

· 论著 ·

淫羊藿调节 BMP-7 预防糖皮质激素致大鼠骨损害的研究

周乐 吴铁 崔燎*

广东医学院药学院, 东莞 523808

中图分类号: R285 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2014) 03-0234-05

摘要: **目的** 观察醋酸泼尼松和淫羊藿对大鼠胫骨近端上段骨组织形态计量学参数、股骨组织形态学和股骨骨形态发生蛋白-7 (BMP-7) 表达的影响, 探讨淫羊藿预防糖皮质激素致骨损害的 BMP-7 机制。 **方法** 3 月龄 SD 大鼠 24 只, 随机分为正常对照组、糖皮质激素模型组和淫羊藿防治组, 灌胃给药 90 d。测量胫骨近端上段骨组织形态计量学参数, 苏木素-伊红染色法观察股骨组织形态学, 免疫组化法检测股骨 BMP-7 的表达。 **结果** 醋酸泼尼松可导致大鼠胫骨近端上段标记周长百分数 (% L. Pm) 和骨形成率 (BFR/TV、BFR/BV 和 BFR/BS) 减少 ($P < 0.05$); 股骨骨小梁钙化减少, 成软骨化, 纤维组织增生, 骨小梁变窄、数量减少; 股骨 BMP-7 表达减少 ($P < 0.05$)。与泼尼松组比较, 淫羊藿组胫骨近端上段骨小梁面积百分数 (% Tb. Ar) 和骨形成率 (BFR/BS) 增加 ($P < 0.05$), 股骨无明显病理损害, 股骨 BMP-7 表达增多 ($P < 0.05$)。 **结论** 淫羊藿能通过上调骨组织 BMP-7 的表达, 预防糖皮质激素所致的骨损害。

关键词: 淫羊藿; 糖皮质激素; 骨质疏松; 骨形态发生蛋白-7

Study of the effect of epimedium on the prevention of glucocorticoid-induced bone lesions by regulating bone morphogenetic protein-7 in rats

ZHOU Le, WU Tie, CUI Liao*

School of Pharmaceutical Science, Guangdong Medical College, Dongguan 523808, China

Corresponding author: CUI Liao, Email: cuiliao@163.com

Abstract: **Objective** To observe the effect of prednisone acetate and epimedium (EP) on bone histomorphometric parameters in proximal tibia metaphyseal (PTM), the histomorphology of the femur, and the expression of bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) in the femur, and to explore the mechanism of EP in preventing glucocorticoid (GC)-induced bone lesions by regulating BMP-7. **Methods** Twenty-four 3-month SD rats were randomly divided into three groups: the normal control group, the GC model group, and the EP prevention group. All the rats were given an intragastric administration of drugs for 90 days. Bone histomorphometric parameters were measured in PTM. Hematoxylin-Eosin staining was performed to observe the histomorphology of the femur. Immunohistochemical method was used to detect the expression of BMP-7 in the femur. **Results** The bone mark perimeter rate (% L. Pm) and the bone formation rate (BFR/TV, BFR/BV, and BFR/BS) in PTM in the GC model group decreased ($P < 0.05$). The calcification of the bone trabecula decreased, showing chondrocyte and fibroplasia. The bone trabecula thinned and decreased. The expression of BMP-7 decreased in the femur ($P < 0.05$). Compared to that in GC model group, the bone trabecular area percentage (% Tb. Ar) and the bone formation rate (BFR/BS) increased in PTM in the EP prevention group ($P < 0.05$). No pathematological lesions were observed. The expression of BMP-7 in the femur increased ($P < 0.05$). **Conclusion** EP can prevent GC-induced bone lesions by up-regulating the expression of BMP-7 in the bone tissue.

Key words: Epimedium; Glucocorticoid; Osteoporosis; Bone morphogenetic protein-7

临床上糖皮质激素 (glucocorticoid, GC) 广泛应

用于治疗免疫性疾病和肿瘤等, 但可引起松质骨的骨量减少、骨三维网状结构破坏、骨吸收活动增强, 骨脆性增加, 骨生物力学性能下降^[1], 出现骨质疏松、骨折等损害。骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic proteins, BMPs) 是一类具有诱导成骨

基金项目: 湛江市科技计划项目 (2010C3102002); 广东医学院面上项目 (XK1002)

* 通讯作者: 崔燎, Email: cuiliao@163.com

的酸性多肽,是骨组织形成过程中最关键的调节因子,目前已证实超过 40 种 BMPs 亚成员与骨质疏松症的发病有关,其中 BMP-2、BMP-4、BMP-6 和 BMP-7 是研究热点^[2]。淫羊藿(epimedium, EP)是传统的补肾壮阳和强筋健骨药物,具有调节生殖系统和抗骨质疏松等作用^[3]。本研究观察醋酸泼尼松和淫羊藿对大鼠胫骨近端上段骨组织形态计量学参数、股骨组织形态学和股骨 BMP-7 表达的影响,探讨淫羊藿预防糖皮质激素致骨损害的 BMP-7 机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:3 月龄 SD 大鼠 24 只,雄性,清洁级,体重 300 ~ 350 g,由广东医学院实验动物中心提供。

1.1.2 药品与试剂:(1)淫羊藿的提取:淫羊藿生药材(湛江市药材公司)1.5 kg 用冷水浸泡 30 min 后煎煮 1.5 h,取汁,重复 2 次,合并滤液浓缩至 1500 ml,得到 1g 生药/ml 的淫羊藿水提液,避光 4 ℃ 保存。(2)醋酸泼尼松的配制:醋酸泼尼松原料(广东仙居制药股份有限公司)320 mg 和 1 ml 聚山梨酯-80(汕头西陇化工厂)混合研磨,加入蒸馏水稀释至 500 ml,每周配液一次。(3)主要试剂:盐酸四环素荧光标记物(上海新亚制药厂);Calcein 荧光标记物(Sigma Chemical Co., USA);BMP-7 多克隆抗体(Santa Cruz 公司);S-P 超敏鼠组织免疫组化试剂盒(福建迈新公司);DAB 显色剂(福建迈新公司)等。

1.1.3 主要仪器设备:电子分析天平(Mettler-Toledo instr. shanghai Ltd);手摇式切片机(上海仙申医教仪器厂);电热恒温鼓风干燥箱(上海医用恒温设备厂);低速锯(Buehler LTD. USA);碳化钨钢刀和硬组织切片机(德国 LEICA 公司);荧光显微镜及显微照相机(德国 LEICA 公司);自动图像分析系统(OsteoMetrics, USA)等。

1.2 动物分组和实验处理

将 3 月龄 SD 大鼠 24 只,随机分为 3 组:(1)正常对照组简称 Cont 组:上午和下午各给予蒸馏水 5 ml·kg⁻¹·d⁻¹;(2)糖皮质激素模型组简称 GC 组:上午给予醋酸泼尼松 3.2 mg·kg⁻¹·d⁻¹,下午给予蒸馏水 5 ml·kg⁻¹·d⁻¹;(3)淫羊藿防治组简称 EP 组:上午给予醋酸泼尼松 3.2 mg·kg⁻¹·d⁻¹,下午给予淫羊藿 5 g·kg⁻¹·d⁻¹,所有大鼠均灌胃给药 90 d。所有大鼠处死前第 14 d 和第 13 d 皮下注射盐酸四

环素 25 mg·kg⁻¹各一次,并于处死前第 4 d 和第 3 d 皮下注射钙黄绿素 5 mg·kg⁻¹各一次,两荧光标记间隔 10 d。

1.3 胫骨近端上段骨组织形态计量学参数的测量

用 3% 戊巴比妥钠(1.5 ml·kg⁻¹)腹腔注射麻醉大鼠,右心室彻底抽血处死。迅速取出胫骨,用低速锯沿冠状面锯开干骺端,暴露骨髓腔后,于胫骨上端 1/3 处横行锯断,将胫骨上端浸泡于 10% 福尔马林磷酸缓冲液 4 ℃ 下固定 24 h,换 70% 乙醇, -20 ℃ 保存备用。常规不脱钙骨塑化剂包埋,切成 8 μm 厚度骨切片,脱塑后封片,在骺线远端 1 mm 至 4 mm 范围内进行骨组织形态计量学参数的测量。由于各种原因导致个别胫骨组织结构损伤,但不影响统计结果。

1.4 股骨组织形态学的观察和 BMP-7 免疫组化法的测定

低速锯切取右侧股骨近端上段,4% 多聚甲醛固定 24 h 后,15% EDTA 液(pH 值 = 7.2)4 ℃ 脱钙,隔日换液,直到以 5% 草酸钠标定到脱钙终点为止,梯度酒精脱水、二甲苯透明、浸蜡,包埋,切取 5 μm 切片。(1)部分切片常规苏木素-伊红(hematoxylin eosin, HE)染色,显微镜下观察股骨组织形态学变化。(2)部分切片按照 S-P 超敏鼠组织免疫组化试剂盒说明书检测脱钙股骨中 BMP-7 的表达。观察切片至少 3 个具有代表性高倍视野,根据镜下观察的棕黄色阳性信号面积判断结果:阳性细胞 < 5% 为阴性表达(-);5% ~ 33.3% 为弱阳性表达(+);33.4% ~ 66.7% 为中阳性表达(++);> 66.8% 为强阳性表达(+++)。

1.5 统计学方法

数据统计使用 Stata 软件,计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,进行单因素方差分析;等级资料采用秩和检验,以 $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠胫骨近端上段骨组织形态计量学参数的变化

大鼠胫骨近端上段骨组织形态计量学静态参数[骨小梁面积百分数(% Tb. Ar)、骨小梁厚度(TbWi)、骨小梁数目(Tb. N)和骨小梁分离度(Tb. Sp)]和动态参数[标记周长百分数(% L. Pm)、骨矿化沉积率(MAR)和骨形成率(BFR/TV、BFR/BV 和 BFR/BS)]的变化见表 1。

表 1 大鼠胫骨近端上段骨组织形态计量学参数的变化 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 The change of bone histomorphometric parameters in rat proximal tibia metaphyseal ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	静态参数				动态参数				
	% Tb. Ar (%)	Tb. Wi (μm)	Tb. N (#/mm)	Tb. Sp (μm)	% L. Pm (%)	MAR ($\mu\text{m}/\text{d}$)	BFR/TV (%/yr)	BFR/BV (%/yr)	BFR/BS (%/yr)
Cont 组	10.46 $\pm$ 1.275	65.31 $\pm$ 3.384	1.606 $\pm$ 0.216	576.4 $\pm$ 88.87	17.709 $\pm$ 6.175	0.817 $\pm$ 0.162	13.990 $\pm$ 5.057	135.24 $\pm$ 48.22	5.334 $\pm$ 1.915
GC 组	8.78 $\pm$ 4.366	56.44 $\pm$ 14.72	1.500 $\pm$ 0.657	1025.6 $\pm$ 1223.83	8.285 $\pm$ 3.935 [*]	0.737 $\pm$ 0.054	5.753 $\pm$ 3.101 [*]	67.63 $\pm$ 37.11 [*]	2.219 $\pm$ 1.066 [*]
EP 组	14.76 $\pm$ 4.825 ^{Δ}	65.63 $\pm$ 6.810	2.216 $\pm$ 0.612	428.1 $\pm$ 195.12	11.843 $\pm$ 3.636	0.707 $\pm$ 0.042	10.853 $\pm$ 3.737	78.49 $\pm$ 28.12	3.051 $\pm$ 0.949 [*]
P 值	0.0435	0.2026	0.0720	0.0800	0.0115	0.1134	0.0102	0.0184	0.0039

注: ^{Δ} :与 GC 组比较, $P<0.05$;^{*}:与 Cont 组比较, $P<0.05$ 。

2.2 大鼠股骨石蜡切片 HE 染色形态学观察

正常大鼠股骨组织形态学(见图 1-1):各层细胞排列整齐,骨基质均匀,无纤维性增生及局部软骨化,骨小梁连接完好;骨小梁无稀疏变窄,空骨陷窝

较少。与 Cont 组比较,GC 组大鼠股骨骨小梁钙化减少,成软骨化(见图 1-2);纤维组织增生(见图 1-3);骨小梁变窄、数量减少、骨质疏松(见图 1-4)。EP 组无明显病理损害(见图 1-5)。

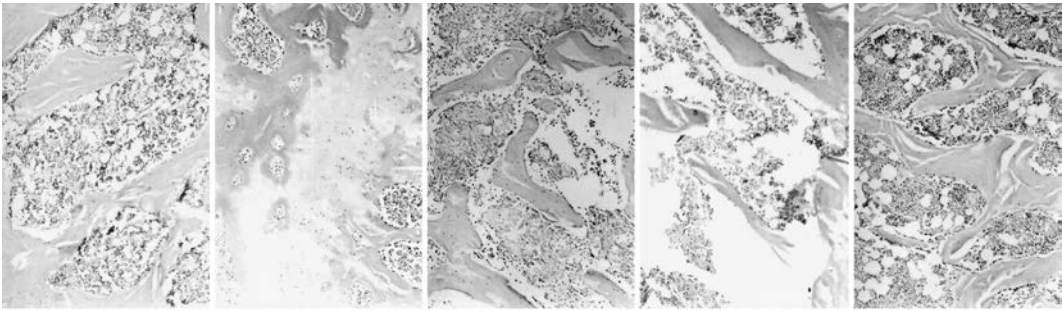


图1-1: Cont 组 图1-2: GC组 图1-3: GC组 图1-4: GC组 图1-5: EP组

图 1 大鼠股骨石蜡切片 HE 染色组织形态图(10×20 倍)

Fig. 1 Histomorphology of the rat femoral bone paraffin section using HE staining (×200)

2.3 股骨 BMP-7 的免疫组化表达结果

各组大鼠股骨 BMP-7 的表达见图 2,结果显示:各组大鼠股骨均有 BMP-7 表达,BMP-7 为胞浆表达,呈棕黄色颗粒状,主要在骨髓的间充质细胞和骨小梁周围的骨母细胞表达。GC 组表达量明显低于 Cont 组,而 EP 组较 GC 组表达明显增强。股骨 BMP-7 免疫组化阳性表达秩次:Cont 组为 80.0,Gc 组为 37.0,EP 组为 54.0,各组间有显著统计学意义($P=0.040$),两两比较:Cont 组与 GC 组有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

本研究发现糖皮质激素组大鼠股骨出现骨小梁钙化减少,成软骨化;纤维组织增生;骨小梁变窄、数量减少、骨质疏松;胫骨近端上段骨组织形态计量学

参数也提示有骨量减少和向骨质疏松变化的趋势,并且骨形成明显减少,其发生机制可能有:(1)使钙磷代谢紊乱,继发性甲状旁腺功能亢进,促使骨吸收加强。(2)促进骨髓基质细胞(marrow stroma cells, MSCs)的脂肪生成,抑制成骨分化。(3)诱导成骨细胞凋亡,抑制成骨细胞功能,糖皮质激素对成骨细胞的影响是骨结构和骨强度改变的主要原因^[4]。(4)促进骨吸收,表现为破骨细胞的数量和活性增加。(5)抑制下丘脑-垂体-性腺轴,抑制垂体生长激素的释放,对破骨细胞功能有促进作用,并直接作用于骨细胞抑制蛋白和胶原合成,进而抑制骨细胞的生长。(6)通过提高 BMP 抑制物(如卵泡抑素)编码基因的表达,也可通过旁路途径来抑制 BMP 信号引起骨质疏松^[5]。

成骨细胞是在体内各种调控因素的调节下由

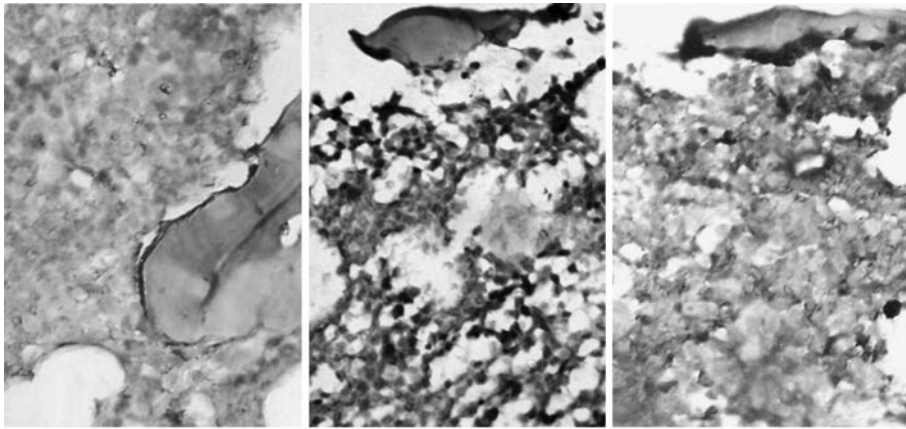


图2-1: Cont组

图2-2: GC组

图2-3: EP组

图 2 大鼠股骨石蜡切片 BMP-7 表达免疫组化图(10 × 40 倍)

Fig. 2 Immunohistochemical staining of BMP-7 in the rat femoral bone paraffin section (× 400)

MSCs 发展而来, BMPs 被公认为主要调控因素之一。在骨组织中 BMPs 亚家族表达较多的是 BMP-2 和 BMP-7, 两者骨组织表达部位一致, 并都有很强的诱导成骨作用。BMP-7 在成骨部位高表达, 可诱导 MSCs 向成骨、软骨细胞分化, 进而产生新生骨, 并促进碱性磷酸酶的表达, 修复和重建骨、软骨缺损^[6]。BMP-7 及其受体双重缺陷的小鼠会产生严重的四肢骨骼缺陷、尺骨几乎缺如、桡骨缩短^[7]。Noggin 是一种能与 BMP-2、BMP-4、BMP-7 结合并抑制其活性的多肽, 驱动 Noggin 转基因鼠可发展成骨质疏松, 并有明显骨矿物密度、骨容量和骨形成率下降^[8]。随着年龄的增长, BMP-7 水平会呈下降趋势, 骨质疏松症发病率增高。可见, 骨缺损、骨质疏松等多种骨疾病的发生总伴随着 BMP-7 的异常表达。

BMP-7 对骨质疏松疾病的防治有益。局部应用以纤维蛋白为载体的 BMP-7 能明显促进大鼠骨质疏松性椎体骨折的愈合^[9]。BMP-7 注射剂对去卵巢大鼠早期骨干骨折有治疗作用^[10]。BMP-7 可以增加老年骨质疏松患者骨组织中 MSCs 的增殖和成骨分化^[11]。通过生物支架持续释放 BMP-7 可以招募间充质干细胞, 减轻骨质疏松患者骨折^[12]。短期应用地塞米松可以显著增强 BMP-7 诱导骨形成作用^[13], 由此提示: 能够增加 BMP-7 表达的药物则可以防治糖皮质激素对骨组织的损害。

淫羊藿的抗骨损害作用与神经内分泌系统、血液系统以及炎症反应等多靶点、多层次的综合作用间接调控骨组织有关。淫羊藿被视为一种良好的骨诱导活性因子, 具有促进 MSCs 向成骨细胞分化的

能力, 增强成骨细胞的活性, 抑制破骨细胞活性及骨吸收功能等作用。淫羊藿能促进骨痂的形成, 促进软骨组织的增殖形成骨基质, 从而促进软骨内成骨过程, 与 BMP-2 的效果相当^[14], 淫羊藿促进 BMSCs 增殖和分化的能力强于 BMP-2^[15], 淫羊藿还可通过上调核心结合因子 α_1 和 BMP-4 mRNA 的表达而促进成骨细胞的分化^[16]; 并且淫羊藿可以提高肾脏 BMP-7 mRNA 和 BMP-7 的表达和增加血液中 BMP-7 含量, 作用于骨组织, 上调骨组织 BMP-7 mRNA 和 BMP-7 的表达, 发挥其诱导成骨作用, 增加骨形成, 对抗糖皮质激素所引起骨损害。

本研究中淫羊藿组骨组织形态计量学参数趋于正常, 骨组织形态学观察未见糖皮质激素引起的病理损害, BMP-7 表达量较糖皮质激素组增高, 表明淫羊藿能通过上调骨组织 BMP-7 的表达, 诱导成骨, 修复骨损伤, 预防糖皮质激素所致的骨损害。

【 参 考 文 献 】

- [1] Li Jie, Liu Ling-ping, Chen Hong, et al. Ultrastructural changes in distal femur cancellous bone in glucocorticoid-treated rats under scanning electron microscope. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2010, 14(9): 1521-1524.
- [2] Kanakaris NK, Petsatodis G, Tagil M, et al. Is there a role for bone morphogenetic proteins in osteoporotic fractures? Injury. 2009, 40 Suppl 3: S21-6.
- [3] SONG Min, LI Jing, LI Zhifeng, et al. Effect of Epimedium Flavonoids on Bone Density of Ovariectomized Rats. Zhe Jiang Journal of Integrated Traditional Chinese And Western Medicine, 2010, 20(5): 273-275.

- mainland Chinese women with type 2 diabetes mellitus. J Endocrinol Invest, 2011, 34(3):190-196.
- [2] Rinkel A, Sheehy O, Rahme E, et al. Osteoporosis among patients with type 1 and type 2 diabetes. Diabetes Metab, 2008, 34(3):193-205.
- [3] Mascitelli L, Pezzetta F. Type 2 diabetes and fracture risk. Lancet, 2006, 368(9537):732.
- [4] Yaturu S, Humphrey S, Landry C, et al. Decreased bone mineral density in men with metabolic syndrome alone and with type 2 diabetes. Med Sci Monit, 2009, 15(1):CR5-9.
- [5] Halleen JM. Tartrate-resistant acid phosphatase 5B is a specific and sensitive marker of bone resorption. Anticancer Res, 2003, 23(2A):1027-1029.
- [6] Reginster JY, Collette J, Neuprez A, et al. Role of biochemical markers of bone turnover as prognostic indicator of successful osteoporosis therapy. Bone, 2008, 42(5):832-836.
- [7] Feng Zhengping, Deng Huacong, Du Jia, et al. Lentiviral-mediated RNAi targeting p38MAPK ameliorates high glucose-induced apoptosis in osteoblast MC3T3-E1 cell line. Indian J. Exp. Biol, 2011, 49(2):94-104.
- [8] García-Hernández A, Arzate H, Gil-Chavarría I, et al. High glucose concentrations alter the biomineralization process in human osteoblastic cells. Bone, 2012, 50(1):276-288.
- [9] Inaba M, Nishizawa Y, Mita K, et al. Poor glycemic control impairs the response of biochemical parameters of bone formation and resorption to exogenous 1,25-dihydroxyvitamin D3 in patients with type 2 diabetes. Osteoporosis Int, 1999, 9:525-531.
- [10] Savopoulos C, C Dokos, Kaiafa G, et al. Adipogenesis and osteoblastogenesis: trans-differentiation in the pathophysiology of bone disorders. Hippokratia, 2011, 15(1):18-21.
- [11] Goto H, M Osaki, Fukushima T, et al. Human bone marrow adipocytes support dexamethasone-induced osteoclast differentiation and function through RANKL expression. Biomed Res, 2011, 32(1):37-44.

(收稿日期:2013-03-29)

(上接第 237 页)

- [4] Pierotti S, Gandini L, Lenzi A, et al. Pre-receptorial regulation of steroid hormones in bone cells: insights on glucocorticoid-induced osteoporosis. J Steroid Biochem Mol Biol, 2008, 108(3-5):292-9.
- [5] Leclerc N, Luppen CA, Ho VV, et al. Gene expression profiling of glucocorticoid-inhibited osteoblasts. J Mol Endocrinol, 2004, 33(1):175-93.
- [6] Maurer T, Zimmermann G, Maurer S, et al. Inhibition of osteoclast generation: a novel function of the bone morphogenetic protein 7/osteogenic protein 1. Mediators Inflamm, 2012, 2012:171209.
- [7] Yi SE, Daluiski A, Pederson R, et al. The type I BMP receptor BMPRII is required for chondrogenesis in the mouse limb. Development, 2000, 127(3):621-30.
- [8] Wu XB, Li Y, Schneider A, et al. Impaired osteoblastic differentiation, reduced bone formation, and severe osteoporosis in noggin-overexpressing mice. J Clin Invest, 2003, 112(6):924-934.
- [9] Sheng Jundong, GU Jiujun, LIU Xingyan, et al. Complex of bone morphogenetic protein 7 and fibrin protein on the healing of osteoporotic vertebral fracture. Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2010, 20(4):291-294.
- [10] Blokhuis TJ, Buma P, Verdonchot N, et al. BMP-7 stimulates early diaphyseal fracture healing in estrogen deficient rats. J Orthop Res, 2012, 30(5):720-5.
- [11] Pountos I, Georgouli T, Henshaw K, et al. The effect of bone morphogenetic protein-2, bone morphogenetic protein-7, parathyroid hormone, and platelet-derived growth factor on the proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from osteoporotic bone. J Orthop Trauma, 2010, 24(9):552-6.
- [12] Zhang Y, Cheng N, Miron R, et al. Delivery of PDGF-B and BMP-7 by mesoporous bioglass/silk fibrin scaffolds for the repair of osteoporotic defects. Biomaterials, 2012, 33(28):6698-708.
- [13] Spiro AS, Beil FT, Schinke T, Schilling AF, et al. Short-term application of dexamethasone enhances bone morphogenetic protein-7-induced ectopic bone formation in vivo. J Trauma, 2010, 69(6):1473-80.
- [14] Wang Xin-wen, He Ai-yong, Cai Yu-zhong, et al. Effect of epimedium and bone morphogenetic protein-2 on fracture healing in rabbits. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2011, 15(11):2030-2033.
- [15] Liu Hai-jiang, Wang Xiao-ping, Lin Juan, et al. The Effect of Icaritin and Astragaloside I on the Proliferation and Differentiation of Bone Marrow Stromal Cells. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2006, 29(10):1062-1065.
- [16] He Wei, Li Zi-li, Cui Yuan-lu, et al. Effect of icaritin on the mRNA expressions of Cbfa1, BMP-2, BMP-4 in rat osteoblasts. Journal of Peking University(Health Sciences), 2009, 41(6):669-673.

(收稿日期:2013-03-25)

淫羊藿调节 BMP-7预防糖皮质激素致大鼠骨损害的研究

作者: [周乐](#), [吴铁](#), [崔燎](#), [ZHOU Le](#), [WU Tie](#), [CUI Liao](#)
作者单位: [广东医学院药学院, 东莞, 523808](#)
刊名: [中国骨质疏松杂志](#) 
英文刊名: [Chinese Journal of Osteoporosis](#)
年, 卷(期): 2014(3)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201403003.aspx