



LLNA: BrdU-ELISA 改良法的建立及其在 化妆品安全性评价中的应用

胡培丽, 罗飞亚, 陈志蓉, 邢书霞

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

【摘要】 目的 建立可快速检测化学物致敏性和刺激性的局部淋巴结试验(LLNA: BrdU-ELISA)改良法, 并对化妆品产品进行评价。方法 3种化学物(2,4-二硝基氯苯(DNCB)、丁香酚、己基肉桂醛)和3种化妆品产品作为受试物, 雌性BALB/c小鼠连续染毒3天, 测量小鼠耳缘厚度, 第5天腹腔注射BrdU, 第6天称耳廓重, 分离颌下淋巴结称重并制取单细胞悬液, 用ELISA试剂盒检测淋巴细胞增殖。结果 DNCB(1.0%)、己基肉桂醛(25%、50%)和3号粉底霜引起耳肿胀和耳廓重显著增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 可能为刺激物, 其他均无刺激性; 3种化学物和3号粉底霜致敏检测阳性, 其他均为阴性。结论 结合小鼠耳肿胀和耳廓重的LLNA: BrdU-ELISA改良法可较好地评价化学物和化妆品产品的致敏性和刺激性, 有望在化妆品安全性评价中发挥重要作用。

【关键词】 局部淋巴结试验; 致敏性; 刺激性; 化妆品

【中图分类号】 R758.21; R758.22; R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014)09-0023-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.009.006

Establishment of modified LLNA: BrdU-ELISA and its application in the safety evaluation of cosmetics

HU Pei-li, LUO Fei-ya, CHEN Zhi-rong, XING Shu-xia

(National Institutes for food and drug control, Beijing 100050, China)

【Abstract】 Objective To establish a rapid modified Local lymph node assay (LLNA) for the sensitization and irritancy potential of chemicals, and evaluate cosmetics products. **Methods** 3 kinds of chemicals (2, 4-Dinitrochlorobenzene (DNCB), Eugenol and Hexyl cinnamic aldehyde) and 3 kinds of cosmetics were selected. The dorsal sides of both ears of female BALB/c mice were treated with 25 μ L/ear of the test solutions on 3 consecutive days, and the thickness of each ear was measured. BrdU solution was injected inter-peritoneally on day 5. On day 6, each auricle was weighed, the bilateral draining auricular lymph nodes were excised and weighed, then made into single cell suspension. BrdU was measured by ELISA using a commercial kit. **Results** Ear swelling and auricle weight of DNCB (1.0%), Eugenol (25% and 50%) and number 3 cream foundation increased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), which may be considered as irritants. The others were negative. For LLNA, three chemicals and number 3 cream foundation pretended positive. **Conclusion** The combined LLNA/ear swelling/ear weight assay appears to be a reliable predictor of sensitization and irritancy potential, and is expected to play an important role in safety evaluation of

[基金项目] 中青年基金项目(2013NC3)。

[作者简介] 胡培丽(1981-), 女, 硕士生, 助理研究员, 研究方向: 食品化妆品安全性评价; E-mail: hupeili-1981@163.com。

[通讯作者] 邢书霞, 副研究员, 研究方向: 食品化妆品安全性评价; E-mail: xingshuxia2007@163.com。

cosmetics.

【Key words】 Murine local lymph node assay; Cosmetics; Sensitization; Irritancy

皮肤致敏继而导致接触过敏性皮炎是一种有关职业卫生及消费者健康的重要问题,评价化学物质及产品的皮肤致敏性可以有效地防止接触过敏性皮炎的发生。小鼠局部淋巴结试验(local lymph node assay, LLNA)是目前检测化学物致敏性的最新替代方法,该方法减少了实验动物,灵敏快速,结果客观敏感,已被欧洲经济发展与合作组织(organization for economic co-operation and development, OECD)、欧洲替代试验验证中心(european center for the validation of alternative method, ECVAM)、美国环保署(United States Environmental Protection Agency, USEPA)和中国等采纳为标准实验方法^[1-4]。但该方法需要使用放射性标记物、特定的设备和实验条件,不利于推广。TAKEYOSHI 等^[5-6]建立了基于掺入溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)和酶联免疫吸附测定(ELISA)的 LLNA 方法,已通过实验室间认证并于 2010 年被欧洲经济发展与合作组织(OECD)采纳^[7]。目前我国该方法的相关研究报道还较少,本研究旨在建立一种可快速检测化学物致敏性和刺激性的 LLNA: BrdU-ELISA 改良法,从而进一步评价化妆品产品。

1 材料和方法

1.1 受试物

AOO 溶剂:由丙酮:橄榄油 = 4:1 (v/v) 配制而成,致敏阳性剂:2,4 二硝基氯苯(DNCB, 中国医药总公司北京分公司),用 AOO 配成 0.1% (w/v)、0.3% (w/v)、1.0% (w/v) 3 个浓度;丁子香酚(EUG, Sigma 公司),己基肉桂醛(HCA, Sigma 公司),均用 AOO 配制成 25% (v/v) 和 50% (v/v) 2 个浓度;3 种化妆品原液直接涂抹于小鼠耳背皮肤。

1.2 实验动物

SPF 级 BALB/c 小鼠,雌性,8~10 周龄,由中国食品药品检定研究院实验动物资源中心【SCXK(京)2009-0017】。动物试验环境条件为屏障系统动物房【SYXK(京)2011-0008】,温度 $22 \pm 2^\circ\text{C}$,湿度 50%~70%,动物自由饮食,12 h 人工照明。

1.3 试剂和仪器

BrdU-ELISA 试剂盒、BrdU 粉剂均购自德国 Roche 公司(编号 11647229001、10280879001)。BrdU 标记液用生理盐水配制成浓度 10 mg/mL。

CR22G III 型低温离心机(日本 Hitachi 公司)、SYNERGY HT 型全自动酶标仪(美国 BIO TEK 公司),千分尺(Mitutoyo 公司)。

1.4 方法

1.4.1 动物分组和染毒^[7-8]

动物随机分组,每组 4 只小鼠,分别设溶剂对照组(AOO/蒸馏水)、阳性对照组(2,4 二硝基氯苯、己基肉桂醛、丁子香酚)和 3 种化妆品。将受试物 25 μL /耳/d,连续 3 d 涂抹于小鼠双耳背部皮肤,溶剂对照组涂抹相应的溶剂,第 4 天不处理,第 5 天腹腔注射 0.5 mL BrdU 标记液,第 6 天分离耳部淋巴结。

1.4.2 耳缘厚度测量

分别于首次给药前和末次给药后约 24 h,用千分尺测量小鼠耳缘厚度,第 6 天处死动物后,取小鼠耳缘直径 9 mm 的组织称重。

1.4.3 淋巴细胞悬液的制备

腹腔注射 BrdU 标记液后 24 h 处死动物,摘取小鼠耳部淋巴结,用万分之一天平称重,在 PBS 中研磨,200 目不锈钢筛网过滤,制成单细胞悬液,用 PBS 洗 2 次,离心(1200 r/min, 8 min),将每只小鼠的淋巴细胞定容于 14 mL PBS 中。

1.4.4 ELISA 检测淋巴细胞增殖

将细胞悬液加入到 96 孔培养板中,100 μL /孔,1400 r/min 离心 10 min,弃上清,吹干细胞。用 ELISA 试剂盒检测 BrdU 值:每孔加 200 μL 变性固定液,常温放置 30 min,轻拍完全后弃去变性液;加入 100 μL 抗-BrdU 抗体工作液,常温孵育 90 min;弃去未结合的抗体工作液,加入 240 μL PBS 洗液,洗 3 次,轻拍去除洗液;加底物显色液 100 μL 、常温孵育 20 min,用酶标仪检测吸光度(A)值(发射波长和参考波长分别为 370 nm,492 nm),BrdU 标记指数为(A370 - A 空白 370) - (A492 - A 空白 492)。

1.4.5 SI、EC1.6 的计算与致敏性分级

刺激指数(stimulation index, SI)是受试物组与溶剂对照组的比值,即 $SI = \text{受试物组 BrdU 标记指数均值} / \text{溶剂对照组 BrdU 标记指数均值}$; $SI \geq 1.6$,该受试物为致敏阳性,但对于 SI 为 1.6~1.9 的边缘结果,仍需考虑剂量-效应关系、系统性毒性或过度刺激等症^[7-8]。根据 SI 值计算 EC1.6,即 SI 等于 1.6 时受试物的浓度,并根据 EC1.6 值进行致敏级别判定。计算公式为:① $EC1.6 = c + [(1.6 - d) /$

(b-d)] × (a-c) (受试物各浓度组对应 SI 值包括 > 1.6 和 < 1.6), ② $EC1.6 = 2^{\lceil \log_2(c) + [(1.6 - d) / (b-d)] \times [\log_2(a) - \log_2(c)] \rceil}$ (受试物各浓度组对应 SI 值均 > 1.6), 其中设 a、c 为邻近两点受试物的浓度, b、d 为对应的 SI 值; 当 SI = 1.6 时, 其对应的受试物浓度即为 EC1.6 值^[8]。分级标准为: EC1.6 < 0.1 极强, 0.1 ≤ EC1.6 < 1.0 强, 1.0 ≤ EC1.6 < 10 中, 10 ≤ EC1.6 < 100 弱^[8]。

1.4.6 LLNA: BrdU-ELISA 法结果与文献、经典动物法比较

2,4-二硝基氯苯、丁子香酚和己基肉桂醛的检测结果与相关文献比较, 3 种化妆品同时进行豚鼠局部封闭涂皮试验 (BT) 和家兔多次皮肤刺激性试验^[9], 将数据与本实验数据进行比较。

1.5 统计分析

耳肿胀、耳重、淋巴结重量和 BrdU 标记指数用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS11.5 软件对数据进行统计分析。组间比较采用成组方差分析, $\alpha = 0.05$, 然后双尾 t 检验, $P < 0.05$ 认为组间差异有统计学意义。

2 结果

2.1 染毒期间动物状态观察

染毒期间动物饮食正常, 体重增长良好。部分组别小鼠染毒部位见有水肿、红斑或结痂刺激性或

致敏性症状, 各脏器未见有任何病变, 未观察到明显的其他毒性情况。

2.2 LLNA: BrdU-ELISA 法测定结果

由表 1 可见刺激性指标: DNCB (1.0%)、HCA (25%、50%) 和 3 号粉底霜的耳肿胀和耳廓重显著增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 判断可能为刺激物; 其他组与对照组比较 (DNCB、EUG 与 AOO 组比较, 1、2 号精华霜与蒸馏水组比较), 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

由表 2 可见致敏性指标: 3 种化学物 (所有浓度) 淋巴结重量与 AOO 组比较, 均有统计学意义 ($P < 0.01$); 3 号粉底霜淋巴结重量与蒸馏水组比较显著增加 ($P < 0.01$); SI 均大于 1.6 (1.9)。1、2 号精华霜组淋巴结重量与蒸馏水组比较无明显差异 ($P > 0.05$), 且 SI 均小于 1.6。致敏性分级结果为: DNCB 为极强致敏物, EUG 和 HCA 为中等强度致敏物。

2.3 LLNA: BrdU-ELISA 法、BT 法与多次皮肤刺激性试验法对 3 种化妆品的致敏性和刺激性检测结果

由表 3 可见, 1、2 号精华霜试验结果均为无刺激性、无致敏性; 3 号粉底霜 LLNA: BrdU-ELISA 法结果为有刺激性和致敏性, 多次皮肤刺激性试验结果为有刺激性, BT 试验结果为无致敏性。

表 1 3 种化学物和 3 种化妆品的皮肤刺激性检测结果表

Tab.1 The dermal irritation test result of three kinds of chemicals and three kinds of cosmetics

组别 Groups	浓度 Concentration (%)	耳肿胀 Ear swelling (mm)	耳重 Ear weight (mg)	刺激性 Irritation
AOO	0	0.017 ± 0.005	35.97 ± 1.53	NI
2,4-二硝基氯苯 (DNCB)	0.1	0.019 ± 0.003	36.86 ± 2.14	NI
	0.3	0.021 ± 0.008	37.95 ± 1.62	NI
	1.0	0.040 ± 0.008**	43.56 ± 1.34**	I
丁子香酚 (EUG)	25	0.015 ± 0.006	35.15 ± 1.35	NI
	50	0.017 ± 0.003	35.63 ± 2.77	NI
己基肉桂醛 (HCA)	25	0.028 ± 0.005*	41.95 ± 1.57**	I
	50	0.035 ± 0.005**	42.89 ± 1.60**	I
蒸馏水 (Distilled water)	0	0.008 ± 0.005	34.96 ± 1.45	NI
1 号精华霜 (NO.1 Essence cream)	100	0.009 ± 0.006	36.70 ± 2.52	NI
2 号精华霜 (NO.2 Essence cream)	100	0.011 ± 0.003	37.15 ± 1.84	NI
3 号粉底霜 (No. 3 foundation cream)	100	0.134 ± 0.007###	56.15 ± 2.73###	I

注: * 与 AOO 组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; ## 与蒸馏水组比较 $P < 0.01$. NI: 无刺激性; I: 刺激性。

Note: * Compared with AOO group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; ## Compared with distilled water group, $P < 0.01$. NI: nonirritation; I: irritation.

表 2 3 种化学物和 3 种化妆品的皮肤致敏性检测结果表
 Tab. 2 The skin sensitization test result of three kinds of chemicals and three kinds of cosmetics

组别 Groups	浓度 Concentration (%)	淋巴结重量 LN weight (mg)	BrdU 标记指数 BrdU labelling index	刺激指数 Stimulation index	EC1.6 (%)	致敏性分级 Sensitization classification
AOO	0	6.78 ± 0.64	0.128 ± 0.017	1.0	—	—
2,4-二硝基氯苯(DNCB)	0.1	11.88 ± 1.07**	0.303 ± 0.045	2.37	0.08	VS
	0.3	17.34 ± 0.58**	0.882 ± 0.127	6.89		
	1.0	21.83 ± 0.81**	1.088 ± 0.102	8.50		
丁子香酚(EUG)	25	12.63 ± 1.02**	0.431 ± 0.078	3.37	6.68	M
	50	14.42 ± 0.84**	0.550 ± 0.063	4.30		
己基肉桂醛(HCA)	25	13.86 ± 0.98**	0.577 ± 0.052	4.51	4.02	M
	50	17.51 ± 1.24**	0.717 ± 0.084	5.60		
蒸馏水(Distilled water)	0	5.83 ± 0.72	0.106 ± 0.020	1.0	—	—
1号精华霜 (NO.1 Essence cream)	100	6.82 ± 0.63	0.158 ± 0.017	1.49	—	—
2号精华霜 (NO.2 Essence cream)	100	6.08 ± 0.53	0.117 ± 0.025	1.10	—	—
3号粉底霜 (No.3 Foundation cream)	100	13.23 ± 1.42##	0.269 ± 0.041	2.54	—	—

注: **与 AOO 组比较 $P < 0.01$; ##与蒸馏水组比较 $P < 0.01$ 。VS: 极强; M: 中。

Note: ** Compared with AOO group, $P < 0.01$; ## Compared with distilled water group, $P < 0.01$; NC: not calculated. VS: very strong; M: moderate.

表 3 LLNA; BrdU-ELISA 法、BT 法与皮肤刺激性试验法对 3 种化妆品的皮肤刺激性和致敏性检测结果

Tab. 3 The result of LLNA; BrdU-ELISA, BT and dermal irritation test for the skin sensitization and irritation of three kinds of cosmetics

化妆品 Cosmetics	局部淋巴结法 LLNA; BrdU-ELISA	皮肤刺激性试验 Dermal irritation test	局部封闭涂皮试验 Buehler Test
1号精华霜(NO.1 Essence cream)	NI, NS	NI	NS
2号精华霜(NO.2 Essence cream)	NI, NS	NI	NS
3号粉底霜(No.3 Foundation cream)	I, S	I	NS

注: NI: 无刺激性, I: 刺激性; NS: 无致敏性, S: 致敏性。

Note: NI: nonirritation, I: irritation; NS: nonsensitization, S: sensitization.

3 讨论

目前国内《化妆品卫生规范》中关于化妆品致敏性的检测方法是豚鼠最大值试验(GPMT)及局部封闭涂皮试验(BT),但检测周期长、操作复杂、动物数量多、结果评判主观性强^[9]。随着新型化妆品、日用物品等新型化学合成物大量上市,开发可靠的动物替代实验进行评估化学物毒性迫在眉睫。小鼠局部淋巴结法(LLNA)用小鼠代替豚鼠,动物量少,检验周期减短,同时可定量检测受试物致敏性,结果客观。近来国内也有些关于 LLNA 方法的研究报道,如放射法,或用 MTT、BrdU 替代等^[10-13]。本研究建立的 LLNA; BrdU-ELISA 改良法,可用于全面评价化学物、化妆品原料及产品的皮肤刺激性和致敏性。

国际上有研究发现,刺激物和致敏物均可对淋巴细胞产生增殖作用,从而致使 LLNA 产生假阳性^[14-15]。目前有研究通过分析淋巴细胞 B220 +、

CD3 +、CD4 + 表型增强 LLNA 方法的特异性^[16-18],也有增选刺激性指标(耳厚差、耳重)对化学物的致敏性和刺激性进行评价^[19-22]。本研究不仅对淋巴结重量、刺激指数(SI)和 EC 值等致敏性指标进行分析,同时还测量耳厚差和耳重刺激性指标,从而全面评价化学物的刺激性和致敏性;但是致敏假阳性仍需通过细胞分型等技术进一步判定;此外一些含有特殊结构的化学物质可能会影响该方法的识别能力,从而干扰方法的准确性,需用传统的豚鼠试验评价其致敏性^[7]。

3.1 3 种化学物与有关文献的比较

2,4 二硝基氯苯(DNCB)、丁子香酚和己基肉桂醛均是已知的皮肤致敏物^[7-8],本实验中经 LLNA 检测结果均为阳性,根据 EC1.6 值致敏性分级与有关文献报道一致^[8]。高剂量 DNCB 和 HCA 可引起小鼠耳部皮肤红肿或结痂,耳缘厚度与耳重明显增加($P < 0.05$),表明高剂量 DNCB(1%)和 HCA(25%、50%)对皮肤有刺激性,与有关文献报道

一致^[8]。

3.2 LLNA: BrdU-ELISA 法、BT 法与皮肤刺激试验法对 3 种化妆品的致敏性和刺激性检测结果

1、2 号精华霜 BT 法与皮肤刺激试验检测结果均为无刺激性、无致敏性,结果与 LLNA 法一致。3 号粉底霜 BT 法与皮肤刺激试验检测结果为有刺激性、无致敏性,但 LLNA 法结果为有刺激性和致敏性,致敏性判断不一致,我们分析其中的可能原因:(1)BT 试验中阳性致敏物 DNCB 的诱导浓度为 3%,激发浓度为 1.5%;而 LLNA 方法 0.1% DNCB 即可使小鼠淋巴细胞明显增殖($P < 0.05$),表明 LLNA 方法对化学物的致敏性判断可能更灵敏,这与有关报道一致^[20];(2)刺激性引起淋巴细胞增殖从而导致的致敏假阳性,有待于进一步分析淋巴细胞表型,值得深入研究。

综上,LLNA: BrdU-ELISA 改良法操作简单、快速,结果客观,可较好地评价化学物和化妆品产品的皮肤刺激性和致敏性,有望在化妆品安全性评价中推广应用。

参考文献:

- [1] OECD. OECD guideline for the testing of chemicals No. 429: Skin sensitisation: Local lymph node assay [S]. OECD Paris, 2002. <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/45124696.pdf>.
- [2] McGarry HF. The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH [J]. *Toxicology*, 2007, 238 (2): 71 - 89.
- [3] United States Environmental Protection Agency (USEPA). Health effects test guidelines, OPPTs 870, 2600; skin sensitization [S]. USA: EPA, 2003.
- [4] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. GB/T 21827-2008 化学品皮肤变态反应试验局部淋巴结方法[S]. 北京:中国标准出版社,2008.
- [5] Takeyoshi M, Yamasaki K, Yakabe Y, *et al.* Development of non-radio isotopic endpoint of murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation [J]. *Toxicology letters*, 2001, 119(3): 203 - 208.
- [6] Takeyoshi M, Sawaki M, Yamasaki K, *et al.* Assessment of statistic analysis in non-radioisotopic local lymph node assay (non-RI-LLNA) with α -hexylcinnamic aldehyde as an example [J]. *Toxicology*, 2003, 191(2): 259 - 263.
- [7] OECD. OECD guideline for the testing of chemicals No. 442B: Skin sensitization: Local lymph node assay: BrdU-ELISA [S]. OECD Paris, 2010. <http://ntp.niehs.nih.gov/icev/am/suppdocs/feddocs/oecd/oecd-tg442b.pdf>.
- [8] ICCVAM. Test Method Evaluation Report: The Murine Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA, a Nonradioactive Alternative Test Method to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products [R]. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. NIH Publication, 2010. <http://icevam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-ELISA/TMER.htm>.
- [9] 中华人民共和国卫生部. 化妆品卫生规范[S]. 北京:军事医学科学出版社,2007: 102 - 105.
- [10] 刘协,吕中明,施伟庆,等. BALB/c 和 ICR 小鼠用于局部淋巴结试验的研究[J]. *江苏预防医学*, 2009, 20(1): 4 - 6.
- [11] 王宗惠,刘怡娜,苏英,等. 一种改进的局部淋巴结试验-噻唑蓝法[J]. *毒理学杂志*, 2003, 17(4): 257 - 258.
- [12] 高珊,马玲,童英,等. 小鼠局部淋巴结分析试验替代豚鼠皮肤变态反应试验[J]. *毒理学杂志*, 2010, 24(4): 297 - 299.
- [13] 何国群,杨杏芬,郑穗生,等. 溴脱氧尿嘧啶核苷掺入法作为皮肤致敏试验替代方法研究[J]. *中国职业医学*, 2011, 38(5): 377 - 380.
- [14] Kirk M K, Broomhead Y, DiDonato L, *et al.* Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances [J]. *SOT Congresses 2007*, 2007: 1896 - 1904.
- [15] Sailstad D M. Murine local lymph node assay: An alternative test method for skin hypersensitivity testing [J]. *Lab animal*, 2002, 31(7): 36 - 41.
- [16] Jung K M, Jang W H, Lee Y K, *et al.* B cell increases and ex vivo IL-2 production as secondary endpoints for the detection of sensitizers in non-radioisotopic local lymph node assay using flow cytometry [J]. *Toxicology letters*, 2012, 209(3): 255 - 263.
- [17] Anderson S E, Umbright C, Sellamuthu R, *et al.* Irritancy and allergic responses induced by topical application of ortho-phthalaldehyde [J]. *Toxicological Sciences*, 2010, 115(2): 435 - 443.
- [18] Lv L, Yan G Y, Zhao Y L, *et al.* Investigation of the dermal sensitizing potential of traditional medical extracts in local lymph node assays [J]. *Experimental Biology and Medicine*, 2009, 234(3): 306 - 313.
- [19] 阳晓燕,赵康峰,孔建,等. 局部淋巴结改良法在化妆品皮肤刺激性和致敏性检测中的应用[J]. *环境与健康杂志*, 2013, 30(4): 312 - 316.
- [20] Ehling G, Hecht M, Heusener A, *et al.* An European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round [J]. *Toxicology*, 2005, 212(1): 60 - 68.
- [21] Hans-Werner V, Jürgen A H. The local lymph node assay being too sensitive? [J]. *Archives of toxicology*, 2005, 79(12): 721 - 728.
- [22] Homey B, von Schilling C, Blümel J, *et al.* An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions [J]. *Toxicology and applied pharmacology*, 1998, 153(1): 83 - 94.

[修回日期] 2014-08-25