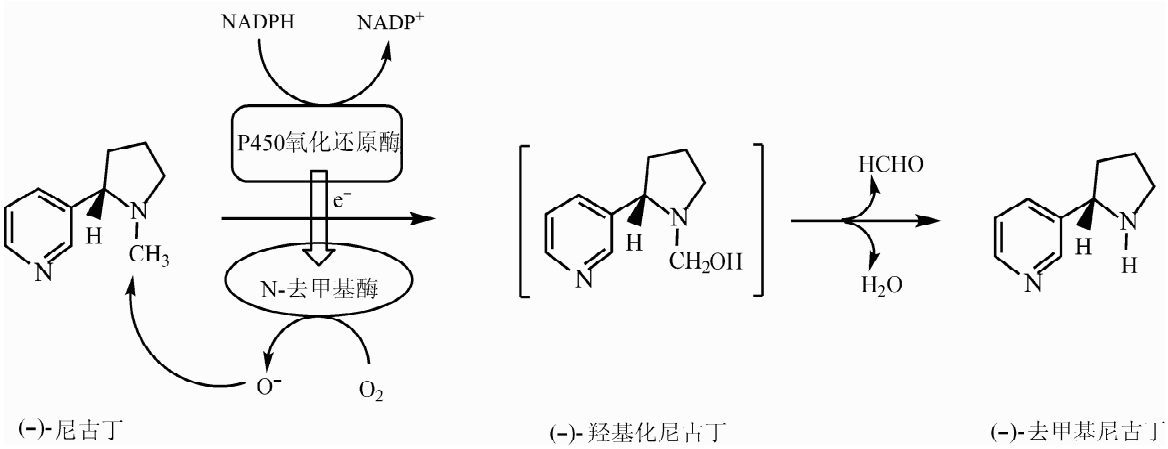

图4 酶促氧化去甲基化假说

Figure 4 Hypothesis for enzymatic demethylation of nicotine to nornicotine (Hao and Yeoman, 1998)

途径(Mesnard et al., 2002)。而且, 尼古丁去甲基化反应与细胞色素P450有着密不可分的关系, 尼古丁*N'*-去甲基化酶满足细胞色素P450酶系的一些标准, 如酶活性被四环素所抑制, 依赖NADPH等(Fannin et al., 2000)。但是, 由于尼古丁去甲基化酶可能是膜镶嵌蛋白, 离体不稳定, 分离纯化比较困难。因此, 能否纯化尼古丁去甲基化酶并解析其结构和理化性质, 或找到编码该酶的基因, 是深入研究尼古丁去甲基化过程, 对现有假说提出明确机制的关键。最近, 在世界最大的烟草公司美国菲利普·莫利斯公司的资助下, 美国肯塔基大学的研究人员利用以cDNA微阵列为基础的策略, 从烟草中成功地分离克隆出6个与细胞色素P450同源的基因, 被命名为*CYP82E2* 家族, 其同源性大于90%。其中的一个成员*CYB82E4v1*基因的编码产物被发现具有尼古丁去甲基化活性(Siminszky et al., 2005), 其产物是一种单氧酶。

尼古丁去甲基化反应是重要的植物次生代谢反应之一, 经过半个多世纪的研究, 对于尼古丁去甲基化反应机制的争论逐渐归结到酶促反应上来。由于还没有一个尼古丁*N*-去甲基化酶被成功分离纯化, 这个反应的调控机理还不十分清楚。细胞色素P450是一类分布广泛, 成员具有种属、结构和功能多样性的庞大酶系(冷欣夫和邱星辉, 2001)。上述细胞色素P450单加氧酶基因的发现为阐明尼古丁去甲基化反应的调控机理提供了可能。

4 影响烟草尼古丁去甲基化的因素

影响尼古丁去甲基化反应的因素很多, 比如基因型、生理状态和环境等。对这些影响因素的研究有助于全面深入的阐明尼古丁去甲基化及其代谢网络调控的分子机理。

4.1 基因型

烟属的许多种以降烟碱为生物碱的主要积累形式。烟属有60多个种, 其中30%-40%的种为降烟碱积累型, 如美花烟草(*N. sylvestris*)、绒毛状烟草(*N. tomentosformis*)和耳状烟草(*N. otophora*)。目前栽培的普通烟草(*N. tabacum*)是上述野生种的后代, 属于烟碱积累型, 正常情况下烟叶不具有烟碱去甲基酶活性, 但是在烟叶收割后的处理和加工过程中可以发生大量的烟碱向降烟碱的转化。

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t26-315

在栽培烟草中不同品种烟叶的降烟碱含量也存在差异。史宏志等(2001)对烤烟、白肋烟、沙姆逊香料烟、巴斯马香料烟、晒黄烟和黄花烟等不同品种、不同产地的76个烟样进行烟碱和降烟碱含量测定, 结果发现, 白肋烟和沙姆逊香料烟降烟碱占总生物碱比例高, 不同样品间变化幅度和变异性大。

Shi(2004)对白肋烟栽培品种烟碱转化性状的遗传行为进行了研究。他们将经过早期鉴定和筛选的TN90烟草分成非转化株、低转化株和高转化株 3 组。分别对它们的自交1代植株的烟碱转化能力进行测定, 发现所有来自高转化株的后代为转化株, 来自非转化株的后代大部分植株仍为非转化株, 但可出现约 10% 的低转化株, 这些新产生的转化株可能是由突变产生的。来自低转化株的后代, 可分离出具有不同烟碱转化能力的植株(Shi, 2004)。

Griffith等(1955)提出烟草的烟碱向降烟碱转化性状属简单遗传, 由 1 个或 2 个基因所控制。Mann 和 Webrew(1958)研究了普通烟草与野生烟草杂交后代的分离情况, 发现 2 个位点 *Cs* 和 *Ct* 决定烟叶的降烟碱含量(Mann and Webrew, 1958)。这 2 个位点分别来自祖先美花烟草和绒毛状烟草的基因组中。来自于绒毛状烟草的基因引起的去甲基作用发生在叶片的调制过程, 该基因在栽培品种中似乎表现为主效的且活泼的等位基因(Davis and Nielson, 1999)。

通过测定烟草杂交种的人工双倍体株系的生物碱含量, 发现具有 ctct 基因型的烟草植株约含有 3% - 9% 的仲胺类生物碱(主要为去甲基尼古丁); 具有 Ctct 基因型的植株含有17% - 51%的仲胺类生物碱; 具有CtCt基因型的植株含有 73% - 94% 仲胺类生物碱。他们还发现栽培烟草中的ct隐性基因高度不稳定, 极易发生显性突变, 导致烟草体内产生高含量的去甲基尼古丁。由于烟碱转化是由隐性基因向显性基因的突变, 其突变率较高, 而且这一频率在组织培养中显著增加, 因此不少学者认为烟碱转化基因中可能存在转座子(Shi, 2004)。

4.2 生理状态

烟碱向降烟碱的转化在绿叶中就开始了, 但在收获前转化程度较低。通常情况下, 高转化株在收获时的烟碱转化率不超过 15%。更高的烟碱转化反应发生在收割后的调制过程(前3个星期), 叶片变黄末期以后该反应变化较小(Shi, 2004)。这可能与烟叶细胞的死亡导致尼古丁去甲基酶活性终止有关。另外, 不同的组织和部位, 烟碱转化也存在差异, 研究发现在转化株调制后的烟叶中, 中肋的烟碱转化率显著高于叶片的烟碱转化率。而且, 叶片和中肋的烟碱转化率变化具有不同的模式, 叶片中烟碱转化高峰期在时间上要显著早于中肋。在变黄末期, 中肋的烟碱转化率开始超过叶片, 较高的转化率一直维持到调制结束后。这可能是由于中肋失水较慢, 干燥过程较长, 使得大量的烟碱转化为降烟碱(史宏志, 2006)。

4.3 机械损伤

生长于温室的烟草(*N. sylvestris*)叶片遭受损伤后, 生物碱含量比未受损伤的叶片高4倍。烟碱和降烟碱含量的升高开始于受伤状态后19小时, 到第9天达到最高, 14天后又恢复到对照水平。受伤植株叶片中生物碱含量的升高主要是由于进入叶片的木质部液体中的生物碱浓度增加了 10 倍所致。叶片受伤而导致的生物碱含量升高与体内生长素含量降低有关(左天觉, 1993)。

4.4 农艺和环境因素

一些农艺和环境因素对烟碱向降烟碱的转化起到一定作用。史宏志(2006)报道, 未打顶烟草叶片一般比打顶后的叶片具有更高的烟碱转化率。研究表明, 打顶后烟碱含量升高及烟碱转化率的降低与烟草体内激素水平变化有关。打顶后的烟草体内 IAA 含量急剧降低, GA_3 含量降低不明显, 而 ABA 含量迅速上升。作为第 1 信号, 打顶后IAA水平的下降沿木质部向下运输到根, 引起根部第二信使——ABA的增加和GA_3的降低(王瑞新, 1998), 促进了烟碱的合成。韩锦峰等(2001)发现, 打顶后喷施 IAA 或 GA_3 均可降低烟草中烟碱的含量, 表明增加的 IAA 浓度可能向根系传递了终止合成烟碱的信号。另外, 打顶后喷施ABA、6-卞基腺嘌呤(6-BA)和三碘苯甲酸(TIBA)均可增加烟碱的含量。其原因可能是6-BA诱

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t26-315

导根系生成的TIBA抑制了生长素的运输, 直接或间接引起烟碱含量的升高, 从而导致烟碱转化率相对降低。

史宏志(2006)还利用转化系研究了不同调制环境条件对烟碱转化率的影响, 结果发现, 高温高湿的调制条件可加速烟碱向降烟碱转化。

4.5 诱导剂

研究发现2-氯乙基磷酸和碳酸氢钠可在绿叶期诱导转化株叶片中烟碱向降烟碱转化。2-氯乙基磷酸是一种植物生长调节剂, 可在自然条件下释放乙烯。用其水溶液对烟草叶片进行处理可刺激转化株烟碱向降烟碱转化(史宏志, 2006)。另有研究表明, 碳酸氢钠可在最适合条件下使转化株的烟碱转化率达到特定基因型的最大转化程度。通常, 用碳酸氢钠在37°C下处理高转化株, 其成熟烟叶中95%的烟碱转化为降烟碱所需的时间为2-3天, 而绿叶中为4-6天(Shi et al., 2003)。

5 研究展望

半个世纪以来, 关于尼古丁去甲基化反应机制的研究取得了一定的成果, 但主要集中在化学研究领域和植物栽培生理等方面。从已经报道的相关研究推断, 烟草中烟碱向降烟碱的转化反应很可能与植物的衰老或非生物逆境生理相关联, 特定激素(如ABA等)依赖的细胞信号转导机制可能参与了该反应的调控。有关尼古丁去甲基化反应的基因表达调控、信号转导和调控网络的研究成为亟待解决的问题。今后, 尼古丁去甲基化酶的纯化、酶促反应机理的研究、酶的结构和功能的解析, 以及该酶基因的表达调控机制和探索该酶的抑制剂等方面将成为该领域研究的主要方向。

2002年美国菲莫公司向北卡罗来纳州大学提供1 760万美元, 在四年半的时间内完成烟草基因图谱绘制(http://www.bizjournals.com/stlouis/stories/2004/09/06/daily21.html)。目前, 北卡罗来纳州大学已经完成了烟草基因组项目的第一阶段。预计到2007年将完成此计划, 绘制出烟草90%的基因图谱。烟草基因图谱的完成和尼古丁去甲基化酶基因的发现无疑为尼古丁去甲基化反应机理研究铺平了道路。对于烟草农业而言, 在以上研究的基础上利用现代分子生物学手段, 如转基因技术、基因剔除技术和RNAi技术等, 结合传统育种方法有望在下一个十年内培育出显著降低降烟碱的烟草品种, 生产出显著降低NNN含量的低亚硝胺烟草制品。

参考文献

韩锦峰, 赫冬梅, 刘华山, 杨素勤, 王德勤, 张秀英 (2001). 不同植物激素处理方法对烤烟内烟碱含量的影响. 中国烟草学报 **7**, 22-25.

冷欣夫, 邱星辉 (2001). 细胞色素P450酶系的结构、功能与应用前景. 北京: 科学出版社. pp. 2-3.

史宏志, Bush LP, Wang J, 刘国顺 (2001). 我国不同类型烟叶烟碱向降烟碱转化研究. 中国烟草科学 **4**, 6-8.

史宏志, Bush LP, 王瑞华, Krauss M (2004). 烟草转化株烟碱含量对其向降烟碱转化程度的影响. 中国烟草学报 **10**, 28-33.

史宏志 (2006). 烟草烟碱去甲基化研究进展. 作物研究 **3,** 276-280.

王瑞新 (1998). 烟草生物碱的生物合成及代谢. 河南农业大学学报 **22**, 25-27, 34-37.

左天觉 (1993). 烟草的生产、生理和生物化学. 上海: 上海远东出版社. pp. 306-352.

Bartholomeusz TA, Bhogal RK, Molinie R, Felpin FX, Monique MA, Meier C, Drager B, Lebreton J, Roscher A, Robins RJ, Mesnard F (2005a). Nicotine demethylation in *Nicotiana plumbaginifolia* cell suspension cultures: *N'*-formylnornicotine is not involed. *Phytochemistry* **66**, 2432-2440.

Bartholomeusz TA, Molinié R, Roscher A, Felpin FX, Gillet F, Lebreton J, Mesnard F, Robins RJ (2005b). Stereoselectivity of the demethylation of nicotine piperidine homologues by *Nicotiana plumbaginifolia* cell suspension cultures. *Phytochemistry* **66**, 1890-1897.

Booth J, Boyland E (1971). Enzymatic oxidation of (-)-nicotine by guinea-pig tissues *in vitro*. *Biochem Pharmacol* **20**, 407-415.

Bose BC, De HN, Dalal IH (1956). Micro-methods for estimation of nicotine group of alkaloids in tobacco plants. *J Indian Chem Soc* **33**, 131-134.

Bush LP, Cui M, Shi H, Burton HR, Fannin FF, Lei L, Dye N (2001). Formation of tobacco-specific nitrosamines in air-cured

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t26-315

tobacco. *Rec Adv Tob Sci* **27**, 23-46.

Chelvarajan RL, Fannin FF, Bush LP (1993). Study of nicotine demethylation in *Nicotiana otophora*. *J Agric Food Chem* **41**, 858-862.

Dawson RF (1945). On the biosynthesis of nornicotine and anabasine. *J Am Chem Soc* **67**, 503-504.

Davis DL, Nielson MT (1999). Tobacco production, chemistry and technology. Oxford: Blackwell Science. pp. 285-287.

Dickerson FJ, Janda KD (2002). Glycation of the amyloid β-protein by a nicotine metabolite: a fortuitous chemical dynamic between smoking and Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 15084-15088.

Fannin FF, Shi HZ, Burton HR (2000). Nicotine to nornicotine conversion in burly tobacco. In: John D, ed. Agronomy and Phytopathology. Paris: St. Martin's Press. pp. 51-51.

Goossens A, Hakkinen ST, Laakso I (2003). A functional genomics approach toward the understanding of secondary metabolism in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 8595-8600.

Griffith RB, Valleau WD, Stokes GW (1955). Determination and inheritance of nicotine to nornicotine conversion in tobacco. *Science* **121**, 343-344.

Hao DY, Yeoman MM (1993). Bioconversion of added (-)-nicotine to (-)-nornicotine by cell suspension cultures of *Nicotiana tabacum* L. cv. 'Wisconsin-38'. In: Richard L, ed. Abstract and Poster Proceedings of the 15th International Botanical Congress. New York: Plenum Press. 4037-4369.

Hao DY, Yeoman MM (1996a). Mechanism of nicotine *N*-demethylation in tobacco cell suspension cultures. *Phytochemistry* **41**, 477-482.

Hao DY, Yeoman MM (1996b). Nicotine *N*-demethylase in cell-free preparations from tobacco cell cultures. *Phytochemistry* **42**, 325-329.

Hao DY, Yeoman MM (1998). Evidence in favour of an oxidative *N*-demethylation of nicotine to nornicotine in tobacco cell cultures. *J Plant Physiol* **152**, 420-426.

Hecht SS (1998). Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific *N*-nitrosamines. *Chem Res Toxicol* **11**, 559-603.

Hecht SS (2003). Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat Rev Cancer* **3**, 733-744.

James D (1975). Nicotine to nornicotine conversion. *Plant Physiol* **6** (Suppl), 56-56.

Kisaki T, Tamaki E (1961). Phytochemical studies on the tobacco alkaloids. I. Optical rotatory power of nornicotine. *Arch Biochem Biophys* **92**, 351-355.

Leete E, Bell VM (1959). The biogenesis of the *Nicotiana* alkaloids. VIII. The metabolism of nicotine in *N. tabacum*. *J Am Chem Soc* **81**, 4358-4359.

Leete E, Chedekel MR (1972). The aberrant formation of (-)-*N*-methylanabasine from *N*-methyl-Δ'-piperideinium chloride in *Nicotiana tabacum* and *N. glauca*. *Phytochemistry* **11**, 2751-2756.

Leete E, Chedekel MR (1974). Metaboism of nicotine in *Nicotiana tabacum* and *N. glauca*. *Phytochemistry* **13**, 1853-1859.

Leete E (1977). Biosynthesis and metabolism of the tobacco alkaloids. In: Smith TA, ed. Recent Advances in the Chemical Composition of Tobacco and Tobacco Smoke. New York: Academic Press. pp. 365-388.

Leete E (1983). Biosynthesis and metabolism of the tobacco alkaloids. In: Pelletier S, ed. Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives. Chichester: John Wiley and Sons. pp. 85-152.

Mann TJ, Webrew JA (1958). Inheritance of alkaloids in hybrids between flue-cured tobacco and related amphidiploids. *Crop Sci* **2**, 29-34.

Mesnard F, Girard S, Fliniaux O, Bhogal RK, Gillet F, Lebreton J, Fliniaux MA, Robins RJ (2001). Chiral specificity of the degradation of nicotine by *Nicotiana plumbaginifolia* cell suspension cultures. *Plant Sci* **161**, 1011-1018.

Mesnard F, Roscher A, Garlick AP, Girard S, Baguet E, Arroo RR, Lebreton J, Robins RJ, Ratcliffe G (2002). Evidence for the involvement of tetrahydrofolate in the demethylation of nicotine by *Nicotiana plumbaginifolia* cell-suspension cultures. *Planta* **214**, 911-919.

Nwosu CG, Godin CS, Houdi AA, Damani LA, Crooks PA (1988). Enantioselective metabolism during constinuous administration of *S*-(*levo*)-and *R*-(*dextro*)-nicotine isomers to guinea-pigs. *J Pharm Pharmacol* **40**, 862-869.

Shi H, Kalengamaliro NE, Krauss MR, Hempfling WP, Gadani F (2003). Stimulation of nicotine demethylation by $NaHCO_3$ treatment using greenhouse-grown burley tobacco. *J Agric Food*

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t26-315

Chem **51**, 7679-7683.

Shi HZ (2004). Advance in nicotine to nornicotine conversion in tobacco. *Tob Sci Tec* **11**, 17-22.

Siminszky B, Gavilano L, Bowen WS, Dewey ER (2005). Conversion of nicotine to nornicotine in *Nicotiana tabacum* is mediated by CYP82E4, a cytochrome P450 monooxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 14919-14924.

Wallex GR, Nowacki EK (1978). Metabolic(catabolic) modifications of alkaloids by plants. In: alkaloid biology and metabolism in plant. New York & London: Plenum Press. pp. 183-250.

Mechanism of Nicotine *N*-demethylation to Nornicotine in Tobacco

Baiyi An [1], Jinghui Xi [1, 2], Shuo Yang [1], Dongyun Hao[1*]

[1]*Key Laboratory for Molecular Enzymology & Engineering, the Ministry of Education, Jilin University, Changchun 130021, China*

[2]*College of Plant Science, Jilin University, Changchun 130062, China*

Abstract Nornicotine is produced by the *N*-demethylation of nicotine during the post-harvest treatment of tobacco leaves. Nornicotine in tobacco serves as the precursor in synthesis of the well-characterized carcinogen *N'*-nitrosonornicotine (NNN), one of the tobacco-specific nitrosamines (TSNAs), and consequently damages the health of tobacco smokers and passive smokers. Studies of the mechanism of nicotine *N*-demethylation have, over the last decades, attracted serious attention because of its importance in plant physiological research and commerce. In this review, we discuss the history and mechanisms of nicotine *N*-demethylation and the factors that affect this enzymatic reaction. The current advances in nicotine *N*-demethylation in tobacco provide important insights into improving the quality of tobacco and developing hazard-reduced tobacco products.

Key words *N*-demethylation, nicotine, nicotine *N*-demethylase , nornicotine, tobacco

An BY, Xi JH, Yang S, Hao DY (2007). Mechanism of nicotine *N*-demethylation to nornicotine in tobacco. *Chin Bull Bot* **24**, 544-552.

* Author for correspondence. E-mail: hao@jlu.edu.cn

(**责任编辑**: **孙冬花**)

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t26-315