

彭冬冬,江芝,陈相池,等. 定量口鼻吸入法建立大鼠慢性阻塞性肺病模型[J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(9): 1114-1125.
Peng DD, Jiang Z, Chen XC, et al. Quantitative inhalation method to establish a model of chronic obstructive pulmonary disease in rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(9): 1114-1125.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.09.002

定量口鼻吸入法建立大鼠慢性阻塞性肺病模型

彭冬冬^{1,2},江芝^{1,2},陈相池^{1,2},唐梓宁^{1,2},杜艳华³,姜德建^{1,2},刘学武^{1,2,3*}

(1. 新药药效与安全性评价湖南省重点实验室,长沙 410331;2. 湖南普瑞玛药物研究中心有限公司,长沙 410331;3. 中山大学中山医学院药理教研室,广州 510080)

【摘要】 目的 比较烟雾经口鼻吸入 + 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 气管滴注和烟雾全身暴露 + 脂多糖气管滴注诱导的大鼠慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 模型的差异,为 COPD 模型的构建提供新的造模方法。**方法** 将 90 只雄性 SD 大鼠随机分为正常对照组、烟雾全身暴露组、烟雾口鼻吸入组,每组 30 只。烟雾全身暴露组采用“自制熏烟箱”进行烟雾的全身暴露,烟雾口鼻吸入组采用“定量吸烟装置”进行口鼻吸入烟雾,两组动物均每天进行烟雾暴露 1 次,每次 60 min,连续 8 周,同时分别于造模第 1、7、15、21 天经气管注入 LPS (1 mg/kg),以诱导建立 COPD 模型。分别对定量吸烟装置和自制熏烟箱生成的烟雾进行质量控制,包括烟雾颗粒的浓度稳定性和均一性验证,烟雾颗粒的粒径分布检测,并分别于造模 4、6、8 周通过肺功能检查、肺泡灌洗液炎症因子白介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 含量的检测、组织病理学检查来比较两种造模方式的差异。**结果** 定量吸烟装置能生成浓度稳定的烟雾 (浓度分别为 1.1 mg/L (以颗粒计) 和 0.1 mg/L (以尼古丁计)),且其质量中值粒径 (median mass aerodynamic diameter, MMAD) (以尼古丁计) 为 0.86 μm ,几何标准差 (geometric standard deviation, GSD) 为 2.12,自制熏烟箱所生成的烟雾浓度稳定性和均一性偏差均明显大于定量吸烟装置;烟雾口鼻吸入组大鼠肺功能 FEV_{0.2}/FVC、肺顺应性 (C_{dyn}) 指标均较烟雾全身暴露组下降更为明显,气道阻力 (penh) 增加更明显;烟雾口鼻吸入组大鼠肺泡灌洗液 IL-6、TNF- α 水平在造模后 6 周即可见显著增加,烟雾全身暴露组大鼠需至造模 8 周。烟雾口鼻吸入组和全身暴露组大鼠造模后支气管炎病变程度基本相当,但口鼻吸入组的肺气肿病变程度更严重,且与全身暴露组 (造模 8 周) 相比,口鼻吸入组 (造模 6 周出现) 肺气肿病变出现统计学差异的时间更早;烟雾口鼻吸入组平均内衬间隔 (mean linear intercept, MLI) 在造模 4 ~ 8 周均显著增大,平均肺泡数 (mean alveolar number, MAN) 在造模 6 ~ 8 周均显著减少;烟雾全身暴露组仅造模 8 周可见 MLI 显著增大和 MAN 显著减少。烟雾口鼻吸入组肺功能指标 (FEV_{0.2}/FVC、C_{dyn}、Penh)、肺泡灌洗液细胞因子水平 (IL-6、TNF- α)、肺泡组织病理学变化 (支气管严重和肺气肿病理评分、MLI、MAN) 在造模后均可见显著的异常改变,但各指标变化的变异系数 (CV%) 明显小于烟雾全身暴露组的相应指标。**结论** LPS (1.0 mg/kg) 气管滴注联合烟雾全身暴露或烟雾口鼻吸入均能构建典型的大鼠慢性阻塞性肺病模型,其中烟雾口鼻吸入能缩短模型构建的造模周期,连续造模 6 周即可成模,表现为典型的慢性阻塞性肺病症状 (肺通气功能障碍,支气管-肺脏慢性炎症浸润,并同时伴有肺气肿),且模型动物个体间的差异更小 (烟雾口鼻暴露 *vs* 烟雾全身暴露, CV% 值更小)。

【关键词】 口鼻吸入;慢性阻塞性肺疾病;香烟;脂多糖;大鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 09-1114-12

Quantitative inhalation method to establish a model of chronic obstructive pulmonary disease in rats

PENG Dongdong^{1,2}, JIANG Zhi^{1,2}, CHEN Xiangchi^{1,2}, TANG Zining^{1,2}, DU Yanhua³, JIANG Dejian^{1,2}, LIU Xuewu^{1,2,3*}

【基金项目】 湖南省药物非临床研究科技创新创业团队 (2021), 湖南省科技重点研发项目 (2020DK2003)。

Funded by Hunan Province Drug Non-Clinical Research Technology Innovation and Entrepreneurship Team (2021), Hunan Province Key Research and Development Project (2020DK2003).

【作者简介】 彭冬冬 (1990—), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 药理学。Email: pengdongdong@hnse.org

【通信作者】 刘学武 (1988—), 男, 在读博士研究生, 助理研究员, 研究方向: 药理学。Email: liuxuewu@hnse.org

(1. Hunan Key Laboratory of Pharmacodynamics and Safety Evaluation of New Drugs, Changsha 410331, China.
2. Hunan Prima Pharmaceutical Research Center Co. Ltd, Changsha 410331. 3. Department of Pharmacology,
Sun Yat-sen University Zhongshan School of Medicine, Guangzhou 510080)
Corresponding author: LIU Xuewu. E-mail: liuxuewu@hnse.org

【Abstract】 Objective To compare differences in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) models induced by smoke inhalation through the nose-mouth plus lipopolysaccharide (LPS) or smoke exposure through the whole body plus LPS in rats, providing a new model for COPD. **Methods** Ninety male SD rats were randomly divided into normal control, whole body exposure, and smoke inhalation groups with 30 rats per group. The whole body exposure group was placed in a smoke box, whereby smoke contacted the whole body of the rats, whereas the smoke inhalation group inhaled smoke via the nose-mouth in a quantitative smoking device. Animals in both groups were exposed to smoke once a day for 60 min over 8 weeks. LPS (1 mg/kg) was injected through the trachea on days 1, 7, 15, and 21 to induce the COPD model. Quality control of the smoke generated by the quantitative smoking device and smoking box included verification of the concentration stability and uniformity of the smoke particles and the particle size distribution of the smoke. At 4, 6, and 8 weeks of modeling, pulmonary function examination, the content of proinflammatory factors interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in alveolar lavage fluid, and histopathological examination were performed to compare the two modeling methods. **Results** Quantitative smoking devices produced smoke with a stable concentration of 1.1 mg/L (total particles) and 0.1 mg/L (nicotine), with a median mass particle size of 0.86 μm (nicotine) and a GSD of 2.12. The deviation in stability and uniformity of the smoke concentration produced by the smoking box was obviously greater than that of the quantitative smoking device. Compared with the whole body exposure group, pulmonary function indexes $\text{FEV}_{0.2}/\text{FVC}$ and pulmonary compliance (C_{dyn}) in the smoke inhalation group were decreased significantly, and airway resistance (Penh) was increased significantly. IL-6 and TNF- α levels in alveolar lavage fluid of the smoke inhalation group were significantly increased at 6 weeks after modeling, and those in the whole body exposure group were increased at 8 weeks after modeling. The lesion severity of bronchial inflammation after modeling was similar in smoke inhalation and whole body exposure groups, but the degree of emphysema lesions in the nose-mouth inhalation group was more severe, and statistically significant differences in emphysema lesions appeared earlier in the nose-mouth inhalation group (after 6 weeks of modeling) than in the whole body exposure group (after 8 weeks of modeling). The mean linear intercept (MLI) in the smoke inhalation group was increased significantly at 4 ~ 8 weeks of modeling, and the mean alveolar number (MAN) was decreased significantly at 6 ~ 8 weeks of modeling. MLI was increased significantly and MAN was decreased significantly in the whole body exposure group after 8 weeks of modeling. In the smoke inhalation group, significant abnormal changes were observed in pulmonary function indexes ($\text{FEV}_{0.2}/\text{FVC}$, C_{dyn}, and Penh), cytokine levels in bronchoalveolar lavage fluid (IL-6 and TNF- α), and alveolar histopathological changes (bronchial severity and emphysema pathological score, MLI, and MAN) after modeling. However, the coefficient of variation (CV%) of each index was significantly lower than that in the whole body exposure group. **Conclusion** A 1.0 mg/kg LPS endotracheal drip combined with whole body smoke exposure or nose-mouth smoke inhalation both establish a typical rat COPD model. Inhaled smoke via the nose-mouth route shortened the modeling period. The model was established after 6 weeks of continuous smoke exposure, presenting typical symptoms of COPD (pulmonary ventilation dysfunction and broncho-lung chronic inflammatory infiltration accompanied by emphysema), and the difference between individual model animals was small (nose-mouth smoke inhalation *vs* smoke exposure, CV% values were smaller).

【Keywords】 nose-mouth inhalation; chronic obstructive pulmonary disease; cigarettes; lipopolysaccharide; rats
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是肺气肿和 (或) 慢性支气管炎导致的以气道不完全可逆性气流受限为特征的一类慢性呼吸系统疾病^[1-3]。目前已报道的 COPD 动物模型造模方法众多, 包括单因素法 (被动吸烟、二氧化硫 (SO₂) 吸入、脂多糖气管滴注、呼吸道反复感染 (主要是细菌)、蛋白酶诱导、基因工程技术) 和复合因素法 (被动吸烟 + LPS、被动吸烟 + 蛋白酶、被动吸烟 + 呼吸道感染等)^[4-6]。香烟烟雾是慢阻肺发病最相关的危险因素之一, 烟雾暴露造

模最接近人类 COPD 的患病环境,因此被动吸烟被认为最符合人类 COPD 发展的造模方法^[7-8]。但被动吸烟法存在烟雾暴露条件不易控制的缺点,导致造模剂量无法量化,造模时间没有统一的标准,且动物之间的病变程度也存在着较大差异。因此,通过标准化的手段控制烟雾暴露条件,对 COPD 模型建立的稳定性和重现性具有重要意义。本研究采用经口鼻吸入烟雾诱导大鼠 COPD 模型,通过烟雾浓度监测(以烟雾总颗粒物重量和颗粒物中的尼古丁重量)控制烟雾暴露条件的稳定性,为 COPD 模型建立的标准化提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级健康 SD 大鼠 90 只,雄性,6 ~ 9 周龄,体重 180 ~ 220 g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司【SCXK(湘)2019-0004】,饲养于湖南普瑞玛药物研究中心有限公司屏障环境动物实验室【SYXK(湘)2020-0015】。饲养期间大鼠自由摄食和饮水,所用 SPF 鼠料(⁶⁰Co 消毒)由北京科奥协力饲料有限公司提供。饲养环境:昼夜各半循环照明,温度 20.5 ~ 25.4℃,湿度 43% ~ 64%。本动物实验经湖南普瑞玛药物研究中心有限公司动物伦理与福利委员会的批准(IACUC-2021(2)022)。

1.1.2 主要试剂与仪器

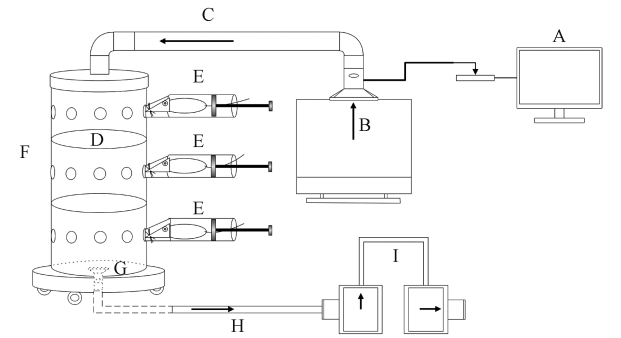
芙蓉牌香烟(每支香烟含焦油量:11 mg,烟气烟碱量:0.9 mg,烟气一氧化碳 13 mg,20 支/包,湖南常德卷烟厂);尼古丁(批号:0830-RC-0003,生产单位:广州佳途科技股份有限公司);脂多糖(LPS)(规格:每瓶 10 mg,批号:000011064,有效期至:2022.06,生产单位:Sigma);大鼠 TNF- α 、IL-6、IL-8 ELISA 试剂盒(批号均为:092021,生产单位均为江苏酶免实业有限公司)。定量吸烟装置,由两部分组成:第一部分为自动吸烟机(400 mm × 300 mm × 400 mm,上海塔望智能科技有限公司),第二部分为 HRH-MNE3026 型小动物单浓度口鼻动态暴露吸入染毒系统;撞击式药物气溶胶采样器(NGI)(北京慧荣和科技有限公司);PFT 肺功能检测系统(上海塔望智能科技有限公司);LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津);BG-800 型血气电解质分析仪(深圳市麦迪聪医疗电子有限公司);Spectra Max i3x 型多功能酶标仪(上海美谷分子);B203LED 型生物显微镜

(重庆奥特光学仪器有限公司生产);DFC 420C 型病理成像系统(德国 Leica)。

1.2 方法

1.2.1 香烟烟雾生成的质量控制

(1)“定量吸烟装置”烟雾生成的质量控制
香烟烟雾的成分众多,分为气相成分(二氧化碳、一氧化碳、氮氧化物、挥发性低分子烷烃等)和固相成分(尼古丁、烟焦油、亚硝胺等)^[9-12],其中电脑控制器(A)控制香烟机(B)进行烟雾生成,并经口鼻吸入暴露系统(由 C、D、E、F、G、H、I 构成)的进气管路(C)进入暴露染毒舱(D),烟雾通过染毒舱的吸入通道(如图 F 所示,共 36 个吸入通道,其中 4 个分别用于氧气浓度、二氧化碳浓度、压差和湿度的持续监测,剩余 32 个通道均可用于大鼠吸入染毒)被大鼠经口鼻吸入体内,染毒仓内剩余的气溶胶经抽气口(G)和抽气管路(H)被回收,并经过滤装置(I)过滤除去气溶胶颗粒。采用抽气泵经吸入通道(F)采集染毒仓内的烟雾总颗粒(滤膜收集法,抽气流量 1.0 L/min,持续时间 10 min)称量采集前、后滤膜重量差值,并计算烟雾总颗粒物浓度(滤膜重量差值/(1.0 L/min × 10 min)),并进一步通过高效液相色谱分析仪检测生成的烟雾,并获得稳定浓度的烟雾颗粒(以烟雾总颗粒计,1.1 mg/L;以尼古丁计,0.1 mg/L)。在吸入染毒前分别进行雾化稳定性和均一性验证,其中雾化稳定性验证即考察烟雾生成后不同时间(如生成后的 10、30、60、90、



注:A:电脑控制器;B:自动吸烟机;C:进气管路;D:烟雾暴露塔(三层);E:大鼠吸入固定器;F:吸入暴露通道;G:抽气口;H:抽气管路;I:过滤装置。

图 1 定量吸烟装置连接装置示意图
Note. A. Computer controller. B. Automatic smoking machine. C. Intake pipe. D. Smoke exposure tower (three floors). E. Rat inhalation fixator. F. Inhalation exposure channel. G. Air extraction port. H. Suction pipe. I. Filter device.
Figure 1 Quantitative smoking device schematic diagram of connection device

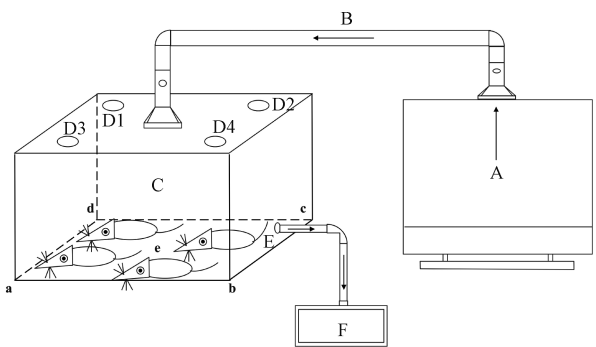
120、180 min) 的烟雾颗粒的浓度稳定性(以尼古丁计,不同时间点的烟雾浓度在目标浓度的 $\pm 20\%$ 范围内为稳定性合格);雾化均一性验证即考察不同吸入通道(共 32 个通道,以十字交叉方向分别在每层选择 4 个通道)的烟雾浓度差异(以尼古丁计,不同吸入通道的烟雾浓度在目标浓度的 $\pm 20\%$ 范围内为均一性合格^[13-15])。同时采用 NGI 进行烟雾颗粒的粒径分析(以尼古丁为检测标志物),考察烟雾的粒径分布情况。

(2)“自制烟熏箱”烟雾生成的质量控制

如图 2 所示,采用香烟机与透明 PVC 箱(400 mm × 300 mm × 400 mm)进行连接构建“自制烟熏箱”,其中香烟机(A)进行烟雾生成,并经进气管路(B)进入 PVC 箱体内(C),将大鼠放置于箱体底部进行全身烟雾暴露。采用抽气泵(F)经气溶胶采样口(E)采集烟雾总颗粒(滤膜收集法,抽气流量 1.0 L/min,持续时间 10 min),称量采集前、后滤膜重量差值,并计算烟雾总颗粒物浓度(滤膜重量差值/(1.0 L/min × 10 min)),并进一步通过高效液相色谱分析仪检测生成的烟雾。在吸入染毒前分别进行雾化稳定性和均一性考察,其中雾化稳定性验证即考察烟雾生成后不同时间(如生成后的 10、30、60、90、120、180 min)的烟雾颗粒的浓度稳定性(以尼古丁计,并与定量吸烟装置的烟雾浓度进行比较);雾化均一性验证即考察箱体 a、b、c、d、e 位置的烟雾浓度差异(以尼古丁计)。同时采用 NGI 通过采样口(E)采集烟雾颗粒,并进行烟雾颗粒的粒径分析(以尼古丁为检测标志物),考察烟雾的粒径分布情况。

1.2.2 分组与造模

大鼠适应性饲养了 7 d 后,按体重随机分为正常对照组、烟雾全身暴露组(模拟传统造模方式)、烟雾口鼻吸入组,每组 30 只。烟雾全身暴露组采用自制烟雾暴露箱(400 mm × 300 mm × 400 mm)进行全身烟雾暴露,每天 1 次,每次 60 min,连续 8 周,动物接触烟雾途径包括口鼻吸入、皮肤和毛发接触等;烟雾口鼻吸入组每天经口鼻吸入固定浓度的烟雾颗粒(1.1 mg/L(以总颗粒物计)和 0.1 mg/L(以尼古丁计)),每天 1 次,每次 60 min,连续 8 周,具体如图 1 所示:将香烟放入自动吸烟机(B),燃烧生成烟雾,通过电脑控制器(A)控制烟雾流速,并经进气管路导入烟雾暴露塔(D)供大鼠进行口鼻吸入,将大鼠装入吸入固定器内(E),其口鼻部朝向插入



注:A:自动吸烟机;B:进气管路;C:烟熏箱;D:通气口(包括 D1、D2、D3、D4,用于与外界连通进行气体交换);E:气溶胶采样口;F:大气采样器(用于采集烟雾颗粒);a、b、c、d、e 分别为进行烟雾气溶胶颗粒采样的 5 个位置,通过从 E 采样口伸入采样管路至 a、b、c、d、e 5 个位置,采用大气采样器 F 进行气溶胶颗粒采集。

图 2 自制烟熏箱连接装置示意图

Note. A. Automatic smoking machine. B. Intake pipe. C. Smoke exposure chamber. D. Vent (including D1, D2, D3, D4, used for communication with the outside for gas exchange). E. Aerosol sampling port. F. Air sampler (for collecting smoke particles). a, b, c, d and e are the five locations for sampling smoke aerosol particles respectively. By extending the sampling pipe from sampling port E to five locations a, b, c, d and e, atmospheric sampler F is used to collect aerosol particles.

Figure 2 Self-made smoking box schematic diagram of connection device

吸入暴露通道(F)进行烟雾的口鼻吸入,每次同时可进行 32 只大鼠的口鼻吸入造模。两种烟雾暴露方式的香烟消耗率均为每分钟 0.75 支(据香烟的含量换算成尼古丁理论供应速度为 0.675 mg/min,换算成 60 min 内的尼古丁总量为 40.5 mg)。以首次吸入染毒当天计为第 1 天,除正常对照组外,其余各组均分别于吸入染毒第 1、7、15、21 天经气管滴注 1 mg/kg 的 LPS,以诱导形成大鼠慢性阻塞性肺部模型,气管滴注方法如下:动物轻微麻醉,将大鼠仰卧于解剖板上呈 30° ~ 45° 倾斜位置,耳镜下暴露,用微量注射器自声门处快速插入气管,并进行 LPS 的滴注。正常对照组滴注等体积的 0.9% 氯化钠注射液。

1.2.3 观察指标

(1)大鼠的一般行为观察:包括活动情况、进食量、体重变化、毛发等;(2)肺功能检测:分别于末次造模第 4、6、8 周(第 28、42、56 天)从各组取大鼠 10 只,腹腔注射 60 mg/kg 舒泰 50 麻醉,于气管上作倒“T”型开口,进行气管插管,用 PFT 肺功能检测系统

检测肺功能 0.2 s 最大呼气量/用力肺活量(FEV_{0.2}/FVC)、肺顺应性(C_{dyn})、气道阻力(P_{enh})指标;

(3)各时间点各组动物检测肺功能后,进行肺泡灌洗液采集,具体操作方法如下:各组大鼠放血安乐死,用 0.9%氯化钠注射液 6 mL,自气管开口处注入右肺,行肺泡灌洗,并收集肺泡灌洗液,采用大鼠 ELISA 试剂盒检测肺泡灌洗液 TNF-α、IL-6、IL-8 水平;

(4)组织病理学检查:各时间点各组大鼠采集取肺泡灌洗液后,解剖取左侧肺,10%中性福尔马林溶液固定,常规石蜡包埋、切片,进行苏木精-伊红(HE)染色,观察各组大鼠肺组织形态学变化,并进行病理评分和肺组织形态学定量分析,其中病理评分标准如下:对支气管、细支气管周围肺炎炎症及肺气肿程度进行病理评分,其中未见明显异常,记录“-”,得 0 分;轻度病变,记录“+”,得 1 分;中度病变,记录“++”,得 2 分;重度病变,记录“+++”,得 3 分。肺组织形态学定量分析^[16-21]:显微镜图像上,以视野正中为中心划“+”字交叉线,计数经此交叉线的肺泡间隔数(NS)。测出“+”字线总长度(L),以 MLI = L/NS 得到平均内衬间隔,其大小反映肺泡平均直径。单位面积平均肺泡数(MAN):计数每个视野的肺泡数(Na),除以该视野的面积

(N),MAN = Na/N,其数值反映肺泡密度。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计软件进行分析,计量资料数据在分析前进行正态性检验和方差齐性检验,正态分布数据以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,并计算变异系数(CV%) = 标准差/平均值 × 100%。非正态分布数据用中位数表示。两组均数比较采用 *t* 检验,多组均数比较采用单因素方差分析。以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 香烟烟雾生成的质量控制

2.1.1 定量吸烟装置烟雾颗粒浓度稳定性和均一性验证

如表 1 所示,吸烟机连接暴露吸入染毒系统进行雾化发生后 10、30、60、90、120、180 min 的气溶胶浓度均在目标浓度 1.1 mg/L(以总颗粒物计)和 0.1 mg/L(以尼古丁计)的 ± 20% 范围内的;暴露塔上、中、下层通道偏差均在目标浓度的 ± 20% 以内,提示“定量吸烟装置”能持续、稳定并均一的生成固定浓度的烟雾颗粒,为大鼠经口鼻吸入浓度稳定的烟雾颗粒提供了质量可控的造模条件。

表 1 定量吸烟装置香烟颗粒浓度稳定性和均一性

Table 1 Stability and uniformity of cigarette particle concentrations in quantitative smoking devices

验证方法 Method of verification	称重法(以颗粒物重量计) Method of weighing (weighed by particulate matter)		高效液相色谱法(以尼古丁计) HPLC (measured by nicotine)	
验证内容 Content of verification	稳定性验证(3 h) Verification of stability(3 h)	上、中、下层均一性验证 Uniformity verification of upper, middle and lower layers	稳定性验证(3 h) Verification of stability(3 h)	上、中、下层均一性验证 Uniformity verification of upper, middle and lower layers
目标浓度(mg/L) Target concentration(mg/L)	1.1	1.1	0.1	0.1
实测浓度(mg/L) Measured concentration(mg/L)	1.03 ~ 1.21	1.01 ~ 1.27	0.099 ~ 0.111	0.100 ~ 0.112
偏差(%) Deviation(%)	-5.5 ~ 10.0	-8.2 ~ 15.5	-1.1 ~ 11.2	-0.2 ~ 12.1
是否合格 Qualified or not	合格 Up to standard	合格 Up to standard	合格 Up to standard	合格 Up to standard

2.1.2 自制烟熏箱烟雾颗粒浓度稳定性和均一性验证

如表 2 所示,吸烟机连接“自制烟熏箱”进行雾化发生后 10、30、60、90、120、180 min 的气溶胶浓度在目标浓度(1.1 mg/L(以总颗粒物计)和 0.1 mg/L(以尼古丁计))的-19.8% ~ 28.9% 范围内,偏差极

大;烟熏箱 a、b、c、d、e 五个位置的烟雾颗粒浓度在目标浓度的-30.9% ~ 39.1% 范围内,提示将烟雾颗粒导入“自制烟熏箱”后,其气溶胶颗粒浓度偏差较大,可能进一步导致动物无法持续吸入稳定的烟雾颗粒,且不同动物之间吸入的烟雾颗粒浓度同样差异较大。

表 2 自制烟熏箱香烟颗粒的浓度的稳定性和均一性

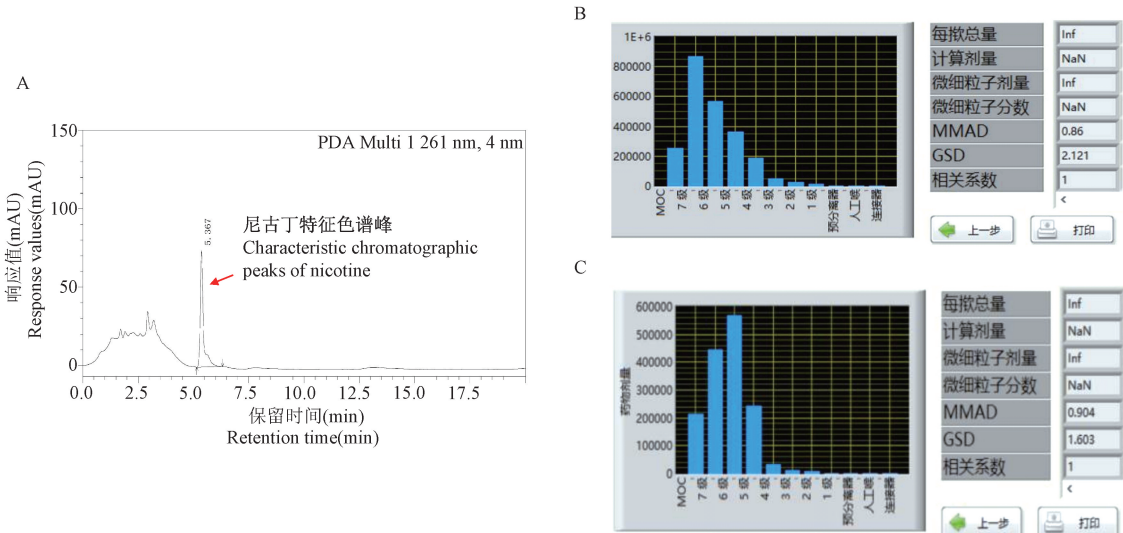
Table 2 Stability and uniformity of the concentration of cigarette particles in the self-made smoking box

验证方法 Method of verification	称重法(以颗粒物重计) Method of weighing (weighed by particulate matter)		高效液相色谱法(以尼古丁计) HPLC (measured by nicotine)	
验证内容 Content of verification	稳定性验证(3 h) Verification of stability(3 h)	a ~ e 位点均一性验证 Verification of uniformity a ~ e position	稳定性验证(3 h) Verification of stability(3 h)	a ~ e 位点均一性验证 Verification of uniformity a ~ e position
目标浓度(mg/L) Target concentration(mg/L)	1.1	1.1	0.1	0.1
实测浓度(mg/L) Measured concentration(mg/L)	0.82 ~ 1.34	0.76 ~ 1.53	0.080 ~ 0.125	0.100 ~ 0.163
偏差(%) Deviation(%)	-25.5 ~ 21.8	-30.9 ~ 39.1	-19.8 ~ 28.9	-16.8 ~ 35.8
是否合格 Qualified or not	偏差大 Large deviation	偏差大 Large deviation	偏差大 Large deviation	偏差大 Large deviation

2.1.3 烟雾颗粒的粒径分布监测

如图 3 所示,以尼古丁为代表,对定量吸烟装置和自制烟雾暴露箱中的烟雾颗粒的粒径分布(质量中值粒径 MMAD,几何标准偏差 GSD)进行考察,其烟雾颗粒的 MMAD 分别为 0.860 μm 和

0.904 μm, GSD 分别为 2.120 和 1.603,提示两种造模装置中的烟雾颗粒粒径分布基本一致,烟雾颗粒均能有效沉积于呼吸道,并且沉积部位主要集中于呼吸道的深部(细支气管和肺泡)^[16-26],具有较大的呼吸系统危害。



注:A:香烟烟雾中尼古丁的特征液相色谱峰;B:定量吸烟装置的烟雾颗粒中尼古丁的粒径分布;C:自制烟熏箱中烟雾颗粒中尼古丁的粒径分布。

图 3 烟雾颗粒中尼古丁的粒径分布

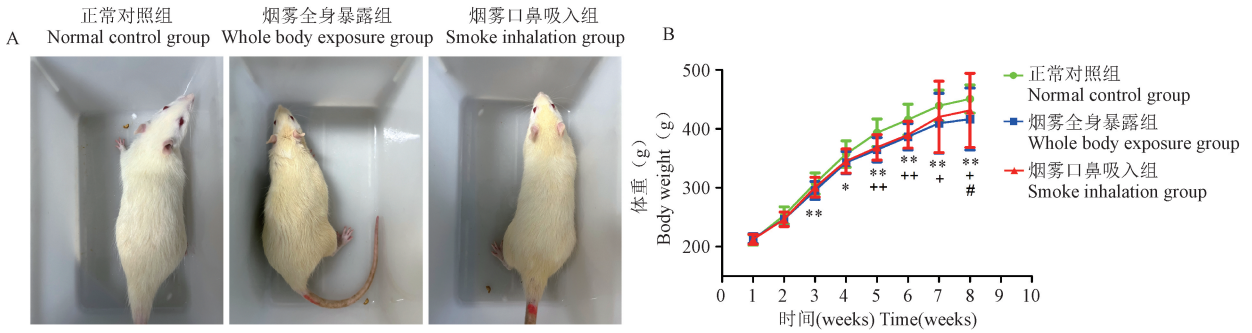
Note. A. Characteristic liquid chromatographic peak of nicotine in cigarette smoke. B. Particle size distribution of nicotine in cigarette smoke. C. Size distribution of nicotine in smoke particles in a “homemade smoker”.

Figure 3 Size distribution of nicotine in smoke particles

2.2 大鼠一般情况及体重变化

如图 4A 所示,正常对照组大鼠实验期间活动情况、二便、摄食、毛色等临床观察均未见异常,体重稳定增长;烟雾全身暴露组实验期间活动、二便、摄食等均未见异常,但动物毛色枯黄;烟雾口鼻吸入组实验期间活动、二便、摄食、毛色等均未见异常。

常。如图 4B 所示,与正常对照组相比,烟雾全身暴露组动物造模后 3 ~ 8 周体重明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),烟雾口鼻吸入组动物造模后 5 ~ 8 周体重明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与烟雾全身暴露组相比,烟雾口鼻吸入组造模后 8 周体重明显增加($P < 0.05$)。



注:A:各组大鼠临床观察;B:各组大鼠体重增长曲线图。烟雾口鼻吸入组与正常对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;烟雾全身暴露组与正常对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;烟雾全身暴露组与烟雾口鼻吸入组相比,# $P < 0.05$ 。(下图同)

图4 COPD 大鼠临床观察

Note. A. Clinical observation of each group; B. Body weight growth curves of rats in each group. Smoke inhalation group compared with the normal control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Whole body exposure group compared with the normal control group, + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$; Whole body exposure group compared with the smoke inhalation groups, # $P < 0.05$. (The same in the following figures)

Figure 4 Clinical observation of COPD rats

2.3 大鼠 COPD 模型肺功能的变化

如图 5A 所示,造模期间,正常对照组肺功能指标($FEV_{0.2}/FVC$ 、 $Penh$ 、 $Cdyn$)趋于稳定;与正常对照组相比,烟雾全身暴露组大鼠造模后 4~6 周的 $FEV_{0.2}/FVC$ 均呈进展性减小,其中烟雾全身暴露组仅造模 8 周的 $FEV_{0.2}/FVC$ 可见显著减小($P < 0.01$),组内个体间的变异系数 CV% 值为 19%~24%;烟雾口鼻吸入组大鼠造模后 4~6 周的 $FEV_{0.2}/FVC$ 均呈进展性减小,且造模 6、8 周的 $FEV_{0.2}/FVC$ 均可见显著减小($P < 0.01$),组内个体间的变异系数 CV% 值为 8%~11%。

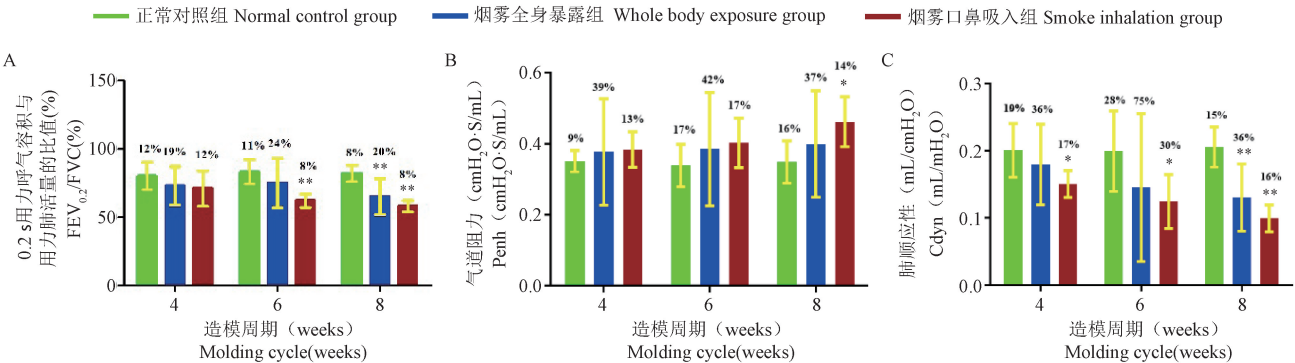
如图 5B 所示,与正常对照组相比,烟雾全身暴露组仅见气道阻力 $Penh$ 有增加趋势,但无统计学意义,且组内个体间的变异系数 CV% 值为 37%~42%;烟雾口鼻吸入组造模 4、6 周均可见气道阻力

$Penh$ 的增大,但无统计学意义,造模 8 周可见 $Penh$ 显著增大($P < 0.01$),且组内个体间的变异系数 CV% 值为 13%~17%。

如图 5C 所示,与正常对照组相比,烟雾全身暴露组造模后 4、6 周的肺顺应性仅见降低趋势,但无统计学意义,造模 8 周的肺顺应性可见显著降低($P < 0.01$),且组内个体间的变异系数 CV% 值为 36%~75%;烟雾口鼻吸入组造模后 4、6、8 周的肺顺应性均可见显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且组内个体间的变异系数 CV 值为 16%~30%。

2.4 大鼠 COPD 模型肺泡灌洗液细胞因子的变化

如图 6 所示,与正常对照组相比,烟雾全身暴露组造模第 4、6 周肺泡灌洗液 IL-6、TNF- α 水平仅见升高趋势,但无统计学意义,造模第 8 周肺泡灌洗液 IL-6、TNF- α 显著升高($P < 0.01$),并且 IL-6 和 TNF- α



注:因动物死亡,烟雾全身暴露组造模 4 周($n = 9$)。

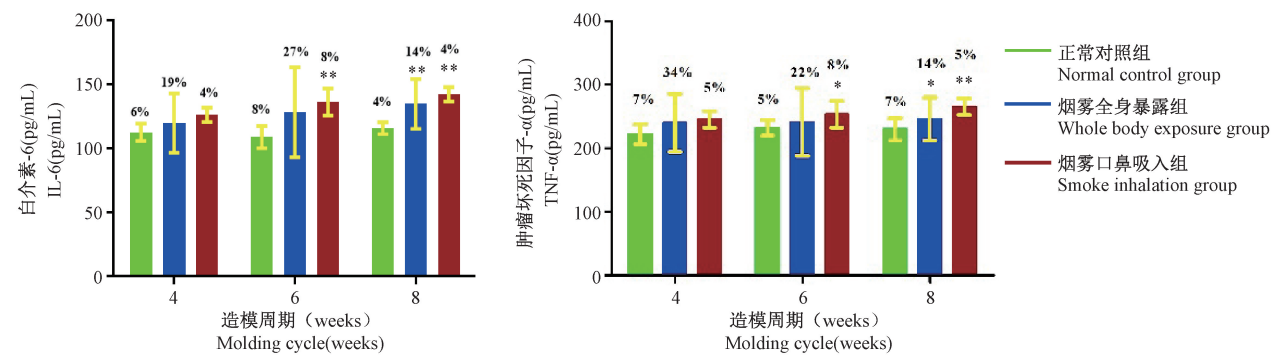
图5 COPD 大鼠肺功能的变化

Note. Due to animal death, whole-body smoke exposure group was modeled for 4 weeks($n = 9$).

Figure 5 Changes of pulmonary function in COPD rats

的组内个体间的变异系数 CV% 值分别为 14% ~ 27%、14% ~ 34%; 烟雾口鼻吸入组造模第 4 周肺泡灌洗液 IL-6、TNF- α 水平仅见升高趋势, 但无统计学

意义, 造模第 6、8 周肺泡灌洗液 IL-6、TNF- α 均可见显著升高($P < 0.01$), 并且 IL-6 和 TNF- α 的组内个体间的变异系数 CV% 值分别为 4% ~ 8%、5% ~ 8%。



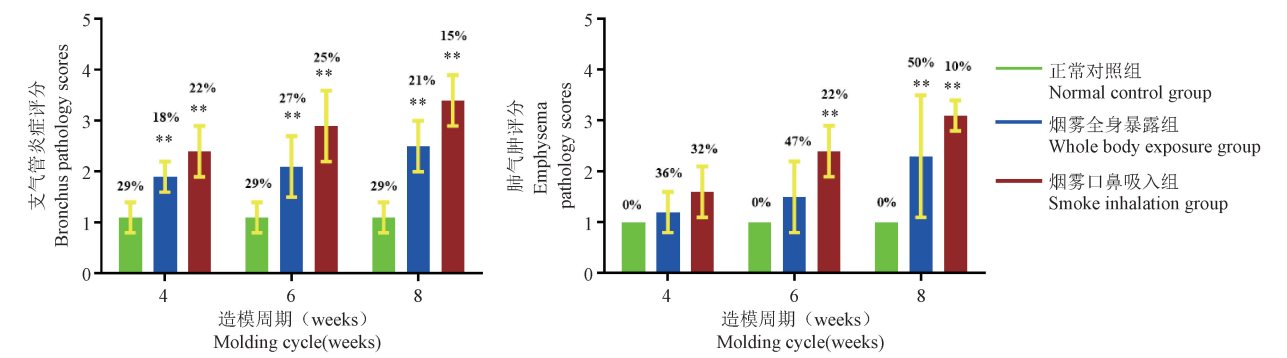
注: 因动物死亡, 烟雾全身暴露组造模 4 周 ($n = 9$)。
Note. Due to animal death, whole-body smoke exposure group was modeled for 4 weeks ($n = 9$).
Figure 6 Changes of cytokines in alveolar lavage fluid in COPD rats

2.5 大鼠 COPD 模型支气管-肺组织病理检查

2.5.1 支气管-肺组织病理学评分

如图 7 所示, 与正常对照组相比, 烟雾全身暴露组和烟雾口鼻吸入组造模 4、6、8 周支气管病理评分均显著增大 ($P < 0.01$), 且随着造模时间延长, 病变程度越严重。且烟雾全身暴露组造模 6、8 周支气管炎病变均为轻度至重度改变; 口鼻吸入组造模 6 周支气管炎病变为轻度至重度改变, 造模 8 周支气管炎病变为中度至重度改变。

与正常对照组相比, 烟雾全身暴露组造模 4、6 周肺气肿程度仅见增大趋势, 但无统计学意义, 造模 8 周肺气肿程度显著增大 ($P < 0.01$), 但仍有 3/10 只大鼠未见明显肺气肿病变。与正常对照组相比, 烟雾口鼻吸入组造模 4 周肺气肿程度仅见增大趋势, 但无统计学意义, 造模 6、8 周肺气肿程度显著增大 ($P < 0.01$), 且所有动物均可见明显肺气肿, 且造模 6 周肺气肿病变为轻度至中度改变, 造模 8 周肺气肿病变为中度至重度改变。



注: 因动物死亡, 烟雾全身暴露组造模 4 周 ($n = 9$)。
Note. Due to animal death, whole-body smoke exposure group was modeled for 4 weeks ($n = 9$).
Figure 7 Pathological scores of broncho-lung tissue in COPD rats

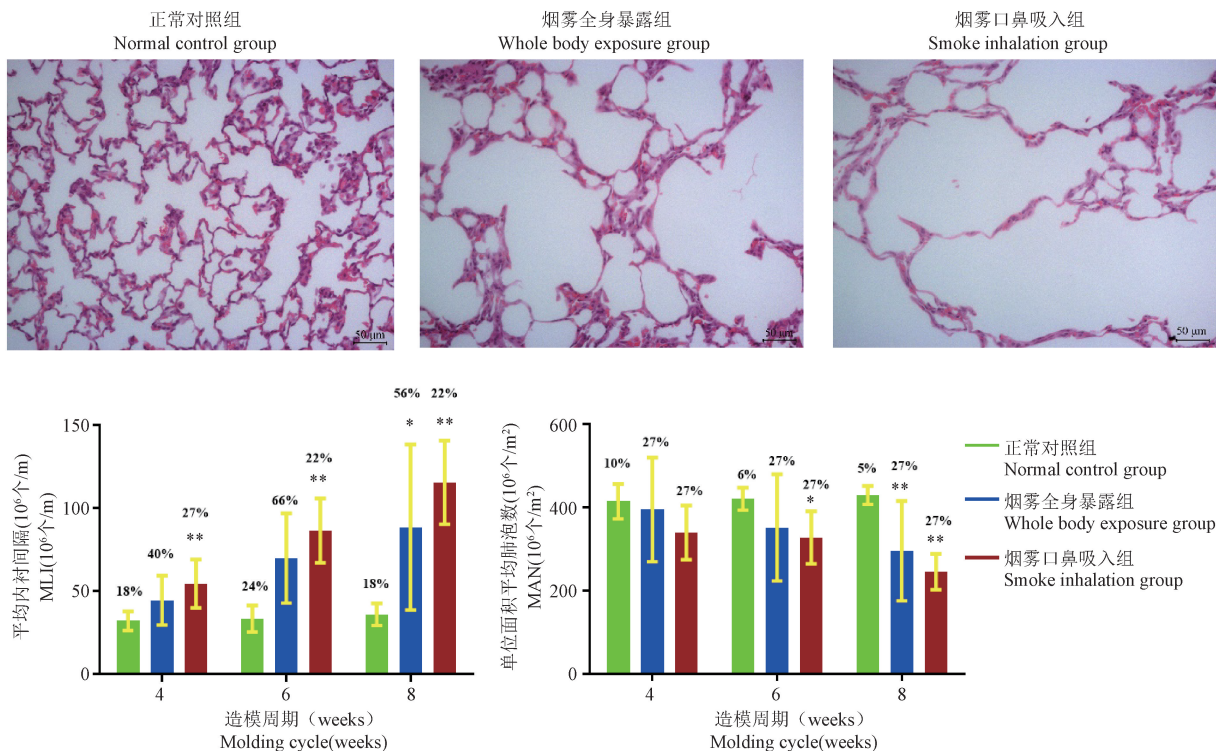
2.5.2 肺组织形态学定量分析

如图 8 所示, 与正常对照组相比, 烟雾全身暴露组和烟雾口鼻吸入组大鼠造模后 4 ~ 8 周的肺 MLI 均呈进展性增大, 其中烟雾全身暴露组仅造模 8 周的肺 MLI 可见显著增大 ($P < 0.05$), 组内个体间的

变异系数 CV% 值为 40% ~ 66%; 烟雾口鼻吸入组造模 4、6、8 周的肺 MLI 均可见显著增大 ($P < 0.01$), 组内个体间的变异系数 CV% 值为 22% ~ 27%。与正常对照组相比, 烟雾全身暴露组造模后 4、6 周的 MAN 仅见减少趋势, 但无统计学意义, 造

模 8 周的 MAN 可见显著减少 ($P < 0.01$), 且组内个体间的变异系数 CV% 值为 32% ~ 41%; 烟雾口鼻吸入组造模后 6 周、8 周的 MAN 均可见显著减少

($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且组内个体间的变异系数 CV 值为 17% ~ 19%。



注: 因动物死亡, 烟雾全身暴露组造模 4 周 ($n = 9$)。

图 8 COPD 大鼠肺组织形态学定量分析

Note. Due to animal death, whole-body smoke exposure group was modeled for 4 weeks ($n = 9$).

Figure 8 Quantitative analysis of lung tissue morphology in COPD rats

3 讨论

烟雾是诱发慢阻肺发病的最相关危险因素之一, 采用烟雾诱导动物 COPD 模型最接近人类的慢阻肺发病进程和组织病变类型, 因此主流的 COPD 造模方法多采用烟雾单因素或烟雾复合因素 (复合 LPS、病原微生物感染、蛋白酶等) 进行诱导, 烟雾成为了其中必备的诱因。烟雾具有固、气二相性^[10-12], 组成成分复杂 (其中气相成分包括二氧化碳、一氧化碳、氮氧化物、挥发性低分子烷烃等; 固相成分则包括尼古丁、烟焦油、亚硝胺等), 且来源众多 (烟草、垃圾或稻草等的焚烧烟雾、汽车尾气烟雾、工业烟雾等)^[12], 导致动物造模时的烟雾暴露条件不易控制 (如造模剂量无法量化或量化程度不够精确, 或量化后的造模剂量偏差较大)、造模时间无法统一, 同时烟雾暴露空间内不同位置的浓度差异则是导致模型动物之间的个体差异较大的原因之一^[8]。故本次研究采用吸烟机联合口鼻吸入暴露

系统组成“定量吸烟装置”, 通过定量口鼻吸入烟雾进行大鼠 COPD 模型的构建。结果显示, 与烟雾全身暴露相比, 烟雾经口鼻定量吸入能诱导形成更稳定、均一的, 个体差异更小的大鼠 COPD 模型, 且其造模条件能通过烟雾浓度和粒径分布进行验证和监测, 造模剂量能根据烟雾浓度和吸入时长进行量化, 造模时间为连续吸入烟雾 6 ~ 8 周, 并可根据需求调整造模时长来复制不同严重程度的 COPD 模型。

烟雾暴露条件包括造模条件 (烟雾浓度、烟雾粒径分布) 和舱体的环境条件 (氧气浓度、二氧化碳浓度、温度、湿度等)^[14-15]。稳定和均一浓度的烟雾能确保在每日造模时, 个体动物能持续吸入浓度稳定、一致的烟雾颗粒, 这能确保动物的造模剂量是稳定均一的, 能减少动物因造模剂量不一致引起的个体差异。本研究分别采用了两种表示方式对烟雾浓度进行定量, 分别为烟雾的颗粒浓度 (以颗粒的总重量计) 和烟雾的代表性成分浓度 (以尼古丁

计),其中浓度的稳定性验证分别比较了两种造模装置(定量吸烟装置和自制烟熏箱)连续 180 min 生成稳定浓度烟雾的能力,浓度的均一性验证分别比较了两种造模装置不同吸入通道(针对定量吸烟装置)或箱体内不同位置(针对自制烟熏箱)之间的烟雾浓度的均一性。结果显示,本研究中烟雾的目标浓度分别为 1.1 mg/L(以烟雾颗粒计)和 0.1 mg/L(以尼古丁计),在烟雾生成的 180 min 内,“定量吸烟装置”的烟雾浓度范围为 1.030 ~ 1.210 mg/L(以烟雾颗粒计)和 0.105 ~ 0.110 mg/L(以尼古丁计),自制烟熏箱的烟雾浓度范围为 0.82 ~ 1.34 mg/L(以烟雾颗粒计)和 0.080 ~ 0.125 mg/L(以尼古丁计);定量吸烟装置不同吸入通道的烟雾浓度范围为 1.01 ~ 1.27 mg/L(以烟雾颗粒计)和 0.100 ~ 0.112 mg/L(以尼古丁计),自制烟熏箱的烟雾浓度范围为 0.76 ~ 1.53 mg/L(以烟雾颗粒计)和 0.100 ~ 0.163 mg/L(以尼古丁计)。上述结果提示,自制烟熏箱内烟雾颗粒的浓度稳定性和均一性的偏差均远大于“定量吸烟装置”,这可能造成动物个体间的烟雾吸入量差异较大,并进一步导致模型动物的病变程度个体差异大,这是在本次研究的全身暴露组中得到的相互印证。此外,根据“定量吸烟装置”中烟雾的浓度和吸入时长对大鼠定量吸入烟雾的剂量进行换算为 50.8 mg/kg(以烟雾颗粒计)和 4.6 mg/kg(以尼古丁计)。

烟雾的粒径分布能够评估烟雾颗粒在气道中的有效沉积的情况,文献报道显示,粒径小于 7 μm 的颗粒能有效沉积于呼吸道^[27-32],且粒径越小,沉积部位越深,其中粒径小于 0.5 ~ 2.0 μm 的颗粒能有效沉积于肺泡中^[33-38]。本次研究结果显示,定量吸烟装置和自制烟熏箱生成的烟雾颗粒 MMAD(以尼古丁计)分别为 0.860 μm 和 0.904 μm ,GSD 分别为 2.120 和 1.603,提示两种造模装置生成的烟雾均能有效在肺部沉积,且沉积部位主要集中于下呼吸道(细支气管和肺泡)^[3-7],具有较大的呼吸系统危害^[8-10]。定量吸入时,舱体的环境条件(氧气浓度、二氧化碳浓度、温度、湿度等)能保证在吸入造模时,不会因为缺氧、温度过高等因素导致动物异常(如死亡),本次研究对烟雾暴露舱内的环境条件进行的监测。结果显示,氧气浓度大于 19%,二氧化碳浓度小于 1%,温度为 19 ~ 25℃,湿度为 30% ~ 70%。自制烟熏箱因无法配置环境监测的配件,无法实时监测箱体内的氧气、二氧化碳浓度

和箱体温度,因此采用自制烟熏箱造模的全身暴露组在造模期间有 1 只动物死亡,且动物在造模期间均表现出一定的临床观察异常(如体重降低、毛发枯黄无光泽等),上述异常症状可能与动物长期处于缺氧和高温环境有关。

本次研究通过将 1.0 mg/kg 脂多糖经气管滴注,并分别联合全身暴露和定量口鼻吸入来诱导大鼠慢阻肺模型,并在造模期间对模型的进展情况进行动态监测(监测指标包括肺功能、肺泡灌洗液和肺组织病理检查),以确定大鼠 COPD 模型在烟雾定量吸入条件下的成模时间,并比较全身暴露和定量口鼻吸入造模方法的差异。结果显示:(1)采用烟雾全身暴露和烟雾定量口鼻吸入均可诱导形成大鼠慢性阻塞性肺病模型,两种造模方法形成的模型具有相同的病理生理改变(包括:①FEV_{0.2}/FVC 和 Cydn 显著减小,Penh 显著增大;②IL-6 和 TNF- α 水平的显著升高;③支气管、细支气管及附近肺泡均可见明显的慢性炎症浸润,肺泡腔显著增大,肺平均内衬间隔显著增大,肺泡数显著减少)。(2)慢阻肺的病理改变包括慢性支气管炎和(或)肺气肿^[1-3],烟雾全身暴露组和烟雾口鼻吸入组均可诱导产生明显的慢性支气管炎,但与烟雾全身暴露组相比,口鼻吸入诱导形成的慢性支气管炎病变程度更严重,造模 8 周可形成中度至重度支气管炎病变(同时经口鼻吸入法可诱导更早发生肺气肿病变,提示烟雾定量经口鼻吸入法的成模周期更短。以模型动物同时伴有慢性支气管炎和肺气肿病变作为 COPD 的成模标准进行判断,烟雾全身暴露法造模 4、6、8 周的成模率(同时伴有支气管炎和肺气肿)分别为 20%、30%、70%,造模 8 周可初步建立 COPD 模型,且支气管-肺组织病变主要集中于轻度至中度改变(慢性炎症浸润和(或)肺气肿),同时部分动物未见肺气肿病变,动物个体间的肺组织病变均一性较差。经口鼻吸入法在造模 4、6、8 周的成模率分别为 40%、100%、100%,提示造模 6 ~ 8 周即可成功建立 COPD 模型,这小于文献报道的造模周期^[16-18],且经 6 周造模可诱导形成轻度至中度为主的慢性阻塞性肺病,主要表现为肺功能显著下降,肺部炎症因子水平(IL-6、TNF- α)显著升高,支气管-肺组织主要表现为轻度至中度的炎症浸润,并伴有轻度至中度的肺气肿;烟雾口鼻吸入法造模 8 周可诱导形成中度至重度的慢性阻塞性肺病,同时肺功可见显著下降,肺部炎症因子水平显著升高,

且烟雾定量口鼻吸入法诱导形成的模型个体差异更小(个体间的 CV% 值更小, 仅为烟雾全身暴露法各检测指标 CV% 值的 0.1 ~ 0.5 倍), 组织病理改变更均一, 且病变更严重。(4) 采用烟雾口鼻吸入法进行 COPD 模型的构建, 造模期间各环境参数稳定(氧气浓度、二氧化碳浓度、温度、湿度等), 且模型动物未见死亡; 采用烟雾全身暴露法进行 COPD 的构建, 造模第 4 周可见 1 只大鼠死亡, 可能与动物吸入烟雾时导致的缺氧有关。

本次研究虽通过“定量吸烟装置”实现了烟雾的定量吸入, 并实现了大鼠 COPD 模型造模剂量的相对量化(烟雾吸入剂量分别为 50.8 mg/kg(以烟雾颗粒计)和 4.6 mg/kg(以尼古丁计))。但需注意的是, 香烟的组成成分复杂, 生成的烟雾包括了固相成分和气相成分^[10-12], 本次研究仅对其中的固相成分进行了定量(包括:(1)整体的烟雾颗粒;(2)单一的代表性成分:尼古丁), 无法完全代表烟雾的整体成分, 同时不同来源的香烟生成的烟雾成分不甚相同^[39-43], 这些因素均对烟雾口鼻吸入构建 COPD 模型的标准化(造模剂量标准化、造模时间标准化、生理病理改变标准化)产生了影响, 但本次研究至少提供了一种烟雾生成和造模条件的质量控制方案, 为 COPD 模型构建的稳定重现提供实验参考, 同时后续可进一步研究比较不同来源的烟雾(焚烧烟雾、尾气烟雾、工业烟雾等)对 COPD 构建的影响。

4 结论

综上所述, LPS(1.0 mg/kg)气管滴注联合烟雾全身暴露或烟雾口鼻吸入均能构建典型的大鼠慢性阻塞性肺病模型, 其中烟雾口鼻吸入能缩短模型构建的造模周期, 连续造模 6 周即可成模, 表现为典型的慢性阻塞性肺病症状(肺通气功能障碍, 支气管-肺组织慢性炎症浸润, 并同时伴有肺气肿), 且模型动物个体间的差异更小。

参 考 文 献(References)

- [1] Christenson SA, Smith BM, Bafadhel M, et al. Chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Lancet*, 2022, 399(10342): 2227-2242.
- [2] Yang IA, Jenkins CR, Salvi SS. Chronic obstructive pulmonary disease in never-smokers: risk factors, pathogenesis, and implications for prevention and treatment [J]. *Lancet Respir Med*, 10(5): 497-511.
- [3] Segal LN, Martinez FJ. Chronic obstructive pulmonary disease subpopulations and phenotyping [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 141(6): 1961-1971.
- [4] Zhang D, Guan Y, Xia Y, et al. Advances in animal models of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Acad J Second Military Med Univ*, 2018, 39(3): 302-307.
- [5] Lai HC, Lin TL, Chen TW, et al. Gut microbiota modulates COPD pathogenesis: role of anti-inflammatory *Parabacteroides goldsteinii* lipopolysaccharide [J]. *Gut*, 2022, 71(2): 309-321.
- [6] Jiang YJ, Zhang PB, Ye XW. Research progress in rat model of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Med Recapitulate*, 2021, 7: 27.
- [7] Sevilla-Montero J, Labrousse-Arias D, Fernández-Pérez C, et al. Cigarette smoke directly promotes pulmonary arterial remodeling and Kv7.4 channel dysfunction [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2021, 203(10): 1290-1305.
- [8] Liu D, Zhang HC. Methods for animal models of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Chin J Comp Med*, 2020, 30(3): 7.
- [9] Zheng H, Wu TP, Wang Y, et al. Effect of nicotine? and tar? free cigarette smoke extract on smooth muscle α 43 density and erection of penile in rats [J]. *Med J Wuhan Univ*, 2022, 43(1): 52-55.
- [10] Zhang JP, Zhang YY, Li N. Study on the characteristics of PAHs on solid PM2.5 emitted by indoor burning of cigarettes and mosquito coils [J]. *Build Sci*, 2021, 37(6): 10.
- [11] DeCarlo PF, Avery AM, Waring MS. Thirdhand smoke uptake to aerosol particles in the indoor environment [J]. *Sci Adv*, 2018, 4(5): eaap8368.
- [12] Tian Y, Harrison RM, Feng Y, et al. Size-resolved source apportionment of particulate matter from a megacity in Northern China based on one-year measurement of inorganic and organic components [J]. *Environ Pollut*, 2021, 289: 117932.
- [13] Liu XW, Chen QF, Tang XY, et al. Strategy for non-clinical safety evaluation of inhaled drugs [J]. *Cent S Pharm*, 2021, 19(5): 7.
- [14] OECD guidelines for the testing of chemicals. Test No. 403: Acute Inhalation Toxicity [EB/OL]. [2009-09-08]. <https://doi.org/10.1787/9789264070608-en>.
- [15] OECD guidelines for the testing of chemicals, Test No. 413: Subchronic Inhalation Toxicity: 90-day Study [EB/OL]. [2009-09-08]. <https://doi.org/10.1787/9789264070806-en>.
- [16] Joo DH, Lee KH, Lee CH, et al. Developmental endothelial locus-1 as a potential biomarker for the incidence of acute exacerbation in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Respir Res*, 2021, 22(1): 297.
- [17] Laiman V, Lee YL, Hou YW, et al. Reduction of emphysema severity by human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(16): 8906.
- [18] Lin L, Hou G, Han D, et al. Ursolic acid protected lung of rats from damage induced by cigarette smoke extract [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 700.
- [19] Yu N, Sun YT, Su XM, et al. Treatment with eucalyptol mitigates cigarette smoke-induced lung injury through suppressing

- ICAM-1 gene expression [J]. Biosci Rep, 2018, 38(4): BSR20171636.
- [20] Jang YO, Lee SH, Choi JJ, et al. Fecal microbial transplantation and a high fiber diet attenuates emphysema development by suppressing inflammation and apoptosis [J]. Exp Mol Med, 2020, 52(7): 1128–1139.
- [21] Takeda K, Ning F, Domenico J, et al. Activation of p70S6 kinase-1 in mesenchymal stem cells is essential to lung tissue repair [J]. Stem Cells Transl Med, 2018, 7(7): 551–558.
- [22] Li N, Zhang JP, Li Y. Concentration distribution and emission characteristics of cigarettes with different particle sizes [J]. Build Sci, 2020, 36(8): 7.
- [23] Newman SP, Chan HK. *In vitro-in vivo* correlations (IVIVCs) of deposition for drugs given by oral inhalation [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2020, 167: 135–147.
- [24] Zhou W, Shen M, Lam JCW et al. Size-dependent distribution and inhalation exposure characteristics of particle-bound chlorinated paraffins in indoor air in guangzhou, China [J]. Environ Int, 2018, 121(1): 675–682.
- [25] Farkas Á, Tomisa G, Szénási G, et al. The effect of lung emptying before the inhalation of aerosol drugs on drug deposition in the respiratory system [J]. Int J Pharm X, 2023, 6: 100192.
- [26] Guo L, Salimi F, Wang H, et al. Experimentally determined deposition of ambient urban ultrafine particles in the respiratory tract of children [J]. Environ Int, 2020, 145: 106094.
- [27] Manigrasso M, Costabile F, Liberto LD, et al. Size resolved aerosol respiratory doses in a Mediterranean urban area: from PM₁₀ to ultrafine particles [J]. Environ Int, 2020, 141: 105714.
- [28] Mikheev VB, Ivanov A, Lucas EA, et al. Aerosol size distribution measurement of electronic cigarette emissions using combined differential mobility and inertial impaction methods; smoking machine and puff topography influence [J]. Aerosol Sci Technol, 2018, 52(11): 1233–1248.
- [29] Deshun H, Wenqi H, Song H, et al. Study on the diffusion and control of particulate matter produced by cigarette combustion in room [J]. Contam Control Air Cond Technol, 2021, 2: 4.
- [30] Zhuang JW, Diao YF, Chu Mg, et al. Transport and deposition characteristics of inhalable particulate matters in different obstructive airways [J]. China Environ Sci, 2021, 41(7): 11.
- [31] Hauser CD, Mailig R, Stadler H, et al. Waterpipe tobacco smoke toxicity: the impact of waterpipe size [J]. Tob Control, 2020, 29(2): s90-s94.
- [32] Martuzevicius D, Prasauskas T, Setyan A, et al. Characterization of the spatial and temporal dispersion differences between exhaled E-cigarette mist and cigarette smoke [J]. Nicotine Tob Res, 2019, 21(10): 1371–1377.
- [33] Bernd K, DeGrood D, Stadler H, et al. Contributions of charcoal, tobacco, and syrup to the toxicity and particle distribution of waterpipe tobacco smoke [J]. Toxicol Lett, 2019, 313: 60–65.
- [34] Zou CW, Deng MM, Huang YX, et al. Emission characteristics of VOCs in free burning smoke of cigarettes and e-cigarettes [J]. Environ Pollut Control, 2022, 44(3): 6.
- [35] Voliotis A, Bezantakos S, Besis A, et al. Mass dose rates of particle-bound organic pollutants in the human respiratory tract: implications for inhalation exposure and risk estimations [J]. Int J Hyg Environ Health, 2021, 234: 113710.
- [36] Jin Y, Cui H, Chen L, et al. Effects of airway deformation and alveolar pores on particle deposition in the lungs [J]. Sci Total Environ, 2022, 831: 154931.
- [37] Shen AM, Minko T. Pharmacokinetics of inhaled nanotherapeutics for pulmonary delivery [J]. J Control Release, 2020, 326: 222–244.
- [38] Wu N, Lu B, Chen J, et al. Size distributions of particle-generated hydroxyl radical ($\cdot$ OH) in surrogate lung fluid (SLF) solution and their potential sources [J]. Environ Pollut, 2021, 268: 115582.
- [39] Scherer G, Scherer M, Rügner N, et al. Assessment of the exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in users of various tobacco/nicotine products by suitable urinary biomarkers [J]. Arch Toxicol, 2022, 96(11): 3113–3126.
- [40] Dusauroir R, Zarcone G, Verrielle M, et al. Comparison of the chemical composition of aerosols from heated tobacco products, electronic cigarettes and tobacco cigarettes and their toxic impacts on the human bronchial epithelial BEAS-2B cells [J]. J Hazard Mater, 2021, 401: 123417.
- [41] Wang SQ, Wang WJ, Wu CC, et al. Low tar level does not reduce human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental tobacco smoke [J]. Environ Sci Technol, 54(2): 1075–1081.
- [42] Soleimani F, Dobaradaran S, De-la-Torre GE, et al. Content of toxic components of cigarette, cigarette smoke vs cigarette butts: a comprehensive systematic review [J]. Sci Total Environ, 2022, 813: 152667.
- [43] Solomou N, Fernández E, Szafnauer R, et al. Total and bioavailable polycyclic aromatic hydrocarbons in unused and operated heat-not-burn tobacco products and conventional cigarettes [J]. Chemosphere, 2023, 335: 139050.

[收稿日期] 2023-01-14