

性早熟痰湿壅滞证大鼠模型评价方法的探索

赵霄, 叶进*

(南京中医药大学附属医院, 南京 210009)

【摘要】 目的 探索性早熟痰湿壅滞证大鼠模型的系统评价方法。**方法** 通过观察性早熟痰湿壅滞组、性早熟非痰湿壅滞组、空白对照组及亲代模型组、亲代对照组雌性SD大鼠的证候表现,结合旷场实验数据,探究该病证结合动物模型的系统评价方法。**结果** 亲代模型组雌鼠较亲代对照组体重增长量未见明显差异($P > 0.05$),4周龄雌性仔鼠中,性早熟痰湿壅滞组雌鼠较空白组体重明显减轻($P < 0.05$),较性早熟非痰湿壅滞组体重减轻($P < 0.05$)。亲代模型组雌性SD大鼠在总运动距离、运动速度上较亲代对照组明显减少($P < 0.05$),在静止次数与静止时间上明显高于亲代对照组($P < 0.05$),而三组仔鼠在运动距离、运动速度、静止次数和静止时间上未见显著性差异($P > 0.05$)。**结论** 高脂饮食未增加雌性SD大鼠体重,体重指标可能并非痰湿壅滞证候动物模型系统评价关键指标;痰湿壅滞证候大鼠模型行为学改变与该证候临床表现具有相似性,可进一步运用旷场实验研究痰湿壅滞证动物模型评价的方法,未发现雌性仔鼠各组间行为学方面的差异性,性早熟痰湿壅滞证在行为学方面有待继续研究。

【关键词】 性早熟;痰湿壅滞证;动物模型评价方法;体重;旷场实验

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2018) 06-0773-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2018.06.016

Research on method for evaluating precocious puberty rat model with phlegm-dampness syndrome

ZHAO Xiao, YE Jin*

(Affiliated Hospital, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210009, China)

Corresponding author: YE Jin. E-mail: dryejin@163.com

【Abstract】 Objective To investigate a method for systematically evaluating a precocious puberty rat model with phlegm-dampness syndrome. **Methods** To observe the symptoms of female SD rats in five groups, a precocious puberty with phlegm-dampness group, a precocious puberty without phlegm-dampness group, a blank control group, a parental model group, and a parental control group, and to conduct an open-field test to explore method for systematically evaluating animal model with the disease. **Results** There was no significant difference in body weight gain between the parental model group and the control group ($P > 0.05$). Body weight in the 4-week-old female offsprings of the precocious puberty with phlegm-dampness group was significantly lower than that in the blank control group ($P < 0.05$). The weight of the precocious puberty with phlegm-dampness group was also decreased than the precocious puberty without phlegm-dampness group ($P < 0.05$). Compared with the parental control group, the female SD rats in the parental model group had a distinctly smaller total distance and speed of motion ($P < 0.05$). The motionless frequency and motionless time were clearly higher in the parental model group than in the parental control group ($P < 0.05$), but there was no significant difference ($P > 0.05$) in the groups of young rats. **Conclusions** A high-fat diet failed to increase body weight in female SD rats; therefore, body weight index may not be a key indicator for systematic evaluation of animal models of phlegm-dampness syndrome. The change of ethology in the rat model of phlegm-dampness syndrome is similar to the clinical manifestation of this syndrome. The open-field test can be used to further evaluate the animal model of phlegm-dampness syndrome. Difference in behavior was not found among female offsprings. The precocious puberty with phlegm-dampness syndrome remains to be further investigated.

【作者简介】 赵霄(1993—),女,南京中医药大学中医儿科学在读硕士研究生,研究方向:小儿内分泌疾病。

【通信作者】 叶进(1963—),女,南京中医药大学附属医院主任中医师,博士学位,研究方向:小儿内分泌疾病。Email: dryejin@163.com

【Keywords】 precocious puberty; phlegm-dampness syndrome; animal model evaluation method; body weight; open field test

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

随着儿童青春期发育提前启动、第二性征提早出现的情况逐年增加,性早熟这一疾病引起了广泛的社会关注。性早熟是指女童在 8 岁前,男童在 9 岁前呈现第二性征的发育异常性疾病。根据发病机制及临床表现可分为中枢性(促性腺激素释放激素依赖性,真性)性早熟(central precocious puberty, CPP)和外周性(非促性腺激素释放激素依赖性,假性)性早熟。其中以中枢性性早熟(CPP)最为常见^[1]。临床研究表明,女童的发病率明显高于男童^[2],且女童中的肥胖者多存在第二性征提前发育的情况^[3]。《张聿青医案》中提到:“形体丰者多痰湿”,朱丹溪在《丹溪心法》中也多次提到“肥人多痰湿”。痰湿壅滞证是由于水谷精微运化失司,导致体内痰湿凝聚、停滞,以黏滞重浊为主要特征的证候。女童性早熟(真性)痰湿壅滞证临床多表现为提前乳房发育,阴道分泌物增多,阴唇发育,色素沉着,月经来潮,伴形体偏肥胖,胸闷叹息,肢体困重,口中黏腻,多食肥甘,舌质红、苔腻,脉滑数,患儿同时伴有线性加速生长^[4]。这些表现会给患儿个人、家庭及社会带来诸多不良影响。因此,深入研究性早熟(真性)痰湿壅滞证具有重要意义,关系到儿童身心健康、家庭幸福、社会和谐及医疗水平提高。

目前,国内外对于 CPP 动物模型的建立主要有 3 种,包括达那唑^[5]和 N-甲基-DL-天冬氨酸(NMA)^[6]诱导的雌性 SD 大鼠,以及瘦素(leptin)诱导 BALB/c 雌性小鼠 CPP 模型^[7]。这 3 种模型对人们认识及研究该疾病起到至关重要的作用。在国内大量实验研究中,多采用高脂饮食的方法构建痰湿壅滞证大鼠模型^[8-10]。通过观察模型大鼠的体重、形态、皮毛、活动度等表现检验造模成功与否。本实验选择了较为常用的达那唑诱导 5 日龄雌性 SD 大鼠建立的 CPP 模型,并运用高脂饮食构建痰湿壅滞证模型的方法,进一步建立了性早熟痰湿壅滞证雌性 SD 大鼠模型,将青春期发育及痰湿壅滞证候的相关指标、行为学特征与正常组比较,为完善性早熟痰湿壅滞证雌性 SD 大鼠模型评价方法提供实验及数据支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

6 周龄 SPF 级 SD 大鼠,雌性,270~300 g,购自浙江省实验动物中心【SCXK(浙)2014-0001】,高

脂饲料与普通饲料均由南京市江宁区青龙山动物繁殖场提供,高脂饲料由 20% 猪油、4% 白糖、2% 奶粉、1% 胆固醇、73% 普通饲料组成,每 100 g 高脂饲料提供 453kcal 热量^[8],大鼠均可自由饮水。所有动物均饲养于南京中医药大学 SPF 级实验动物中心【SYXK(苏)2012-0042】,温度、适度分别控制在 20~24℃、45%~55%。实验伦理审批号为[201810A022]。

1.1.2 试剂及仪器

达那唑胶囊(20161202)江苏联环药业股份有限公司,无水乙醇分析纯(10009257)国药集团化学试剂有限公司,乙二醇分析纯(20161201)江苏强生功能化学股份有限公司。旷场实验设备购自北京硕林苑科技有限公司,设备包括黑色旷场实验箱(100 cm×100 cm×30 cm),小动物行为活动记录分析图像采集电脑控制系统(SLY-ETS Version 1.66)。

1.2 方法

1.2.1 动物建模

适应性喂养 SPF 级 6 周龄雌性 SD 大鼠与雄性 SD 大鼠 1 周后,将其随机分为两组:分别为亲代模型组(雌鼠 $n=12$,雄鼠 $n=6$)和亲代对照组(雌鼠 $n=6$,雄鼠 $n=6$)。亲代模型组以高脂饲料饲喂 8 周造模,亲代对照组以普通大鼠饲料饲喂,8 周后筛选体质量大于亲代对照组 20% 的模型组亲代大鼠体进行交配。繁殖的雌性仔鼠设定为模型组仔鼠,即性早熟痰湿壅滞组($n=11$),亲代对照组大鼠繁殖的雌性仔鼠作为对照组仔鼠,分成两组(性早熟非痰湿壅滞组 $n=15$,空白对照组 $n=14$)。性早熟痰湿壅滞组和性早熟非痰湿壅滞组仔鼠在出生后 5 日龄一次性给予皮下注射达那唑 300 μg ;模型组仔鼠造模方法与模型组亲代大鼠相同,均为同配方高脂饲料饲喂,对照组仔鼠则用普通饲料饲喂。

1.2.2 旷场实验

旷场实验箱为黑色,运用小动物行为活动记录分析系统在实验箱底部划出 1 个 100 cm×100 cm 的方格。实验于白天 9:00~17:00 进行,将大鼠轻柔地置于实验箱中央区域,电脑软件统计大鼠的运动距离、运动速度、静止时间、静止次数等数据,摄像头跟踪描绘动物运动轨迹。亲代大鼠于喂养 8 周

后进行旷场实验,繁殖的雌性仔鼠在 4 周龄进行旷场实验,每次实验 5 min。每只动物试验结束后,清除动物粪便,消毒液清洗实验箱底部及内壁,然后用 75% 乙醇擦拭,风扇吹干后放入下一只动物。

1.3 统计学方法

采用 SPSS20 统计软件对数据进行统计学分析,计量资料采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,符合正态分布的数据,采用两组间 *t* 检验,不符合正态分布的数据,采用两组间秩和检验,组间比较采用单因素方差分析,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

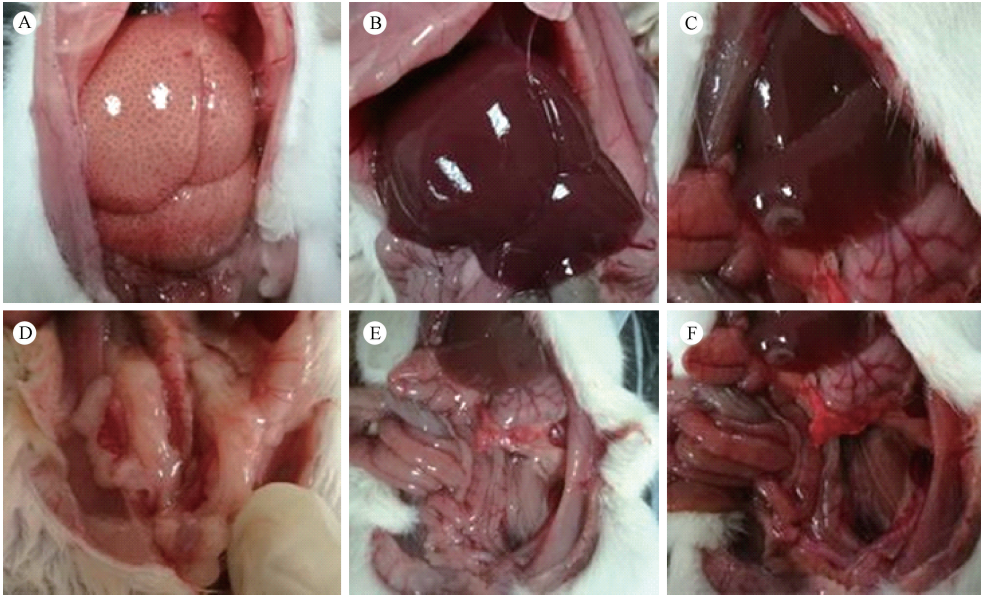
2.1 各组大鼠一般表现

亲代雌性大鼠在不同饲料分别喂养 8 周后,亲代模型组雌鼠较亲代对照组呈现出活动度下降,排泄物黏腻臭秽,毛发色泽暗淡无光、无稀疏。4 周龄雌性仔鼠中,性早熟痰湿壅滞组雌鼠较对照组呈现活动度下降,排泄物量多、黏腻、臭秽,毛发稀疏、色暗无光;性早熟非痰湿壅滞组与空白对照组在活动度、排泄物、毛发色泽等方面无明显差异。雌性仔鼠分别于建立第一个发情期后动情前期处死,肉眼

可见:性早熟痰湿壅滞组肝轻微肿大,包膜紧张,切面略膨隆,质地较软,色泽淡黄,有油腻感,性早熟非痰湿壅滞组及空白对照组肝呈紫红色,边缘薄锐,表面湿润光滑;性早熟痰湿壅滞组腹部脂肪组织丰富,质软,有油腻感,成乳白色,性早熟非痰湿壅滞组及空白对照组脂肪含量未见明显异常(图 1)。通过肉眼观察大鼠活动度、毛发色泽与疏密程度、排泄物性状,以及肝的、脂肪组织等,可初步检查痰湿壅滞模型造模成功与否。

2.2 各组大鼠体重比较

亲代模型组雌鼠较亲代对照组体重未见显著性差异 (302.81 ± 16.39) VS (303.72 ± 13.25) g (*P* > 0.05);亲代模型组雌鼠较亲代对照组喂养 8 周后与 8 周前体重增长量未见明显差异 (84.10 ± 15.07) VS (94.30 ± 11.26) g (*P* > 0.05),差异无显著性。4 周龄雌性仔鼠中,性早熟痰湿壅滞组雌鼠较空白对照组体重有较明显差异 (57.38 ± 8.71) VS (74.58 ± 8.53) g (*P* < 0.05),且性早熟痰湿壅盛组与性早熟非痰湿壅滞组体重之比为 (57.38 ± 8.71) VS (68.53 ± 6.57) g (*P* < 0.05),差异具有显著性;性早熟非痰湿壅滞组与空白对



注:A. 性早熟痰湿壅滞组肝;B. 空白对照组肝;C. 性早熟非痰湿壅滞组肝;D. 性早熟痰湿壅滞组腹部脂肪;E. 空白对照组腹部脂肪;F. 性早熟非痰湿壅滞组腹部脂肪。

图 1 仔鼠各组肝及脂肪组织肉眼观察图

Note. A. Liver of the precocious puberty with phlegm-dampness group. B. Liver of the blank control group. C. Liver of the precocious puberty without phlegm-dampness group. D. Adipose tissue of the precocious puberty with phlegm-dampness group. E. Adipose tissue of the blank control group. F. Adipose tissue of the precocious puberty without phlegm-dampness group.

Figure 1 Visual observation of liver and adipose tissue in the young rat groups

照组体重无明显差异(68.53 ± 6.57) VS (74.58 ± 8.53) g ($P > 0.05$)。通过比较 5 组大鼠体重的差异度,观察高脂饮食对大鼠体重的影响(图 2)。

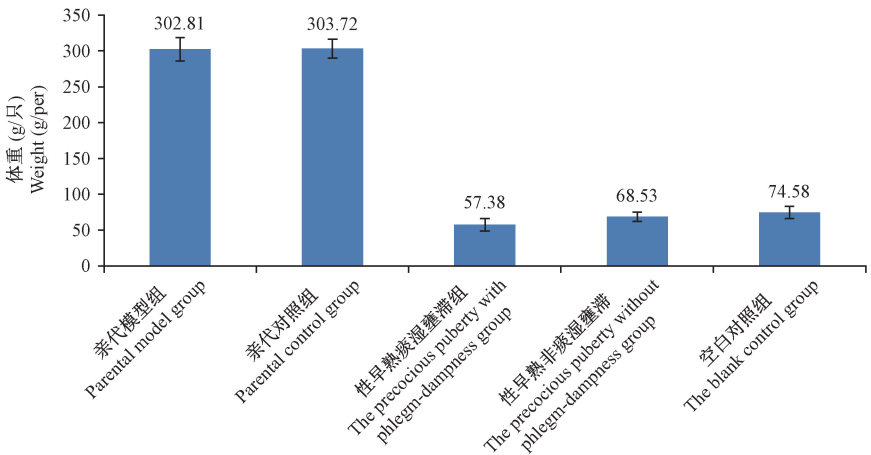


图 2 各组大鼠体重柱状图

Figure 2 The weight histogram of each group

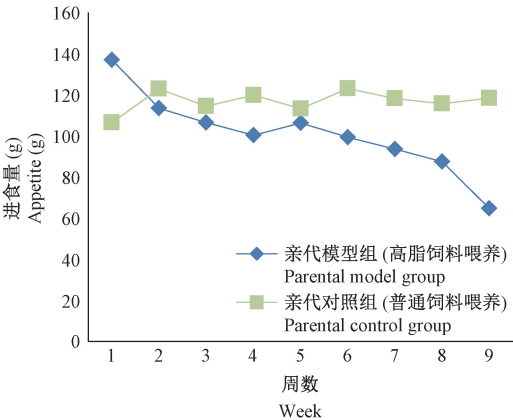


图 3 每六只亲代雌性 SD 大鼠每日进食量检测图
Figure 3 Daily food intake of every group of six parental rats

2.3 旷场实验数据

结果显示,亲代模型组雌性 SD 大鼠在总运动距离、运动速度上较亲代对照组明显减少($P < 0.05$),在静止次数与静止时间上明显高于亲代对照组($P < 0.05$)。然而,性早熟痰湿壅滞组、性早熟非痰湿壅滞组及空白对照组在运动距离、运动速度、静止次数和静止时间上并未发现显著性差异($P > 0.05$)。对比 5 组大鼠旷场实验中的相关数据,能够对大鼠活动情况有更清楚的认识,进一步探索痰湿壅滞证性早熟模型大鼠的行为学指标(表 1)(图 4)。

同时,亲代雌性大鼠给予的饲料不同,食入量上也有较明显差距。通过计算大鼠进食量,为体重变化提供了相关依据(图 3)。

2.4 雌性仔鼠青春期发育判定指标

各组雌性仔鼠阴门开启时间与建立第一个发情期后动情前期时间比较:性早熟痰湿壅滞组阴门开启时间与性早熟非痰湿壅滞组无明显差异($P > 0.05$),但较空白对照组阴门开启时间有明显的提前($P < 0.001$),性早熟非痰湿壅滞组阴门开启时间较空白对照组也出现了提前($P < 0.001$);性早熟痰湿壅滞组第一个发情期后动情前期时间与性早熟非痰湿壅滞组无明显差异($P > 0.05$),但较空白对照组有明显的提前($P < 0.001$),同样,性早熟非痰湿壅滞组第一个发情期后动情前期时间较空白对照组出现了提前($P < 0.001$)。比较雌性仔鼠青春期发育的判定指标,可验证性早熟模型的造模成功(表 2)。

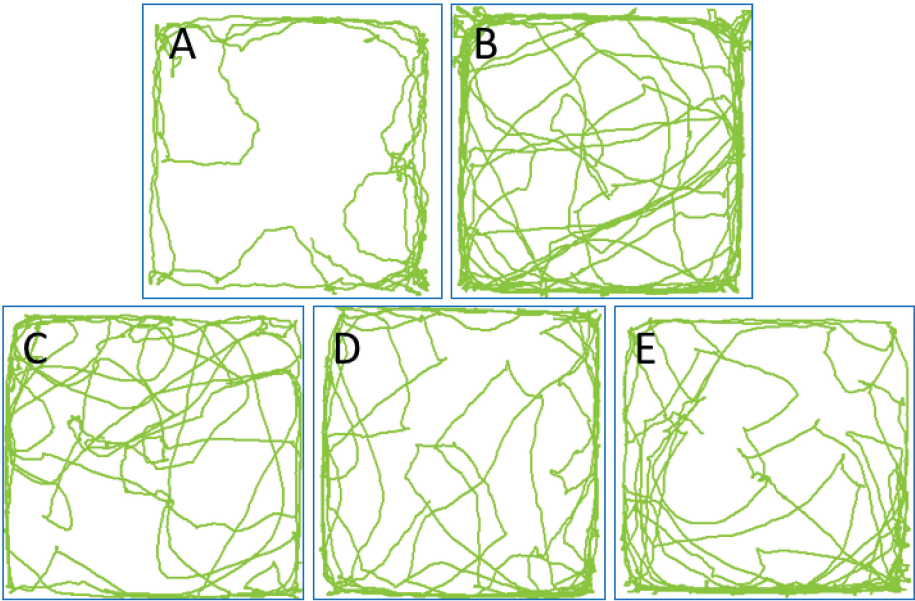
3 讨论

系统评价中医病证结合动物模型对于此类动物模型的成功构建具有十分重要的意义。理想的中医病证结合动物模型评价标准应与中医临床病症诊断标准保持一致性,包括四诊情况、症状体征等,但建立完善的中医病症结合动物模型的系统评价存在着巨大困难。目前大多数的病证结合动物模型的评价来源于临床诊断标准,但仍有部分临床病症诊断标准无法在实验动物模型中体现出来,例如舌象、脉象、咯痰、少动懒言等,此类研究还需要与实验动物学、动物行为学等诸多学科共同研究探讨。

表 1 旷场实验数据($\bar{x} \pm s$)
Table 1 The open-field test data ($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	运动距离(m) Distance(m)	运动速度(cm/s) Speed(cm/s)	静止次数(次) Motionless frequency	静止时间(s) Motionless time(s)
亲代模型组 Parental model group	28.79 ± 4.86 *	9.66 ± 1.67 *	12.75 ± 4.30 *	61.25 ± 24.33 *
亲代对照组 Parental control group	38.68 ± 7.98	13.01 ± 2.72	5.17 ± 3.87	23.25 ± 18.07
性早熟痰湿壅滞组 Precocious puberty with phlegm-dampness group	25.92 ± 8.25	9.07 ± 4.51	15.67 ± 2.42	122.93 ± 33.57
性早熟非痰湿壅滞组 Precocious puberty without phlegm-dampness group	22.70 ± 3.54	7.10 ± 1.96	15.33 ± 3.33	122.40 ± 35.75
空白对照组 Blank control group	25.73 ± 7.61	7.35 ± 3.12	14.17 ± 4.36	121.68 ± 36.19

注:与亲代对照组相比, * $P < 0.05$ 。总时长为 300 s。
Note. Compared with the parental control group, * $P < 0.05$.



注:A. 亲代模型组;B. 亲代对照组;C. 性早熟痰湿壅滞组;D. 性早熟非痰湿壅滞组;E. 空白对照组。

图 4 各组旷场实验运动轨迹图

Note. A. Parental model group. B. Parental control group. C. Precocious puberty with phlegm-dampness group. D. Precocious puberty without phlegm-dampness group. E. The blank control group.

Figure 4 Typical motion trajectory of the rats in the open-field test

表 2 三组雌性仔鼠阴门开启时间、第一个发情期后动情前期时间的比较($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Vaginal opening time and the first preoestrus' time($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	只数(只) Number(n)	阴门开启时间(天) Vaginal opening(Day)	第一个发情期后动情前期时间(天) Preoestrus(Day)
性早熟痰湿壅滞组 Precocious puberty with phlegm-dampness group	11	35.18 ± 4.00 **	39.55 ± 4.08 **
性早熟非痰湿壅滞组 Precocious puberty without phlegm-dampness group	15	34.53 ± 1.41 **	38.67 ± 1.29 **
空白对照组 Blank control group	14	42.44 ± 2.07	46.33 ± 2.45

注:与空白对照组比较, ** $P < 0.001$ 。
Note. Compared with the blank control group, * $P < 0.05$.

通过本次实验,作者发现亲代模型组和亲代对照大鼠模型的旷场实验数据结果有重要意义。高脂饲料喂养 8 周较普通饲料喂养的雌性 SD 大鼠运动距离与运动时间明显缩短、静止次数增多、静止时间增长,这与临床上痰湿壅滞证候中肢体困重、少动有一定相似性,可见痰湿壅滞证候大鼠模

型在行为学中的改变与该证候临床表现具有一致性,可进一步研究旷场实验作为痰湿壅滞证动物模型评价的方法之一的可行性。然而,雌性仔鼠各组间未发现行为学方面的显著性差异,考虑仔鼠进行旷场实验时尚未成熟,因此该实验结果不能作为最终结论,性早熟痰湿壅滞组与性早熟非痰湿壅滞组、空白对照组仍存在行为学方面差异的可能性,有待于进一步研究。

亲代与子代雌性大鼠模型组与对照组体重对比显示,高脂饲料喂养 8 周后的雌性 SD 大鼠与普通饲料喂养 8 周后的雌性 SD 大鼠在体重及体重增长量上无显著差异。由于高脂饲料中含有猪油、白糖、奶粉、胆固醇等高热量成分,长期食入且作为唯一食物,使得进食量逐渐减少,且较亲代对照组明显减少(见图 3)。同时,本次实验中高脂饲料喂养下的 SD 孕鼠难产率为 23.08%,较普通饲料喂养下的 SD 孕鼠高。高脂饲料喂养下的 SD 孕鼠与较普通饲料喂养下的 SD 孕鼠所繁殖的雌性仔鼠在体重上明显减轻。可见母鼠高脂饮食未能在增加雌性仔鼠体重中起决定性作用。因此,在性早熟痰湿壅滞证动物模型的系统评价中,体重是重要的但并非关键性的评价方法。

判断雌性大鼠青春期启动的决定因素是阴道开启时间和第一次排卵的发生,第一次排卵发生的间接指征是第一个发情期后动情前期的出现^[11]。本实验中,性早熟痰湿壅滞组和性早熟非痰湿壅滞组的青春期启动时间均较空白对照组提前($P < 0.001$)(表 2)。可见,达那唑诱导的雌性 SD 大鼠建立 CPP 模型的方法具有较好的可行性。

在本次实验中,作者仅采用了一种高脂饲料构建痰湿壅滞证 SD 大鼠模型,未能进行多种不同成分、含量的高脂饲料喂养的比较,因此结果存在单一性;此外,本实验进行旷场实验的时间为 4 周龄,而仔鼠断奶时间为 21 日龄,未能进行较长时间的高脂饮食可能是导致行为学特征无显著差异的重要原因,并且未能进行多次旷场实验,对实验的完整性、全面性、重复性方面有所欠缺。在接下来的试验研究中,将会不断改进、完善,以提高实验数据的可靠性及准确性。本实验的创新点之一在于运用了行为学方法研究痰湿壅滞证雌性 SD 大鼠模型评价方法,将旷场实验运用于痰湿壅滞证候动物模型的系统评价,为旷场实验与痰湿壅滞证动物模型评价之间建立了连接纽带,给痰湿壅滞证动物模型的系统评价提供了新的方法。第二,通过此次实验,发现高脂饮食未能使雌性 SD 大鼠体重增加,体重指标存在不能作为痰湿壅滞证候动物模型系统评

价关键指标的可能性。

参 考 文 献(References)

- [1] 杜敏敏. 中枢性(真性)性早熟诊治指南[J]. 中华儿科杂志, 2007,45(06):426-427.
Du ML. Guidelines for diagnosis and treatment of central (premature) precocious puberty[J]. Chin J Pediatr, 2007, 45 (06):426-427.
- [2] 赖朋,杨潇,刘振平,等. 母鼠高脂饮食致子代大鼠胰岛素抵抗的研究[J]. 食品科学,2013,34(23):282-290.
Lai P, Yang X, Liu ZP, et al. Insulin resistance in offspring rats induced by high-fat diet[J]. Food Sci, 2013, 34(23):282-290.
- [3] 邓晋芳,方蕾,郭晓东. 肥胖发病机制及其治疗靶点[J]. 现代生物医学进展, 2013,13(10):1997-2000+1961.
Deng JF, Fang L, Guo XD. Pathogenesis of obesity and its therapeutic targets[J]. Progr Mod Biomed, 2013,13(10):1997-2000+1961.
- [4] 林楚,杨文庆,俞建. 中医儿科临床诊疗指南·性早熟(修订)[J]. 中医儿科杂志,2016,12(03):1-5.
Lin S, Yang WQ, Yu J. Guidelines for clinical diagnosis and treatment of pediatrics in traditional Chinese medicine (revised)[J]. J Pediatr Trad Chin Med, 2016,12(03):1-5.
- [5] Roth C, Leonhardt S, Seidel C, et al. Comparative analysis of different puberty inhibiting mechanisms of two GnRH agonists and the GnRH antagonist cetrorelix using a female rat model[J]. Pediatr Res,2000,48(4):468-474.
- [6] Morishita H, Takemoto M, Kondo H, et al. Induction of true precocious puberty by neonatal treatment with danazol in female rats[J]. Neurosci Lett,1993,157(1):33-36.
- [7] 陈永霞,郑高利,程敏. 性早熟动物模型的研究进展[J]. 中药药理与临床,2011,27(02):132-134.
Chen YX, Zheng GL, Cheng M. Advances in animal models of precocious puberty[J]. Pharmacol Clin Chin Mat Med, 2011, 27(02):132-134.
- [8] 刘涛,徐秋玲,杨叔禹. 高脂饮食诱导痰湿证动物模型的建立与评价[J]. 长春中医药大学学报,2009,25(03):333-335.
Liu T, Xu QL, Yang SY. Establishment and evaluation of animal models of dampness syndrome induced by high fat diet[J]. J Changchun Univ Trad Chin Med,2009,25(03):333-335.
- [9] 吴赛,姜月华,杨传华,等. 痰湿壅盛证高血压大鼠模型的建立与评价[J]. 中国中西医结合杂志,2016,36(02):222-228.
Wu S, Jiang YH, Yang CH, et al. Establishment and evaluation of hypertensive rat model with dampness and dampness[J]. Chin J Int Trad West Med,2016,36(02):222-228.
- [10] 王燕萍,彭丹虹,刘晓琪,等. 高脂饮食喂养建立高脂血症模型的验证及规律探讨[J]. 中国比较医学杂志,2017,27(01):5-10.
Wang YP, Peng DH, Liu XQ, et al. Study on the verification and regularity of hyperlipidemia model established by high fat diet[J]. Chin J Comp Med, 2017,27(01):5-10.
- [11] Roth C, Leonhardt S, Theiling K, et al. Ontogeny of the GNRH-, glutaminase- and glutamate decarboxylase-gene expression in the hypothalamus of female rats[J]. Brain Res Dev Brain Res, 1998,110(1):105-114.