

苹果多糖预防小鼠结肠炎癌变的作用及其机制研究

张典^{1a,2}, 王粉侠³, 弥曼^{1b}, 孙阳², 李宇华², 樊磊², 刘莉², 梅其炳^{2*} (1. 西安医学院, a. 病原生物学与免疫学教研室, b. 药理学教研室, 西安 710021; 2. 第四军医大学药理学教研室, 西安 710032; 3. 陕西省友谊医院药剂科, 西安 710068)

摘要:**目的** 研究苹果多糖对小鼠结肠炎癌变的预防作用,并探讨其作用机制。**方法** 从苹果渣中提取苹果多糖,使用致炎剂葡聚糖硫酸钠(DSS)和致癌剂氧化偶氮甲烷(AOM),建立小鼠结肠炎相关结直肠癌动物模型。通过免疫组织化学、蛋白质印迹法、酶联免疫分析等方法观察苹果多糖预防用药对各组小鼠血清中促炎细胞因子肿瘤坏死因子(TNF)- α 以及组织TLR4/MyD88/NF- κ B p65通路的影响。**结果** 苹果多糖预防用药20周后,与模型组(95%致癌率)相比,苹果多糖(1.25%、2.5%和5%)将结直肠肿瘤的发生率降至26%、10%、5%。蛋白质印迹法结果显示,苹果多糖各个剂量组均降低结直肠组织中TLR4、MyD88和NF- κ B p65蛋白表达。酶联免疫分析结果显示,苹果多糖各剂量组小鼠血清中肿瘤坏死因子- α 水平明显降低($P<0.05$)。**结论** 苹果多糖可有效预防结肠炎癌变,其作用机制可能与其抑制TLR4/MyD88/NF- κ B通路有关。

关键词: 苹果多糖; 结肠炎相关结直肠癌; Toll样受体4; 核转录因子- κ B; 髓样分化蛋白88

doi:10.11669/cpj.2015.17.015

中图分类号: R392.11, R574.62, R735.3⁺5, R735.3⁺7

文献标志码: A

文章编号: 1001-2494(2015)17-1527-05

Effect and Mechanism of Apple Polysaccharides on Experimental Colitis Associated Colorectal Cancer in Mice

ZHANG Dian^{1a,2}, WANG Fen-xia³, MI Man^{1b}, SUN Yang², LI Yu-hua², FAN Lei², LIU Li¹, MEI Qi-bing^{2*} (1. a. Department of Pathogen Biology and Immunology; b. Department of Pharmacology, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China; 2. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; 3. Department of Pharmacy, Shaanxi Friendship Hospital, Xi'an 710068, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effects and mechanisms of apple polysaccharides (AP) on tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated colon cancer. **METHODS** AP was obtained from apple pomace and its protective efficacy was evaluated on carcinogenesis in a mouse model of colitis-associated colon cancer induced by azoxymethane (AOM) and dextran sodium sulfate (DSS). The effects of AP on TLR4/MyD88/NF- κ B pathway were measured using immunohistochemistry, ELISA and Western blot. The serum were collected and TNF- α was measured by ELISA kits. **RESULTS** After 20 weeks of continuous treatment, the incidence of colon cancer formation was 95% in the mice treated with AOM/DSS (model group), and these reduced to 26%, 10% and 5% in AP (1.25%, 2.5% and 5%) treatment group respectively. Western blot analysis demonstrated that TLR4 (membrane protein), MyD88, NF- κ B p65 (nuclear protein) expression decreased significantly at protein level; and the secretion of TNF- α decreased in control group ($P<0.05$). **CONCLUSION** AP could protect ICR mice from CACC effectively and the possible mechanism may be related to the inhibition of TLR4/MyD88/NF- κ B pathways.

KEY WORDS: apple polysaccharides; colitis-associated colorectal cancer; TLR4; NF- κ B; MyD88

流行病学资料显示,结直肠癌的发病率和死亡率均居高不下^[1]。在欧美发达国家本病的发病率高达136/10万。在亚洲,尤其在我国甚至呈现逐渐上升趋势。研究发现,结肠炎症的反复发作是结直肠癌的重要发病原因之一。结肠炎相关结直肠癌(colitis-associated colorectal cancer, CACC)发生的自然过程长达10~35年,这为结直肠癌的预防提供了极其有利的机会^[2]。世界卫生组织报告,饮食在结

直肠癌发生和发展中扮演重要角色,并提出以水果、蔬菜为主的饮食可显著降低结直肠癌发生率^[3,4]。其中,苹果的摄入量与结直肠癌发病风险呈负相关引起了大家的重视。本实验室曾经从苹果榨汁后,废弃的果渣中提取苹果多糖(apple polysaccharides, AP)用于预防结肠炎小鼠癌变,已获得明显疗效^[5]。为了深入研究AP预防结肠炎癌变的作用机制,我们应用动物模型进一步评价AP结肠炎癌变的预防

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81402063); 陕西省教育厅课题(15JK1636); 西安医学院校级课题(2015D0009)

作者简介: 张典,女,博士,副教授 研究方向: 肿瘤免疫学 * **通讯作者:** 梅其炳,男,博士,教授,博士生导师 研究方向: 肿瘤药理学

Tel: (029)84779212 E-mail: qbmei@fmma.edu.cn

作用,采用免疫组化、蛋白免疫印迹及酶联免疫吸附实验等病理学与分子生物学研究手段,研究 AP 预防结肠炎癌变的作用机制,着重探讨 AP 对 TLR4/MyD88/ κ B 通路的影响,以期为发掘疗效确切、无毒副作用、适合长期使用的结直肠癌化学预防药物提供实验依据以及候选药物。

1 材料

1.1 试剂

苹果渣(陕西三原);氧化偶氮甲烷(AOM,美国 Sigma 公司);右旋葡聚糖苷钠(DSS,美国 MP 公司);TLR4 鼠来源单克隆抗体(英国 Abcam 公司);NF- κ B p65、MyD88 兔来源多克隆抗体(美国 Epitomics 公司); β -actin 兔来源多克隆抗体(美国 Bioworld 公司);HistoneH2AX 鼠来源多克隆抗体(美国 SANTA CRUZ 公司);ELISA 试剂盒(上海西唐生物科技有限公司);细胞膜蛋白,核蛋白和浆蛋白提取试剂盒(美国 Pierce 公司)。

1.2 实验动物

雄性 5 周龄 ICR 小鼠 120 只(上海斯莱克实验动物中心)。饲养在第四军医大学药理教研室动物房内。5 只 1 笼,给予普通的颗粒饲料,自由饮水。饲养环境:湿度(50 ± 10)%,光照(交替进行 12 h 照明,12 h 黑暗),温度(23 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 。适应饲养 7 d 后,按照体重被随机分组。

2 方法

2.1 AP 的提取

依据本实验室建立的多糖提取方法进行 AP 提取^[6],流程如下:将苹果渣用体积分数 95% 乙醇提取 2 次除去脂溶性物质,残渣继续用 10 倍体积的水提取两次,合并水提液,减压浓缩至一定体积,加入乙醇至醇体积分数达 75% 以上,充分沉淀后得粗多糖。采用 Sevag 法去除多糖中的蛋白,方法如下:粗多糖-氯仿-正丁醇(25:5:1),充分搅拌 0.5 h,静止离心取上清液,重复 6 次,在紫外分光光度计 280 nm 处测定无明显紫外吸收。AP 水溶液用氨水调节 pH 至 8,加入 1/10 倍量 30% H_2O_2 除色素,45 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 1 h,取出放凉后,盐酸调 pH 值为 4,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下果胶酶水解 3 h,4 倍量体积无水乙醇搅拌沉淀多糖,再用截留相对分子质量 3 000 透析袋透析 72 h,取出透析袋内溶液,减压浓缩,冻干。每 500 g 苹果渣可得到 16 g AP。用硫酸苯酚法进行糖含量测定,AP 糖含量为 87%。进行 HPLC

分析测定,AP 的相对分子质量范围:3 000 ~ 10 000;所含单糖的组成为鼠李糖、葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸。

2.2 动物分组及结肠炎相关结直肠癌模型建立

根据文献和本课题组经验积累^[7-9],建立结肠炎相关结直肠癌模型。将 120 只 ICR 小鼠随机分 5 组,其中 20 只为正常对照组,40 只为模型组,60 只为 3 个不同剂量 AP 给药组。实验周期为 20 周。正常对照组小鼠于实验开始时腹腔注射生理盐水(0.1 mL/10 g),随后不再给予处理。其余模型组和 3 个 AP 给药组:以 AOM($0.1 \text{ mL} \cdot 10 \text{ g}^{-1}$),腹腔注射。1 周后,饮用 2% DSS 蒸馏水溶液 7 d,间隔两周后(第 5 周),再次饮用 2% DSS 蒸馏水溶液 7 d。第 6 周时,模型组不再给予任何处理。在 3 个 AP 给药组小鼠饮水中加入 AP,使其浓度分别为 1.25%、2.5% 和 5%,饮用 15 周,第 20 周时,每组处死小鼠 10 只。在冰浴中,截取其大肠(从肛门处到回盲部),用生理盐水冲洗后,测量其长度。然后,截取从肛门向上约 4 cm 处的结直肠组织,浸泡于 4% 中性甲醛溶液固定 24 h,组织石蜡包埋后切片,以备做免疫组化。剩余结直肠,用消毒的载玻片在冰浴中刮取黏膜,并立刻投于液氮里速冻,以备 Western blot 检测。

2.3 ELISA 检测小鼠血清细胞因子 TNF- α 水平

第 20 周处死小鼠,眼球取血,5 000 $\times g$ 离心 5 min,吸取血清。严格按照试剂盒说明书步骤采用 ABC-ELISA 双抗体夹心法检测各组小鼠血清 TNF- α 浓度。标准品 2 000、1 000、500、250、125、62.5、31.2、0 $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 为横坐标,A 值为纵坐标,在坐标纸上作图,画出标准曲线。根据样品 A 值,带入公式计算 TNF- α 含量。

2.4 Western blot 检测小鼠组织黏膜 TLR4、MyD88、NF- κ B p65 蛋白表达

黏膜组织膜蛋白、核蛋白和浆蛋白提取方法,严格按照美国 Pierce 公司生产的“Mem-PER Eukaryotic Membrane Protein Extraction Kit”和“NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit”试剂盒说明书上的实验流程操作。每组取 40 μg 蛋白经 12% SDS-聚丙烯酰胺胶凝胶电泳,80 V 恒压转膜,加入一抗:TLR4(1:500)、MyD88(1:300)、I- κ B α (1:500)、pI- κ B α (1:500)、p65(1:1 000)、Histone H2AX(1:500)、 β -actin(1:3 000)封闭过夜。根据一抗来源,加入山羊抗兔二抗(1:7 000)或山羊抗小鼠二抗(1:9 000),室温孵育,漂洗后,加化学发光液显色。

2.5 数据处理

所有数据应用 SPSS17.0 统计软件进行分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组均数间比较采用单因素方差分析(One-way-ANOVA),两组均数间比较采用 LSD 检验。 $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

3 结果

3.1 大体观察

第 20 周时,模型组小鼠死亡率 50% (20/40,原因多为腹水),脱肛率 80% (16/20),结肠肿瘤发生率为 95% (19/20)。几乎所有模型组小鼠,大肠中段和/或末端出现息肉肉状新生物。AP (5%、2.5%、1.25%) 给药组小鼠脱肛率分别为 5% (1/20)、10% (2/20) 和 26% (5/19),其结肠肿瘤发生率分别降至 5% (1/20)、10% (2/20) 与 26% (5/19)。除 1.25% 组 5 只小鼠,AP 给药组小鼠肠道多表现为不同程度的水肿等炎症状态 (图 1)。

3.2 AP 下调小鼠结肠黏膜 TLR4 表达

免疫组化结果显示,与正常对照组相比,模型组 (AOM/DSS) 小鼠结肠黏膜组织高表达 TLR4 蛋白;与模型组 (AOM/DSS) 小鼠相比,AP 给药组可剂量依赖性地降低 TLR4 蛋白表达 (图 2)。

3.3 AP 对小鼠结肠黏膜组织 TLR4、MyD88 蛋白表达的影响

Western blot 结果显示,与正常对照组相比,模型组 (AOM/DSS) 小鼠结肠黏膜组织 TLR4 和 MyD88 蛋白表达水平增加,且具有显著性差异 ($P < 0.05$);与模型组 (AOM/DSS) 相比,不同剂量 AP

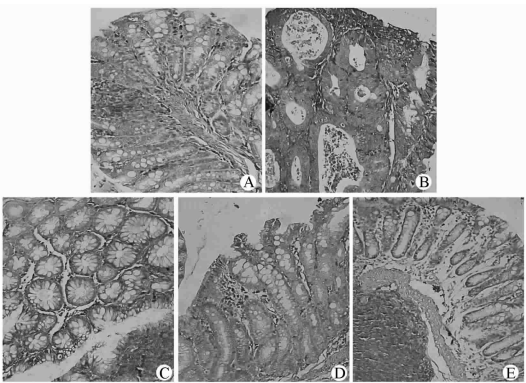


图 2 苹果多糖 (AP) 降低 AOM/DSS 诱导的小鼠肠道黏膜 TLR4 表达 ($\times 200$)

A - 正常对照; B - AOM/DSS 模型; C - AOM/DSS + 1.25% AP; D - AOM/DSS + 2.5% AP; E - AOM/DSS + 5% AP

Fig. 2 Downregulation of AOM/DSS-induced TLR4 expression in mice ($\times 200$)

A - control group; B - AOM/DSS alone group; C - AOM/DSS + 1.25% AP group; D - AOM/DSS + 2.5% AP group; E - AOM/DSS + 5% AP group

给药组均下调 TLR4 和 MyD88 蛋白的表达,且具有显著性差异 ($P < 0.05$) (图 3)。

3.4 AP 抑制小鼠结肠黏膜组织 I- κ B α 的磷酸化及 NF- κ B 活性

Western blot 结果显示,与正常对照组相比,模型组 (AOM/DSS) 小鼠结肠黏膜组织细胞核 NF- κ B p65 蛋白表达明显增高 ($P < 0.01$);细胞质 NF- κ B p65 蛋白表达明显降低 ($P < 0.01$) (图 4)。与模型组 (AOM/DSS) 小鼠相比,不同剂量 AP 给药组均下调细胞核 NF- κ B p65 蛋白和细胞质 pI- κ B α 水平 ($P < 0.01$),上调细胞质 NF- κ B p65 和 I- κ B α 蛋白水平 ($P < 0.01$)。

3.5 AP 抑制小鼠血清中 TNF- α 水平

ELISA 实验结果显示,模型组 (AOM/DSS) 小鼠血清中 TNF- α 的浓度可达到 $(302.4 \pm 23.5) \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (图 5)。不同剂量 AP 给药组下调 TNF- α 分泌水平 ($P < 0.01$),且呈剂量依赖性。

4 讨论

肠道的慢性炎症是结直肠癌发生的主要原因之一。流行病学调查表明,40% 左右的 UC 患者将发展成为结直肠癌^[10]。炎性刺激与肠黏膜上皮细胞相应模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRRs) 相互作用,促使肠上皮细胞产生免疫应答,通过 Toll 样受体信号通路和/或细胞因子受体活化黏膜免疫,诱导 NF- κ B 通路活化,导致促炎细胞因子和其他炎性介质释放^[11]。这种急性炎症是机体对

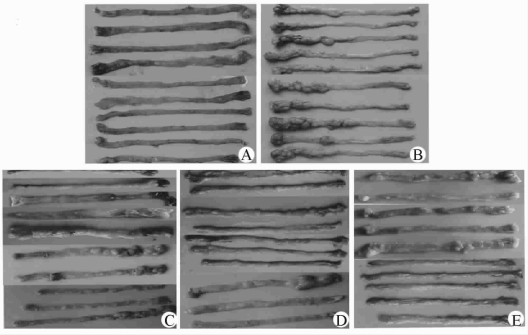


图 1 第 20 周小鼠肠道病理照片

A - 空白对照; B - OM/DSS 模型; C - OM/DSS + 1.25% AP; D - OM/DSS + 2.5% AP; E - AOM/DSS + 5% AP

Fig. 1 Pathological evaluation of photograph in the control mice and mice treated with AOM/DSS \pm AP in the 20th week

A - control group; B - AOM/DSS alone group; C - AOM/DSS + 1.25% AP group; D - AOM/DSS + 2.5% AP group; E - AOM/DSS + 5% AP group

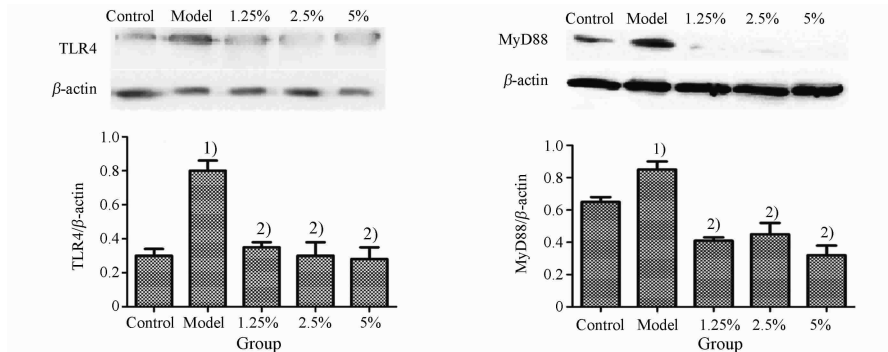


图3 AP对小鼠结肠黏膜TLR4和MyD88蛋白表达的影响。 $n = 3, \bar{x} \pm s$

与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较, ²⁾ $P < 0.05$

Fig. 3 Effect of AP on the expression of TLR4 and MyD88 protein in mice. $n = 3, \bar{x} \pm s$

¹⁾ $P < 0.05$, vs control group; ²⁾ $P < 0.05$, vs AOM/DSS model

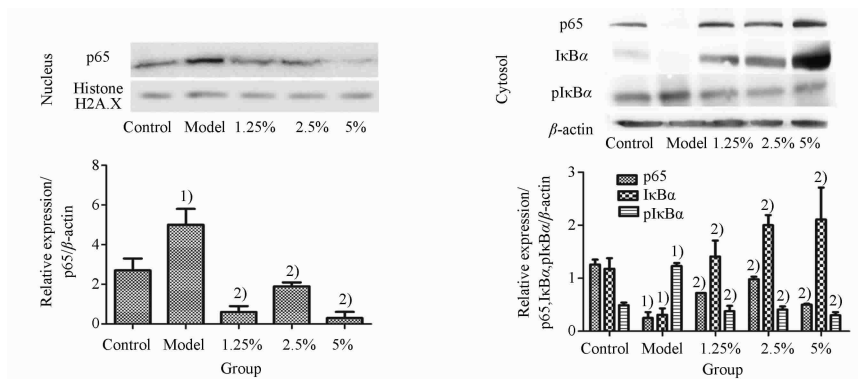


图4 AP对小鼠肠IκBα, p-IκBα, NF-κB p65蛋白的影响。 $n = 3, \bar{x} \pm s$

与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P < 0.01$

Fig. 4 Effects of AP on IκBα, p-IκBα and NF-κB p65 in mice treated with AOM/DSS. $n = 3, \bar{x} \pm s$

¹⁾ $P < 0.01$, vs control group; ²⁾ $P < 0.01$, vs AOM/DSS model

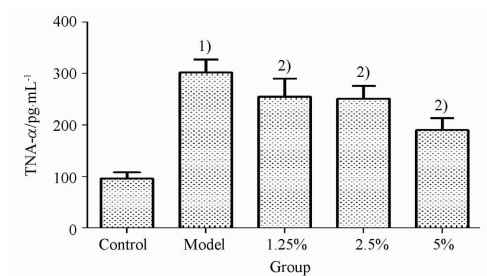


图5 ELISA检测AP对小鼠血清TNF-α水平的影响。 $n = 3, \bar{x} \pm s$

与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P < 0.01$

Fig. 5 Effects of AP on TNF-α production in mice serum. $n = 3, \bar{x} \pm s$

¹⁾ $P < 0.01$, vs control group; ²⁾ $P < 0.01$, vs AOM/DSS model

各种病原微生物等损伤因子刺激所发生的免疫防御反应,它有利于清除病原微生物,修复组织结构与组织功能恢复。然而,持续的慢性炎症状态,会造成不断的组织损伤和修复过程,可导致肿瘤的发生。

TLR4是Toll样受体家族的成员之一,是第一个被鉴定的人类Toll样受体。TLR4属于I型跨膜受体,胞外区由富含亮氨酸的重复序列组成。胞内区与IL-1受体胞内区相似,称为TIR(Toll/IL-1 receptor)区。它能够识别微生物表面或内部的一些保守结构即PAMAs,如革兰阴性菌的LPS、热休克蛋白等。TLR4在炎症癌变过程中发挥重要作用^[12]。文献[13]报道,结直肠癌患者,大肠黏膜过高表达TLR4。TLR4基因敲除小鼠,结肠癌的发生率明显下降。

TLR4活化后,触发下游两条信号通路的活化:MyD88-依赖途径和MyD88-非依赖(TRIF依赖)途径。其中,MyD88-依赖途径在AOM诱导的CACC发展中发挥重要作用^[12]。因此,我们重点研究了AP对TLR4/MyD88/NF-κB通路的影响。MyD88是TLR4信号向下游传导的核心环节和关键分子。MyD88由一个氨基端死亡域和一个羧基端TIR域

组成。MyD88 的羧基端与 TLR4 的胞内区(TIR 区)结合。同时 MyD88 通过氨基端的死亡域与白介素 1 受体相关激酶(IL-1 receptor associated kinase, IRAK)氨基端死亡域结合,导致 IRAK 自身磷酸化,与下游接头分子肿瘤坏死因子受体相关因子-6(TNF receptor associated factor 6, TRAF-6)结合,激活 NF- κ B 激酶抑制物(inhibitor of NF- κ B kinases, IKKs),导致 I κ B 磷酸化而降解。而在静息状态时,细胞质内 I- κ B α 与 NF- κ B p65、NF- κ B p50 结合,形成异源三聚体,I- κ B α 抑制 NF- κ B 从细胞质进入细胞核内。当 TLR4 活化,触发下游 MyD88 依赖途径,引发下游 I κ B 磷酸化而降解,使得 p65 与 p50 获得自由,并转位至核内(NF- κ B 活化),诱导多种基因转录,包括促炎细胞因子 TNF- α 、环氧化酶(COX)-2、iNOS 等产生。这些分子在 CACC 发生和发展过程中发挥重要作用^[14-15]。

我们研究发现,与正常对照组小鼠相比,模型组(AOM/DSS)小鼠结直肠黏膜组织 TLR4、MyD88 蛋白高表达,血清 TNF- α 分泌显著增高;而 AP 给药组小鼠,上述指标均明显降低。模型组(AOM/DSS)小鼠结直肠黏膜组织细胞质 I- κ B α 蛋白表达减少,I- κ B α 磷酸化(pI- κ B α)水平升高,细胞核 NF- κ B p65 蛋白表达增多。说明致炎剂与致癌剂联用诱导的结直肠癌的发生与肠道黏膜组织 NF- κ B 的活化有关。与模型组(AOM/DSS)相比,AP 给药组小鼠,细胞核内的 NF- κ B p65 蛋白表达明显减少,细胞质 I- κ B α 蛋白表达增多,I- κ B α 的磷酸化(pI- κ B α)水平降低,且呈剂量依赖性。

综上所述,AP 可能通过下调炎症黏膜 TLR4 的表达,抑制下游 MyD88/NF- κ B 信号通路活化,发挥抑制肠黏膜 NF- κ B 活化的作用,从而降低促炎细胞因子 TNF- α 等释放,预防 CACC 的发生。我们推测,AP 可能将成为结肠炎癌变的预防药物。

REFERENCES

[1] MISALE S, YAEGER R, HOBOR S, *et al.* Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in color-

ectal cancer[J]. *Nature*, 2012, 486(7404):532-536.

[2] AVIELLO G, CORR S C, JOHNSTON D G, *et al.* MyD88 Adaptor-like (Mal) regulates intestinal homeostasis and colitis-associated colorectal cancer in mice[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2014, 306(9):769-778.

[3] JAGANATHAN S K, VELLAYAPPAN M V, NARASIMHAN G, *et al.* Role of pomegranate and citrus fruit juices in colon cancer prevention [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(16):4618-4625.

[4] GROSSO G, BIONDI A, GALVANO F, *et al.* Factors associated with colorectal cancer in the context of the mediterranean diet: A case-control study [J]. *Nutr Cancer*, 2014, 66(4):558-565.

[5] LI Y, LIU L, NIU Y, *et al.* Modified apple polysaccharide prevents against tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated colon cancer;Role of galectin-3 and apoptosis in cancer prevention[J]. *Eur J Nutr*, 2012,51(1):107-117.

[6] LI Y, NIU Y, MEI Q, *et al.* Modified apple polysaccharides could induce apoptosis in colorectal cancer cells [J]. *J Food Sci*, 2010, 75(8):224-229.

[7] TANAKA T, KOHNO H, SUZUKI R, *et al.* A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate [J]. *Cancer Sci*, 2003, 94(11):965-973.

[8] FUKATA M, CHEN A, KLEPPER A, *et al.* Cox-2 is regulated by Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling; Role in proliferation and apoptosis in the intestine[J]. *Gastroenterology*, 2006, 131(3):862-877.

[9] LI Y, LIU L, NIU Y, *et al.* Modified apple polysaccharide prevents against tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated colon cancer;Role of galectin-3 and apoptosis in cancer prevention[J]. *Eur J Nutr*, 2012, 51(1):107-117.

[10] NIELSEN O H, JESS T, BJERRUM J T, *et al.* Ulcerative colitis [J]. *Ugeskr Laeger*, 2013, 175(20):1412-1416.

[11] VIENNOIS E, CHEN F, MERLIN D. NF- κ B Pathway in colitis-associated cancers[J]. *Transl Gastrointest Cancer*, 2013, 2(1):21-29.

[12] SZUMILAS D, KRYSIAK R, OKOPIEŃ B. The role of TLR4 receptor in development of inflammation and carcinogenesis in ulcerative colitis and pharmacotherapy of this disorder [J]. *Wiad Lek*, 2013, 66(1):3-9.

[13] SLATTERY M L, HERRICK J S, BONDURANT K L, *et al.* Toll-like receptor genes and their association with colon and rectal cancer development and prognosis [J]. *Int J Cancer*, 2012, 130(12):2974-2980.

[14] CAO H, XU Z, LONG H, *et al.* The-765C allele of the cyclooxygenase-2 gene as a potential risk factor of colorectal cancer: A meta-analysis[J]. *Tohoku J Exp Med*, 2010, 222(1):15-21.

[15] UMESALMA S, SUDHANDIRAN G. Differential inhibitory effects of the polyphenol ellagic acid on inflammatory mediators NF-kappaB, iNOS, COX-2, TNF-alpha, and IL-6 in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2010, 107(2):650-655.

(收稿日期:2014-12-18)