http://www.journals.zju.edu.cn/med
DOI:10.3785/j.issn.1008-9292.2016.09.11

·原　著·

不同模式口鼻式吸烟诱导急性肺损伤的实验研究

肖卫强[1],周国俊[1],许成云[2],徐　建[1],黄芳芳[1],卢昕博[1],李　霞[1],吴希美[2]
1. 浙江中烟工业有限责任公司技术中心, 浙江 杭州 310024
2. 浙江大学医学院药理学系, 浙江 杭州 310058

[摘　要]　**目的**:研究不同抽吸模式的口鼻式吸烟方式诱导大鼠急性肺损伤的效应。**方法**:市售焦油含量分别为1、5、11 mg的卷烟按照加拿大深度抽吸模式(深度抽吸)及11 mg焦油含量的卷烟按国际标准抽吸模式(国标抽吸)抽吸,并以空气为载气将卷烟烟雾载入大鼠口鼻暴露塔中;大鼠固定于固定器中,仅口鼻暴露于主流烟气中,吸烟28 d后处死大鼠进行左肺肺泡灌洗,肺泡灌洗液用于炎症细胞计数和分类以及ELISA检测炎症因子IL-1β和TNF-α水平;右肺下叶进行组织病理学观察;右肺上叶冻存并用于髓过氧化物酶(MPO)、超氧化物歧化酶(SOD)活性及还原型谷胱甘肽(GSH)、活性氧和丙二醛含量检测。**结果**:同等抽吸模式下,大鼠吸入卷烟的烟气质量浓度与样品卷烟盒标记的焦油等有害物质含量成正比。大鼠吸烟一周后即出现体质量下降。深度抽吸及国标抽吸11 mg焦油含量的卷烟均能显著诱导大鼠肺部巨噬细胞、淋巴细胞和中性粒细胞浸润,IL-1β和TNF-α分泌增加,以及MPO活性提高(均 $P<0.05$);反映肺组织氧化应激水平的GSH含量和SOD活性均显著下降(均 $P<0.05$),活性氧和丙二醛含量则显著上升(均 $P<0.05$)。深度抽吸5 mg焦油含量的卷烟能显著诱导淋巴细胞和中性粒细胞浸润、IL-1β和TNF-α分泌以及肺组织MPO活性上升,同时能显著促使肺组织中GSH含量及SOD活性下降以及活性氧和丙二醛含量增加(均 $P<0.05$);但深度抽吸1 mg焦油含量的卷烟无明显诱导炎症细胞浸润等作用。**结论**:口鼻式吸烟方式可以成功诱导大鼠肺损伤模型,大鼠肺部炎症细胞浸润程度、炎症因子分泌及氧化应激水平与主流烟气中有害物质含量成正比。

[关键词]　吸烟/副作用; 肺/损伤; 烟草; 疾病模型,动物
[中图分类号]　R563; R965　　[文献标志码]　A

Cigarette smoking in different manners induces acute lung injury in rats

收稿日期:2015-09-15　　**接受日期**:2016-01-22
基金项目:浙江省重大科技专项计划(2013C03050);国家重点基础研究发展计划(973计划)(2011CB944403)
第一作者:肖卫强(1984—),男,硕士,工程师,主要从事烟草化学和吸烟与健康研究;E-mail: xiaowq@zjtobacco.com;http://orcid.org/0000-0001-6187-5837
通讯作者:周国俊(1973—),男,博士,研究员,主要从事烟草化学和吸烟与健康研究;E-mail: zhougj@zjtobacco.com;http://orcid.org/0000-0002-7377-546X. 吴希美(1970—)男,博士,教授,主要从事呼吸药理研究;E-mail: xiwu@zju.edu.cn;http://orcid.org/ 0000-0002-3316-893X

XIAO Weiqiang[1], ZHOU Guojun[1], XU Chengyun[2], XU Jian[1], HUANG Fangfang[1], LU Xinbo[1], LI Xia[1], WU Ximei[2] (*1. Technology Center, China Tobacco Zhejiang Industrial Co. Ltd, Hangzhou 310024, China; 2. Department of Pharmacology, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058, China*)
Corresponding author: ZHOU Guojun, E-mail: zhougj@zjtobacco.com, http://orcid.org/0000-0002-7377-546X. WU Ximei, E-mail: xiwu@zju.edu.cn, http://orcid.org/0000-0002-3316-893X

[**Abstract**] **Objective**: To investigate the effects of cigarette smoking in different manners on acute lung injury in rats. **Methods**: The commercially available cigarettes with tar of 1,5, 11 mg were smoked in Canada depth smoking (health canada method, HCM) manner, and those with tar of 11 mg were also smoked in international standard (ISO) smoking manner. Rats were fixed and exposed to mainstream in a manner of nose-mouth exposure. After 28 days, the bronchoalveolar lavage fluids from left lung were collected for counting and classification of inflammatory cells and determination of pro-inflammatory cytokines IL-1β and TNF-α. The right lungs were subjected to histological examination and determination of myeloperoxidase (MPO) and superoxide dismutase (SOD) activities and glutathione, reactive oxygen species (ROS) and malondialdehyde (MDA) levels. **Results**: In both HCM and ISO manners, the degree of lung injury was closely related to the tar content of cigarettes, and significant decrease in the body weight of rats was observed after smoking for one week. In a HCM manner, smoking with cigarette of 11 mg tar resulted in robust infiltration of macrophages, lymphocytes and neutrophils into lungs, significant increase in IL-1β and TNF-α levels and MPO activities, and significant decrease in GSH levels and SOD activities and increase in ROS and MDA levels (all $P<0.05$). Smoking with cigarette of 5 mg tar led to moderate increase in IL-1β and TNF-α levels, and MPO activities (all $P<0.05$), and moderate decrease in GSH levels and SOD activities and increase of ROS and MDA levels (all $P<0.05$). However, smoking with cigarette of 1 mg tar affected neither inflammatory cell infiltration nor IL-1β and TNF-α levels. **Conclusion**: Cigarette smoking in nose-mouth exposure manner can induce acute lung injury in rats; and the degree of lung injury is closely related to the content of tar and other hazards in cigarettes.

[**Key words**] Smoking/adverse effects; Lung/injuries; Tobacco; Disease models, animal

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2016,45(5):522-529.]

卷烟中含大量有害物质,这些物质能在肺部长期滞留,从而导致炎症反应,产生肺部损伤[1-2]。研究发现,即使没有出现气流受限,健康吸烟者肺部仍然有轻度炎症。Witschi 等[3-4]使用 AJ 系小鼠成功建立了吸烟导致肺癌的动物模型,该模型的适用性已被不同的实验室所证实。后续有大量有关吸烟导致实验动物肺部损伤的研究,但大多采用持续烟气全身暴露或固定烟气浓度暴露的方式进行,这种方式与人体吸烟方式相距甚远[5-8]。

焦油是卷烟烟气中的主要有害物质,是烟丝中糖类、蛋白质等有机物质在缺氧条件下不完全燃烧的产物,由多种烃及烃的氧化物、硫化物和氮化物等复杂化合物组成。虽然卷烟焦油中有害成分含量不高,但种类众多,如苯并芘等多环芳烃(PAH)、酚类化合物及其衍生物、各种羟基自由基等。这些有害物质进入人体内会导致肺癌、口腔癌、冠心病、肺部慢性炎症等多种疾病,严重危害人体健康,因此世界各国对卷烟中焦油的含量

进行了明确的法律限定,并将其作为衡量卷烟质量和安全性的主要标准之一[9-11]。目前市售卷烟的烟盒上标有的物质含量均指用国际标准抽吸模式(简称"国标抽吸")测得的主流烟气中焦油、一氧化碳及尼古丁的含量。本研究采用吸烟机结合大鼠口鼻暴露塔的方式,观察国标抽吸和加拿大深度抽吸模式(简称"深度抽吸")诱导大鼠肺损伤,通过对吸烟大鼠体质量变化、肺部炎症细胞浸润、炎症因子分泌及肺组织中氧化应激因子水平等的评估,判断急性肺损伤的程度,以期改进吸烟诱导的肺损伤动物模型。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

吸烟机(HRH-SM120)及大鼠口鼻暴露系统(HRH-3025)购自北京慧荣和科技有限公司;切片机(RM2235)购自徕卡显微系统(上海)贸易有限公司;IL-1β 和 TNF-α ELISA 试剂盒购自杭州联科生物技术股份有限公司;髓过氧化物酶(MPO)、还原型谷胱甘肽(GSH)、超氧化物歧化酶(SOD)、活性氧、丙二醛检测试剂盒购自南京建成生物科技有限公司;其它试剂均为国产分析纯。

1.2 卷烟样品

卷烟样品为市售的烤烟型卷烟,焦油含量分别为 11、5、1 mg,实验前在(22 ± 1)℃、相对湿度为(60 ± 2)% 的条件下平衡 48 h。

1.3 实验动物

SD 雄性大鼠 50 只,体质量为(220 ± 20)g,购自上海斯莱克实验动物有限公司。吸烟时大鼠均饲养于空气洁净度为十万级的动物房,室温为(21 ± 1)℃,湿度为(58 ± 4)%,昼夜周期为 12 h/12 h。分为五组:空白对照组、1 mg 深度抽吸组、5 mg深度抽吸组、11 mg 深度抽吸组、11 mg 国标抽吸组,每组 10 只。

1.4 大鼠口鼻吸烟方法

采用大鼠口鼻暴露系统,维持载气流量 8 L/min,抽气流量 9.5 L/min,氧气浓度(20 ± 0.5)%,温度(24 ± 2)℃,相对湿度 60% ~80%。采用单孔道吸烟机,经深度抽吸或国标抽吸产生的卷烟烟气,经空气载入口鼻暴露塔后,经过大鼠口鼻暴露口。在此过程中大鼠吸入烟气,多余未吸入烟气及大鼠呼出烟气随载气排出,同时测定大鼠口鼻暴露口卷烟烟雾质量浓度。过程示意见图 1。大鼠每天连续吸烟 20 支,共持续28 d;空白对照组抽吸空气。深度抽吸参数:抽吸体积 55 mL,抽吸间隔时间 30 s,抽吸持续时间 2 s;国标抽吸参数:抽吸体积 35 mL,抽吸间隔 60 s,抽吸时间 2 s[12]。1 mg 深度抽吸组、5 mg 深度抽吸组、11 mg 深度抽吸组、11 mg 国标抽吸组分别采用含焦油为 1、5、11、11 mg 的卷烟进行抽吸。

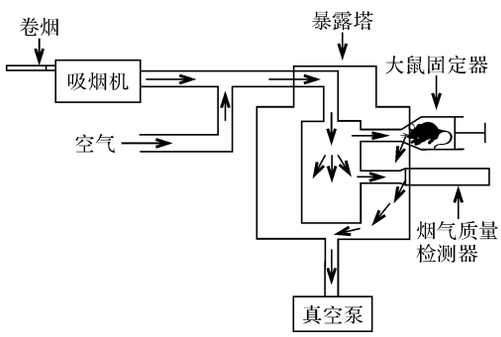

图 1 吸烟机结合大鼠口鼻暴露塔吸烟示意图

Figure 1 Schematic diagram of rats smoking by way of smoking machine combined with the nose and mouth expose tower

1.5 肺泡灌洗液收集和细胞学检测

最后一次吸烟后 18 h 麻醉处死大鼠,左肺采用 PBS 进行肺泡灌洗,取回收率大于 80% 的肺泡灌洗液进行细胞计数,并离心取上清液。上清液及右上两叶肺组织冻存于 -80 ℃;细胞沉淀涂片后,进行瑞氏—吉姆萨染色及分类计数。

1.6 HE 染色肺组织病理学检测

右肺下叶肺组织经 10% 甲醛固定一周后,取材,脱水,透明,石蜡包埋,切片并进行 HE 染色,观察肺部炎症细胞浸润。

1.7 ELISA 法检测 IL-1β 及 TNF-α 含量

取冻存于 -80 ℃的灌洗液上清液,冰上融化后,按照说明书进行 ELISA 检测。

1.8 MPO、GSH、SOD、活性氧、丙二醛浓度检测

取冻存于 -80 ℃的右肺上叶肺组织,精密称重,匀浆后取上清液,按检测试剂盒说明书对大鼠右肺上叶肺组织中的 MPO、GSH、SOD、活性氧、丙二醛浓度进行检测。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 16.0 软件包进行统计分析。实验数据采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),多个样本均数间比较采用 Student-Newman-Keuls(SNK)检验;统