

香烟烟雾染毒改良方法的应用*

蒋新格¹ 赵晨阳² 樊兴¹ 陈子龙¹ 党如意¹ 陈玲³

(1.重庆医科大学临床医学院,重庆 400016)(2.重庆医科大学公共卫生与管理学院,重庆 400016)

(3.重庆医科大学实验教学管理中心,重庆 400016)

摘要:目的 探讨烟雾染毒的改良方法对小鼠存活率的影响。方法 在普通烟雾染毒方法的基础上,改进制作一种可向染毒箱底部通入空气以增加氧气量,并能同时监测温度的染毒装置。将实验对象昆明系小鼠分为对照组(在普通染毒装置中,不染毒),染毒1组(普通染毒方法),染毒2组(改进的染毒方法)进行实验,应用统计软件SPSS20.0分析比较各组之间小鼠的生存率、染毒装置内氧浓度以及总悬浮颗粒浓度变化。结果 共选取160只昆明系小鼠,并随机分为对照组40只,染毒1组60只,染毒2组60只,均雌雄各半。实验结果发现,染毒2组小鼠的存活率显著高于染毒1组,差异具有统计学意义($\chi^2=7.647 P=0.02<0.05$),染毒1组装置内的氧浓度明显低于染毒2组氧浓度,且染毒2组装置内的氧浓度波动小,差异具有统计学意义($F=5.260, P=0.045<0.05$)。染毒1组和染毒2组装置内的TSP浓度差异没有统计学意义,说明改进的烟雾染毒装置不影响毒物的剂量和染毒过程。结论 改良的烟雾染毒装置会使实验动物在非药物因素作用下的死亡率降低,且不影响实验染毒过程。

关键词:烟雾染毒;存活率;氧浓度

中图分类号:R114 文献标识码:A 文章编号:1006-6179(2019)06-0055-04

DOI:10.3969/j.issn.1006-6179.2019.06.011

我国是世界上最大的烟草生产国和消费国,吸烟是我国目前最突出的公共卫生问题之一^[1-2]。随着近年来空气中的PM_{2.5}等可吸入粉尘颗粒对人体呼吸道系统的影响越来越大,因此对于环境中烟雾的污染造成呼吸道系统疾病的研究成为目前学术探讨的热点^[3-7]。烟雾染毒的方法作为研究各类疾病的重要手段,动物染毒实验是否成功直接关系到实验的成败。随着仪器技术的发展,现在市面上有染毒效果良好的染毒柜出售,但是染毒柜因为价格高,操作复杂等原因让许多科研机构、学校等不能选择。虽然除了染毒柜,目前也有许多其他的简易染毒方式可以选择,但是现有的染毒方法很多无法排除因缺氧,温度等干扰因素对实验动物存活率的影响,这样会造成实验动物意外死亡率增高,实验数据丧失,减弱了实验的说服力。因此研究一种新式简易的烟雾染毒方法是开展研究烟雾导致相关疾病实验室的亟需解决的关键问题。

为了解决这一问题,本文在原有的染毒方法基

础上,设计了一个新型的箱状实验装置。使用压缩空气泵向箱体内注入氧气,通过控制氧气的吸入及排出,使得实验装置更加稳定。为今后能设计出方便控制氧气流入,提高实验数据的准确性的简易染毒装置提供参考。

1 材料与方法

1.1 动物及试剂

实验动物选用SPF级雌性昆明系小鼠160只,体质量20~22g,购自重庆医科大学实验动物中心,实验动物生产许可编号:SCXK(渝)2017-0001。主要试剂为五牛牌香烟。

1.2 染毒装置的组成

本装置用可封闭染毒箱为实验进行场所,染毒箱左右两侧各开一孔,且对称分布,两孔为香烟燃烧烟雾进入的孔道。染毒箱底部正中开一孔,为压缩空气泵通空气入口。点燃香烟由两孔送入烟雾,因

收稿日期:2019-03-22

* 基金项目:重庆医科大学实验教学管理中心“MTS”项目(No.LTMCMTS201901)

作者简介:蒋新格(1996—),女,研究方向:肺癌发生影响因素.E-mail:824093874@qq.com

通信作者:陈玲(1987—),女,实验师,研究方向:慢性分子流行病学.E-mail:395918627@qq.com

两侧通入烟雾量相同,两孔对称分布且染毒箱封闭性好,可保证染毒箱里烟雾浓度恒定。底部孔用压缩空气泵连接长管通入空气。简易装置如图 1 所示。

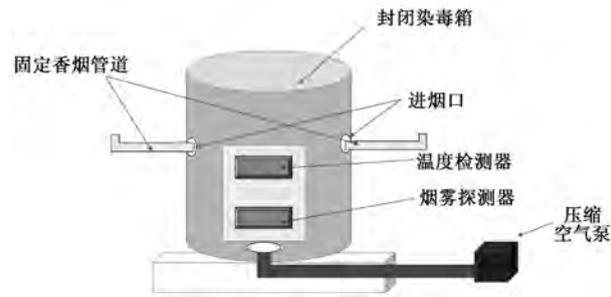


图 1 改良烟雾染毒箱示意图

Fig.1 The schematic diagram of improved smoke poison box

1.3 方法

1.3.1 分组及染毒: 动物适应性喂养 1 周后按随机数字表法分为对照组 40 只小鼠(雌雄各半)。染毒 1 组小鼠 60 只(雌雄各半)分笼置于染毒箱内,采用呼吸道静式染毒。染毒 2 组小鼠 60 只(雌雄各半)分笼置于改良后的染毒箱内,采用呼吸道静式染毒,同时开启压缩气泵通过底部管道运送空气入染毒箱内。实验共进行 1 个月,每日染毒 1 次,每次进行 2 h,每日染毒给药分 7 次,每次点燃 2 支香烟,香烟燃尽后再补充同样剂量的两支香烟于左右两烟雾孔,叠加后总用量为 14 支。点燃香烟置于染毒箱上两孔。对照组小鼠每日相同时间被放置于染毒箱内,但未进行染毒。实验期间观察实验动物的情绪状态。

1.3.2 标本采集及处理: 实验过程中记录小鼠死亡及生命体征异常现象。在实验结束后,用断颈法处理剩余小鼠。

1.4 统计方法

采用分析软件 SPSS 20.0 对数据进行统计学分析。计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用方差分析。计数资料用采用率(%)表示,进行卡方检验,检验水准为 $P=0.05$ 。

2 结果

2.1 一般情况比较

对照组小鼠生命体征正常,精神状态良好,活动敏捷,体质量增加明显;染毒组小鼠精神状态较

差,倦怠懒动,出现不同程度的饮食饮水量减少,其中染毒 1 组出现不良反应更为明显。染毒期间可见染毒箱内温度随染毒时间的增加而有轻微的升高。

2.2 各组实验动物存活情况

在相同时间里,经过不同的染毒方式,小鼠均有不同程度的死亡。在染毒 30 d 后,染毒 1 组小鼠死亡数 15 只,染毒 2 组雄鼠死亡数为 6 只。染毒 1 组小鼠存活率显著低于染毒 2 组小鼠,小鼠存活率差异具有统计学意义($\chi^2=7.647 P=0.02<0.05$),见表 1。

表 1 各组实验动物存活情况

Table 1 The survive rate of the experimental animals

组别	染毒前/%	染毒 15 d/%	染毒 30 d/%
对照组	40(100%)	38(95.00%)	37(92.5%)
染毒 1 组	60(100%)	52(86.67%)	45(75%)
染毒 2 组	60(100%)	56(93.3%)	54(90.0%)

2.3 各染毒小组染毒过程中染毒箱氧气浓度变化

在实验进行的第 1、6、12、18、24、30 天时,分别对染毒 1 组和染毒 2 组在每次染毒结束前对其染毒箱内氧浓度含量百分比进行测量,测量结果见表 2。染毒 1 组的箱内平均氧浓度含量百分比为(16.03 \pm 1.03)%,染毒 2 组箱内平均氧浓度含量百分比为(18.68 \pm 0.31)%,染毒 1 组装置内的氧浓度含量明显低于染毒 2 组氧浓度,且染毒 2 组装置内的氧浓度含量波动小,差异具有统计学意义($F=5.260, P=0.045<0.05$)。

表 2 各组染毒箱内氧浓度含量百分比

Table 2 Percentage of oxygen concentration in each infected box

测量日期	染毒 1 组/%	染毒 2 组/%
第 1 天	16.4	18.4
第 6 天	16.5	18.7
第 7 天	17.1	18.7
第 18 天	14.2	18.8
第 24 天	16.5	18.3
第 30 天	15.5	19.2

2.4 总悬浮颗粒物(TSP)浓度

每日染毒时,分 7 次燃烟,每次点燃 2 支,且在每次染毒结束后用粉尘采样器测量各组染毒箱内 TSP 浓度,进行结果的对比见表 3。结果显示染毒 1 组和染毒 2 组装置内的 TSP 浓度差异没有统计学意义($P>0.05$),说明改进的烟雾染毒装置不影响毒物的剂量和染毒过程。

表3 染毒各组染毒箱 TSP 浓度对比
Table 3 Comparison of TSP concentration
in each infected group

剂量	染毒1组 TSP 浓度/ (mg/m ³)	染毒2组 TSP 浓度/ (mg/m ³)
2支烟	50	52
6支烟	160	168
8支烟	225	227
14支烟	325	332

3 讨论

目前对于进行简易烟雾吸入性损伤动物模型的研究大部分是将烟雾直接释放到相对封闭的染毒箱内^[8],无法避免实验过程中动物非实验效果死亡,比如缺氧、温度过高等不利因素影响。市面上虽然有贩卖的染毒柜,但是价格昂贵,操作复杂,对技术要求高,工作量较大^[9]。杨永国等^[10]在运用静式染毒法对正己烷吸入致大鼠肺和肝肾损害的研究中进行了相关实验探究,因防止毒气外溢使用封闭染毒箱,但封闭环境必然会导致在实验过程中染毒箱中氧气量下降,导致实验动物呼吸受阻,最终可能使实验动物非实验效果死亡。何志义等^[11]在研究香烟对小鼠 C₂C₁₂成肌细胞分化的影响中采用简易冷凝装置收集香烟烟雾液体,再直接进行细胞培养,这种方法没有能够真实地模拟烟雾对实验对象的影响,烟雾和烟雾液体两种物理形态也可能会对实验对象产生不同的实验效果。因此,我们期望在简易染毒箱的基础上进行改良,使其成本低廉、制作简单、配气精确,可以重复使用,能够满足动式染毒实验需求,使之既方便又能有效地达到实验目的。

本研究发现,染毒1和染毒2组小鼠精神状态均较差,倦怠懒动,甚至出现昏迷等不良反应,在染毒过程中出现死亡现象,而且研究发现染毒1组小鼠的不良反应更严重,且死亡率显著高于染毒2组,又由于染毒1组氧浓度明显低于染毒2组,因此可以推测缺氧是导致小鼠非实验因素死亡的一个重要因素,本研究中随着染毒时间的延长,染毒箱内的温度有轻微的升高,因此也不排除动物死亡有可能是缺氧和温度升高共同作用的结果。

简易染毒装置是在普通染毒箱的基础上改进了对氧浓度的调控和温度的监测而实现的。实验结果表明染毒1和染毒2组的装置内的 TSP 浓度变化无

明显差异,避免了改良设备对染毒剂量本身的影响。在不改变烟雾浓度的情况下,极大地提高了实验过程中实验动物非药理性的存活率,为实验的继续进行提供了可能。因此,改良后的简易染毒箱具有较强的实验可行性。

吸烟造成的烟雾和环境中的总悬浮颗粒,例如 PM_{2.5} 等粉尘颗粒与呼吸系统多种疾病的发生发展密切相关,但至今对其致病机制仍不是很清楚^[11]。近年来越来越多的学者开始关注烟雾引起疾病的机制研究^[12-14],同时目前很多大学生也在开展这个方面的自主创新实验,成功地制作烟雾染毒动物模型是研究的关键一步,张素萍等人^[15]在《香烟烟雾气体体外染毒方法的建立》一文中提到国内已经研制出 TRANSWELL 膜技术,可使细胞直接暴露于各种气体环境进行染毒,但由于此技术还不成熟且价格昂贵,使许多欲使用者止步不前。本文改进制作的简易染毒箱可以运用于烟雾染毒模型的构建,实验成本低廉,实践性极高。

参考文献

- [1] Gurura J G, Girish N. Tobacco use amongst children in Karnataka [J]. Indian J Pediatr, 2007, 74 (12): 1095-1098.
- [2] Huxley R R, Woodward M. Cigarette smoking as a risk factor for coronary heart disease in women compared with men: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies [J]. Lancet, 2011, 378 (97): 1297-1305. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60781-2.
- [3] Brunekreef B, Holgate S T. Air pollution and health [J]. Lancet, 2002, 360 (9341): 1233.
- [4] Wynder E L, Hoffmann D. Re: Cigarette smoking and the histopathology of lung cancer [J]. Natl Cancer Inst, 1998, 90 (19): 1486-1488.
- [5] Kuper H, Boffetta P, Adami H O. Tobacco use and cancer causation: association by tumor type [J]. Intern Med, 2002, 252 (3): 206-224.
- [6] Hecht S S. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco induce cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3 (10): 733-744.
- [7] 毕波,周昆,郑赛晶,等. 卷烟诱导小鼠咳嗽和痰液分泌模型的建立 [J]. 实验动物科学, 2010, 27 (2): 10-12.
- [8] 孙磊,安辉,郑有科,等. 模拟密闭舱室烟雾吸入染毒装置的研制 [J]. 第三军医大学学报, 2009, 31 (4): 290-293.
- [9] 李阳青. 被动吸烟动物 COPD 模型染毒系统的设计 [J]. 《中国医疗器械信息》, 2016, (4): 23-23.
- [10] 杨永国,黄中新,程欣. 正己烷吸入致大鼠肺和肝肾损害的研究 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2006, 24 (5): 292-294.
- [11] 何志义,梁毅,梁秋丽,等. 香烟对小鼠 C₂C₁₂成肌细胞分化

- 的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2010, **26**(5):881-884.
- [12] 周问渠, 李冰, 洪玮. 香烟烟雾对人支气管上皮细胞氧化应激作用研究[J]. 中国现代医生, 2010, **48**(6):24-25.
- [13] 张宏, 孟亚娟, 斯琴, 等. 烟雾吸入对小鼠弹性蛋白酶性肺气肿的影响[J]. 实验动物科学与管理, 1999(4):1-6.
- [14] 付强, 成静, 韩中博, 等. 香烟烟雾提取物对人呼吸道上皮细胞 DNA 损伤和凋亡的影响[J]. 癌症, 2006, **25**(10):1191-1197.
- [15] 张素萍, 刘海云, 李建祥, 等. 香烟烟雾气体体外染毒方法的建立[C]// 上海: 全国环境与职业医学研究生学术研讨会暨复旦大学博士生论坛: 环境与职业医学. 2008.

Application of Improved Cigarette Smoke Exposure Method

JIANG Xinge¹, ZHAO Chenyang², FAN Xin¹, CHENG Zilong¹, DANG Ruyi¹, CHEN Ling³

(1. School of clinical medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

(2. School of public health and management, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

(3. Experimental teaching management center of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of improved method of smoke exposure on survival rate in mice. **Method** Based on the common smoke exposure method, we have made an infection device which capable introducing air into the bottom of the poisoning box that in order to increase the amount of oxygen and monitor the temperature simultaneously. The Kunming mice (the experimental subjects) were divided into the control group (in the common poisoning device, no poisoning), the poisoning group 1 (common poisoning method), the poisoning group 2 (the improved poisoning method), and use the statistical software spss20.0 analysis to compare the survival rate, the oxygen concentration in the poisoning device, and the total suspended particle concentration of mice in each group (the control group, poisoning group 1, poisoning group 2). **Result** There were total of 160 Kunming mice, and divided into the control group ($n = 40$), the poisoning group 1 ($n = 60$), and the poisoning group 2 ($n = 60$) randomly, both with male and female. The experimental results showed that the survival rate of the mice in the poisoning group 2 was significantly higher than that in poisoning group 1 ($\chi^2 = 7.647 P = 0.02 < 0.05$). The oxygen concentration in poisoning group 1 was significantly lower than that in poisoning group 2, and the oxygen concentration fluctuation in the poisoning group 2 was small, and the difference was statistically significant ($F = 5.260, P = 0.045 < 0.05$). There was no statistically significant difference in TSP concentration between poisoning group 1 and poisoning group 2, indicating that the improved smoke exposure device did not affect the dose and exposure process of the poison. **Conclusion** The improved smoke exposure device will reduce the mortality of experimental animals under non-pharmaceutical factors and will not affect the experimental exposure process.

Key words: smoke exposure; survival rate; oxygen concentration