

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810049452.3

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 21/00 (2006.01)

[43] 公开日 2008年8月27日

[11] 公开号 CN 101251536A

[22] 申请日 2008.4.1

[21] 申请号 200810049452.3

[71] 申请人 中国烟草总公司郑州烟草研究院

地址 450001 河南省郑州市高新技术产业开发区枫杨街2号

[72] 发明人 谢剑平 朱茂祥 杨陟华 聂 聪  
赵 乐 彭 斌 谢复炜 刘惠民

[74] 专利代理机构 郑州中民专利代理有限公司

代理人 姜振东

权利要求书1页 说明书5页

[54] 发明名称

评价卷烟烟气毒性的小鼠体内微核分析检测方法

[57] 摘要

一种评价卷烟烟气毒性的小鼠体内微核分析检测方法，其特征在于：采取体内微核试验方式，通过小鼠灌胃染毒、细胞培养、固定、染色后，采用抗体荧光标记法直接测定微核率。具体包括以下步骤：a. 选择小鼠，b. 卷烟烟气凝集物制备，c. 小鼠进行卷烟烟气冷凝物(CSC)染毒，d. 抽血进行培养、固定、染色、计数，e. 实验结果进行处理和分析，评价卷烟烟气毒性。本发明相比现有技术的优点在于：方法灵敏性高，结果可靠，开创了一种新型的用于评价卷烟烟气毒性的检测方法。

1、一种评价卷烟烟气毒性的小鼠体内微核分析检测方法，其特征在于：采取体内微核试验方式，通过小鼠灌胃染毒、细胞培养、固定、染色后，采用抗体荧光标记法直接测定微核率。

2、根据权利要求1所述的评价卷烟烟气毒性的小鼠体内微核分析检测方法，其特征在于：该检测方法包括以下步骤：

a、选择小鼠；

b、卷烟烟气凝集物制备：按标准吸烟法，将烟气分别经过装有有机相（乙酸乙酯）和无机相（基础培养液）的空气采样器收集，将有机相与无机相培养液混合，并用细胞培养液将浓度调整为1-2支烟/ml，-80℃保存；

c、小鼠进行卷烟烟气冷凝物（CSC）染毒，每鼠灌胃口服急性毒性剂量的1/2LD50，1/4LD50和1/8LD50，正常对照组灌胃同体积的基础培养液；

d、抽血进行培养、固定、染色、计数，36h后取尾静脉血5μL加入含肝素的40μL NaHCO<sub>3</sub>缓冲液中，加入-80℃预冷的1ml甲醇，置-80℃中固定24h以上；取100μL固定好的血样加入0.5ml 4℃预冷的NaHCO<sub>3</sub>缓冲液中（0.9% NaCl，5.3mmol/L NaHCO<sub>3</sub>，调pH7.5），离心，去上清，分别加入10μL RNA酶（10mg/ml，沸水灭活15min）、0.5μL LCD71抗体（0.5mg/mL）、70μL NaHCO<sub>3</sub>缓冲液，4℃放置1~2h后37℃温育45min；加入300μL 4℃预冷的PI（碘化丙啶，1.33μg/ml），混匀，4℃染色过夜；用流式细胞仪检测20000个网织红细胞中的微核细胞数，实验结果用每1000个网织红细胞中的微核细胞数表示；

e、实验结果进行处理和分析，评价卷烟烟气毒性。

3、根据权利要求2所述的评价卷烟烟气毒性的小鼠体内微核分析检测方法，其特征在于：所选小鼠6-7周龄，体重18-22克，为二级NIH小鼠。

4、根据权利要求2所述的评价卷烟烟气毒性的小鼠体内微核分析检测方法，其特征在于：离心分离时转速3000转/min，时间10min。

## 评价卷烟烟气毒性的小鼠体内微核分析检测方法

### 技术领域

本发明涉及卷烟烟气冷凝物毒性评价领域，具体说是一种评价卷烟烟气毒性的小鼠体内微核分析检测方法，是利用小鼠微核试验来评价卷烟烟气毒性，本发明的方法为评价卷烟烟气毒性提供一种灵敏性高、结果可靠的手段。

### 背景技术

近年来，国际上对烟草制品及烟用添加剂的危害性评价开展了大量研究工作。

1999年FDA（美国食品药品监督管理局）要求IOM（美国科学院医学研究所）制定一套科学的方法，用于评估长期使用药物产品或者烟草替代产品（用于降低而不是消除烟草危害）的安全性和效果。根据目前的研究结果，感受烟草产品的生物标记已得到验证并应用。但是，生物标记的早期指标在用于预测后期的疾病发展上几乎没有得到验证，目前已有的知识尚不足以支持进行正式的“低危害”卷烟产品评估。体外毒性测试并非危害的直接测定，但可以确保烟草产品不会增加潜在的危害，毒理学数据可以在一定程度上支持“低危害”卷烟产品的评价。

CORESTA（国际烟草科学研究合作中心）也成立了相关的工作组（烟草烟气体外毒性测试工作组），其主要任务是根据国际认可的体外毒性测试准则并加以修改，以适应烟草烟气的性质和独特特性，确定主要的方法。根据研究结果，对于细胞遗传学/突变的哺乳动物细胞分析，工作组推荐体外微核分析

（Micronucleus Test）、染色体畸变分析或L5178Y小鼠淋巴瘤分析[Doolittle, D. J., Massey, E. D., CORESTA Task Force On In Vitro Toxicity Testing of Tobacco Smoke, 烟草制品及卷烟添加剂安全评价与低潜在性危害卷烟产品开发

国际研讨会,杭州,2004.10]。

目前国内外评价卷烟烟气毒性的微核分析均采用体外法,该方法虽然简单,但可信度较低。微核检测将细胞制成涂片,固定染色后用显微镜计数1000个多染红细胞的微核数,计数工作量极大,人为影响因素多,且容易出现微核误判。

## 发明内容

本发明的目的正是针对上述现有技术中所存在的问题而开发的一种评价卷烟烟气毒性的小鼠体内微核分析检测方法,即采用体内微核试验,利用抗体荧光标记法直接测定微核率,该方法灵敏性高、结果可靠。

本发明的目的是通过以下技术方案来实现的:本发明的评价卷烟烟气毒性的小鼠体内微核分析检测方法是采取体内微核试验方式,通过小鼠灌胃染毒、细胞培养、固定、染色后,采用抗体荧光标记法直接测定微核率。

本发明的具体检测方法包括以下步骤:

a、选择小鼠;

b、卷烟烟气凝集物制备:按标准吸烟法,将烟气分别经过装有有机相(乙酸乙酯)和无机相(基础培养液)的空气采样器收集,将有机相与无机相培养液混合,并用细胞培养液将浓度调整为1-2支烟/ml, -80℃保存;

c、小鼠进行卷烟烟气冷凝物(CSC)染毒,每鼠灌胃口服急性毒性剂量的1/2LD<sub>50</sub>, 1/4LD<sub>50</sub>和1/8LD<sub>50</sub>,正常对照组灌胃同体积的基础培养液;

d、抽血进行培养、固定、染色、计数,36h后取尾静脉血5μL加入含肝素的40μL NaHCO<sub>3</sub>缓冲液中,加入-80℃预冷的1ml甲醇,置-80℃中固定24h以上;取100μL固定好的血样加入0.5ml 4℃预冷的NaHCO<sub>3</sub>缓冲液中(0.9% NaCl, 5.3mmol/L NaHCO<sub>3</sub>,调pH7.5),离心(3000转/min, 10min),去上清,分别加入10μL RNA酶(10mg/ml,沸水灭活15min)、0.5μLCD71抗体(0.5mg/mL)、70μL NaHCO<sub>3</sub>缓冲液,4℃放置1~2h后37℃温育45min。加入300μL 4℃预冷的PI(碘化丙啶,1.33μg/ml),混匀,4℃染色过夜。用流式细胞仪检测20000个网织红细胞中的微核细胞数,实验结果用每1000个网织红

细胞中的微核细胞数表示;

e、实验结果进行处理和分析,评价卷烟烟气毒性。

所述小鼠为6-7周龄,体重18-22克,为二级NIH小鼠。

在本发明中,离心分离时转速3000转/min,时间10min。

本发明具体要求是:1. 试验动物:二级NIH小鼠(6-7周龄,体重18-22g),雌雄各半(每种卷烟20只)。2. 检疫(3d)合格的NIH小鼠,进行卷烟烟气冷凝物(CSC)染毒,如果比较不同卷烟的微核,则以CSC口服毒性最大的卷烟剂量为准,正常对照组灌胃同体积的基础培养液。

本发明相比现有技术的优点在于:方法灵敏性高,结果可靠,开创了一种新型的用于评价卷烟烟气毒性的检测方法。

## 具体实施方式

本发明以下结合不同类型卷烟(实施例)作进一步描述:

### 实施例1

对某一国产烤烟型品牌卷烟进行评价。卷烟烟气分别经过有机相(乙酸乙酯)和无机相(基本培养液)收集。将有机溶剂与培养液混合,并用细胞培养液将浓度调整为1支烟/ml。 $-80^{\circ}\text{C}$ 保存,CSC经口服毒性测得其中一个LD50高者为13.2支/Kg,则 $1/2\text{LD}_{50}$ 为6.6支/Kg、将购于中国药品生物制品检定所SPF级NIH-q小鼠(体重18-22g)随机分为正常对照组、阳性对照组(环磷酰胺50mg/Kg)和卷烟组(因组别较多采用单一剂量6.6支/Kg),每组20只(雌雄各半),分别给药,36h后取尾静脉血 $5\mu\text{L}$ 加入含肝素(10u/ml)的 $40\mu\text{L}$   $\text{NaHCO}_3$ 缓冲液中,加入 $-80^{\circ}\text{C}$ 预冷的1ml甲醇(将加入1.0ml分析纯甲醇的1.5ml离心管置于含1/3水的乙醇中,放入 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜),置 $-80^{\circ}\text{C}$ 中固定24h。取 $100\mu\text{L}$ 固定好的血样加入 $0.5\text{ml}$   $4^{\circ}\text{C}$ 预冷的 $\text{NaHCO}_3$ 缓冲液中( $0.9\%$   $\text{NaCl}$ ,  $5.3\text{mmol/L}$   $\text{NaHCO}_3$ ,调pH7.5),离心(3000转/min,10min),去上清,分别加入 $10\mu\text{L}$  RNA酶(10mg/ml,沸水灭活15min)、 $0.5\mu\text{L}$  LCD71抗体(0.5mg/mL)、 $70\mu\text{L}$   $\text{NaHCO}_3$ 缓冲液, $4^{\circ}\text{C}$ 放置1~2h后 $37^{\circ}\text{C}$ 温育45min。加入 $300\mu\text{L}$   $4^{\circ}\text{C}$ 预冷的PI(碘化

丙啶, 1.33  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$  染色过夜。用流式细胞仪检测 20000 个 CD71 阳性细胞 (网织红细胞) 中的 PI 阳性细胞数,

$$\text{微核率}(\%) = \{ \text{CD71}^+\text{PI}^+ / (\text{CD71}^+ + \text{CD71}^+\text{PI}^+) \} * 1000.$$

某一国产卷烟烟气诱发小鼠微核形成率 ( $\%$ )

卷烟类别	微核形成率 ( $\%$ )
国产烤烟	14.52

## 实施例 2

对某一国产混合型卷烟进行评价。卷烟烟气分别经过有机相 (乙酸乙酯) 和无机相 (基本培养液) 收集。将有机溶剂与培养液混合, 并用细胞培养液将浓度调整为 1 支烟/ $\text{ml}$ 。-80 $^{\circ}\text{C}$  保存, CSC 经口服毒性测得其中一个 LD50 高者为 13.2 支/ $\text{Kg}$ , 则 1/2LD50 为 6.6 支/ $\text{Kg}$ 、将购于中国药品生物制品检定所 SPF 级 NIH-q 小鼠 (体重 18-22g) 随机分为正常对照组、阳性对照组 (环磷酰胺 50mg/ $\text{Kg}$ ) 和各卷烟组 (因组别较多采用单一剂量 6.6 支/ $\text{Kg}$ ), 每组 20 只 (雌雄各半), 分别给药, 36h 后取尾静脉血 5  $\mu\text{L}$  加入含肝素 (10u/ $\text{ml}$ ) 的 40  $\mu\text{L}$   $\text{NaHCO}_3$  缓冲液中, 加入 -80 $^{\circ}\text{C}$  预冷的 1ml 甲醇 (将加入 1.0ml 分析纯甲醇的 1.5ml 离心管置于含 1/3 水的乙醇中, 放入 -80 $^{\circ}\text{C}$  冰箱过夜), 置 -80 $^{\circ}\text{C}$  中固定 24h。取 100  $\mu\text{L}$  固定好的血样加入 0.5ml 4 $^{\circ}\text{C}$  预冷的  $\text{NaHCO}_3$  缓冲液中 (0.9%  $\text{NaCl}$ , 5.3mmol/L  $\text{NaHCO}_3$ , 调 pH7.5), 离心 (3000 转/ $\text{min}$ , 10min), 去上清, 分别加入 10  $\mu\text{L}$  RNA 酶 (10mg/ $\text{ml}$ , 沸水灭活 15min)、0.5  $\mu\text{L}$  CD71 抗体 (0.5mg/ $\text{mL}$ )、70  $\mu\text{L}$   $\text{NaHCO}_3$  缓冲液, 4 $^{\circ}\text{C}$  放置 1~2h 后 37 $^{\circ}\text{C}$  温育 45min。加入 300  $\mu\text{L}$  4 $^{\circ}\text{C}$  预冷的 PI (碘化丙啶, 1.33  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$  染色过夜。用流式细胞仪检测 20000 个 CD71 阳性细胞 (网织红细胞) 中的 PI 阳性细胞数,

$$\text{微核率}(\%) = \{ \text{CD71}^+\text{PI}^+ / (\text{CD71}^+ + \text{CD71}^+\text{PI}^+) \} * 1000.$$

某一国产混和型卷烟烟气诱发小鼠微核形成率 ( $\%$ )

卷烟类别	微核形成率 ( $\%$ )
国产混合型烟	15.93

### 实施例 3

对某一境外卷烟进行评价。卷烟烟气分别经过有机相（乙酸乙酯）和无机相（基本培养液）收集。将有机溶剂与培养液混合，并用细胞培养液将浓度调整为 1 支烟/ml。-80℃保存，CSC 经口服毒性测得其中一个 LD50 高者为 13.2 支/Kg，则 1/2LD50 为 6.6 支/Kg。将购于中国药品生物制品检定所 SPF 级 NIH-q 小鼠（体重 18-22g）随机分为正常对照组、阳性对照组（环磷酰胺 50mg/Kg）和各卷烟组（因组别较多采用单一剂量 6.6 支/Kg），每组 20 只（雌雄各半），分别给药，36h 后取尾静脉血 5 μL 加入含肝素（10u/ml）的 40 μL NaHCO<sub>3</sub> 缓冲液中，加入 -80℃预冷的 1ml 甲醇（将加入 1.0ml 分析纯甲醇的 1.5ml 离心管置于含 1/3 水的乙醇中，放入 -80℃冰箱过夜），置 -80℃中固定 24h。取 100 μL 固定好的血样加入 0.5ml 4℃预冷的 NaHCO<sub>3</sub> 缓冲液中（0.9% NaCl，5.3mmol/L NaHCO<sub>3</sub>，调 pH7.5），离心（3000 转/min，10min），去上清，分别加入 10 μL RNA 酶（10mg/ml，沸水灭活 15min）、0.5 μLCD71 抗体（0.5mg/mL）、70 μL NaHCO<sub>3</sub> 缓冲液，4℃放置 1~2h 后 37℃温育 45min。加入 300 μL 4℃预冷的 PI（碘化丙啶，1.33 μg/ml），混匀，4℃染色过夜。用流式细胞仪检测 20000 个 CD71 阳性细胞（网织红细胞）中的 PI 阳性细胞数，

$$\text{微核率} (\%) = \{ \text{CD71}^+ \text{PI}^+ / (\text{CD71}^+ + \text{CD71}^+ \text{PI}^+) \} * 1000.$$

某一境外卷烟烟气诱发小鼠微核形成率 (%)

卷烟类别	微核形成率 (%)
境外卷烟	24.69

专利名称(译)	评价卷烟烟气毒性的小鼠体内微核分析检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101251536A</a>	公开(公告)日	2008-08-27
申请号	CN200810049452.3	申请日	2008-04-01
[标]申请(专利权)人(译)	中国烟草总公司郑州烟草研究院		
申请(专利权)人(译)	中国烟草总公司郑州烟草研究院		
当前申请(专利权)人(译)	中国烟草总公司郑州烟草研究院		
[标]发明人	谢剑平 朱茂祥 杨陟华 聂聪 赵乐 彭斌 谢复炜 刘惠民		
发明人	谢剑平 朱茂祥 杨陟华 聂聪 赵乐 彭斌 谢复炜 刘惠民		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/48 G01N21/00		
代理人(译)	姜振东		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

一种评价卷烟烟气毒性的小鼠体内微核分析检测方法，其特征在于：采取体内微核试验方式，通过小鼠灌胃染毒、细胞培养、固定、染色后，采用抗体荧光标记法直接测定微核率。具体包括以下步骤：a.选择小鼠，b.卷烟烟气凝集物制备，c.小鼠进行卷烟烟气冷凝物(CSC)染毒，d.抽血进行培养、固定、染色、计数，e.实验结果进行处理和分析，评价卷烟烟气毒性。本发明相比现有技术的优点在于：方法灵敏性高，结果可靠，开创了一种新型的用于评价卷烟烟气毒性的检测方法。

卷烟烟气诱发小鼠微核形成率(‰)

卷烟类别	微核形成率(‰)
国产烤烟	14.52