

基础研究

DOI:10.11699/cyxh20131126

阴道加德纳菌通过一种毒素介导输卵管组织损伤

洪 宇

(辽东学院医学院基础医学教学部病原生物教研室, 丹东 118003)

【摘要】目的:探讨阴道加德纳菌(*Gardnerella vaginalis*, *G.vaginalis*)及其培养上清对输卵管组织的损伤作用。**方法:**体外培养不同株的 *G.vaginalis*, 制备不同浓度的细菌悬液, 对菌液离心后, 将上清进行过滤获得无菌的细菌培养上清(细菌滤液), 用反复冻融和灭活处理细菌滤液, 对牛输卵管组织进行组织培养, 用不同浓度梯度的细菌悬液和处理的细菌滤液对牛输卵管组织进行刺激, 利用超高倍显微镜观察不同组输卵管组织表面纤毛不同时间点的运动强度与幅度。采用 CD59 功能性抗体和有丝分裂原活化蛋白激酶 p38(mitogen-activated protein kinase p38, p38 MAPK)途径抑制剂判断其对损伤的作用。**结果:**菌液, 无菌细菌滤液, 热处理、反复冻融处理的细菌滤液均能对输卵管组织纤毛的运动能力造成损伤, 使其运动强度与幅度减弱。经与对照培养基比较差异有统计学意义($P<0.007$), 组织切片未能发现明显损伤, 扫描电镜检查发现输卵管组织黏膜层纤毛组织数量与密度明显下降。CD59 功能性抗体和 p38 MAPK 途径抑制剂能够减弱此种毒素产生的损伤。**结论:***G.vaginalis* 通过一种可溶性的毒素经 CD59 依赖的 p38 MAPK 途径影响输卵管组织的功能。

【关键词】阴道加德纳菌; 细菌滤液; 组织培养

【中国图书分类法分类号】R378

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-12-06

Gardnerella vaginalis mediating fallopian tube tissue injury through a toxin

HONG Yu

(Teaching and Research Section of Pathogenic Microorganism, Department of Basic Medicine, School of Medicine, Eastern Liaoning University)

【Abstract】Objective: To explore the effect of *Gardnerella vaginalis* (*G.vaginalis*) and its culture supernatant on the injury of fallopian tube tissue. **Methods:** Two strains of *G.vaginalis* were cultured in vitro. Different concentrations of bacterial suspension and sterile bacterial filtrate were prepared. Bacterial filtrate was repeatedly frozen thawed and inactivated. Bovine oviduct was cultured with or without different concentrations of bacterial suspension and processed bacterial filtrate. Ultra-high-power microscope was used to observe the cilia beating intensity and amplitude at different time points in different groups. Effects of *G.vaginalis* and different treatment forms of its culture supernatant on fallopian tube were determined. CD59 function antibodies and mitogen-activated protein kinase p38 (p38 MAPK) pathway inhibitor was used to determine the damage process. **Results:** Sterile bacterial filtrate, heat treated bacterial filtrate, repeatedly frozen thawed bacterial filtrate all can cause damage to athletic ability of oviduct cilia and weaken their beating intensity and amplitude ($P<0.007$). Tissue sections failed to find evidence of damage, but scanning electron microscope examination found that the number and length of the oviduct mucosal layer cilia were decreased. CD59 functional antibody and p38 MAPK pathway inhibitor can alleviate such toxins damage. **Conclusions:** *G.vaginalis* affect the function of the oviduct by a soluble toxin via CD59 dependent p38 MAPK pathway.

【Key words】 *Gardnerella vaginalis*; bacterial filtrate; tissue culture

阴道加德纳菌(*Gardnerella vaginalis*, *G.vaginalis*)是一种革兰阴性的球杆菌, 在很多健康、怀孕妇女的阴道内以较少的数量存在, 但是在细菌性阴道炎患者体内其数量增加超过千倍^[1], 其是女性童年期和青春期下生殖道感染的主要病原菌, 其导致的女性下生殖道感染排名第 2, 仅次于白色念珠菌^[2]。*G.vaginalis* 数量的增多使得上生殖道感染的机会增加, 比如盆腔炎^[3]、输卵管感染^[4]。基于其在女性生殖

系统感染中的重要影响, 本研究主要就 *G.vaginalis* 对输卵管组织损伤展开研究, 探索其对输卵管损伤的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株: *G.vaginalis* 3.1, *G.vaginalis* 194 购自于中国典型培养物保藏中心。牛输卵管组织: 取自成年屠宰肉牛, 取出输卵管组织后用无菌磷酸缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)

作者简介: 洪 宇, Email: hy_hongyu123@163.com,

研究方向: 病原生物学。

冲洗几次,加入 10 $\mu\text{g/ml}$ 氨苄青霉素(ampicillin,AMP)。功能性抗牛 CD59 抗体购自 Santa Cruz 公司。有丝分裂原活化蛋白激酶 p38(mitogen-activated protein kinase p38,p38 MAPK)抑制剂 SB239063 购自葛兰素史克公司,严格按照说明书要求使用,使用浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.2 细菌培养与保存

1.2.1 培养 2 株 *G.vaginalis* 培养于含 10% 绵阳红细胞的哥伦比亚琼脂中,条件为 48 h、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 ,或者培养于含 10% 热灭火马血清的蛋白胨-淀粉-葡萄糖(peptone-starch-dextrose,PSD)培养基,条件为 48 h、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 。

1.2.2 细菌保存 对数期菌种保存于含 10% 甘油、10% 绵阳红细胞或脱脂牛奶的巯基乙酸盐培养基,保存条件-70 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.3 组织培养

切除输卵管组织剪后浸泡在含 10% 胎牛血清的 Earle-MEM 完全培养基(含 AMP 10 $\mu\text{g/ml}$),30 min 内无菌转移到实验室,剪开成单层轻轻去掉外膜,暴露出黏膜层,剪碎至大小 3~4 mm^2 ,培养于 6 孔板。

1.4 细菌、细菌培养液处理及分组

1.4.1 细菌、细菌培养液处理 *G.vaginalis* 于 PSD 培养基培养 48 h 后,400 g 洗 1 次,用 MEM-HEPES 洗 1 次,调整细菌浓度至 10^6 pfu/ml。细菌培养液处理:*G.vaginalis* 于 PSD 培养基培养 48 h 后,400 g $\times$ 10 min,取上清,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,收集过滤液。对滤液采取:①冻融方式处理:-70 $^{\circ}\text{C}$,2 h-室温溶解--70 $^{\circ}\text{C}$,2 h-室温溶解后保存于-70 $^{\circ}\text{C}$ 备用,此样品命名:冻融滤液;②56 $^{\circ}\text{C}$,30 min 处理,此样品命名:热处理滤液。细菌滤液经 72 h 无菌培养均未见明显浑浊,实验中对照培养基为含 10% 马血清的 PSD 培养基;对照冻融培养基为不加细菌的含 10% 马血清的 PSD 培养基过滤后冻融处理所得;对照热处理培养基为不加细菌的含 10% 马血清的 PSD 培养基过滤后热处理所得。

1.4.2 分组 2 个菌株均设置对照组和实验组,以对照培养基为阴性对照,菌液、未冻融无菌滤液、冻融无菌滤液、未热处理无菌滤液、热处理无菌滤液为实验组。

1.5 纤毛活动程度判断

各组组织在实验前、后显微镜下观察输卵管组织的纤毛运动情况,根据运动幅度和速度给予 0~10 分的评分,0 分为不运动,10 分为运动速度和幅度最大。采用 2 位不同病理医师盲法阅片。每组至少阅 5 个组织块,计算其运动程度平均值,计算实验后纤毛运动程度占实验前活动程度的百分比。

1.6 CD59 抗体及 MAPK 抑制剂使用

组织培养物、CD59 抗体、MAPK 根据实验要求同一时间加入到培养皿内,轻轻混匀。在实验规定时间下观察纤毛活动程度。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 18.0 统计软件进行统计分析。纤毛活动程度以百分比率(%)形式表示,故为计数资料。组间比较:仅行两两(分割)卡方(χ^2)检验,检验方法分别为常规卡方检验或 Yates 校正卡方检验(因整体卡方检验难以解释实验效应,故不在文中表中列示,亦不提及);组内比较:即各时间点的比较,行配对卡方-优势卡方检验。检验水准:因比较次数 K(组数和时点数)较多,为降低 I 类统计风险,调整检验水准为 $\alpha'=0.05/K$ 。

2 结 果

2.1 不同浓度 *G.vaginalis* 3.1,*G.vaginalis* 194 菌液对输卵管纤毛组织运动能力的影响

调整细菌浓度至 10^6 pfu/ml,根据不同的稀释倍数将细菌加入到组织培养皿中,使得细菌的浓度分别为 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 pfu/ml,与组织块混合培养后,采用将组织块取出用 PBS 冲洗 3 次的方式终止细菌对组织的直接作用,换新平皿与培养基继续培养至观测时间点。记录各点的输卵管组织纤毛的运动程度。培养物中加入 *G.vaginalis* 3.1 浓度为 10^6 Pfu/ml 的时候在培养 12 h 就发现其运动能力大幅下降至 0h 时候的 50%,*G.vaginalis* 194 造成的下降幅度较 *G.vaginalis* 3.1 要小,但也使其运动程度大大降低,降低 2 种细菌的浓度后其对输卵管纤毛运动能力的损伤作用也发生不同程度的减弱,结果详见表 1。

表 1 不同浓度 *G.vaginalis* 3.1,*G.vaginalis* 194 对输卵管纤毛组织运动能力的影响

Tab.1 Effects of different concentrations of *G.vaginalis* 3.1 and *G.vaginalis* 194 on tubal cilia movement ability

刺激物	稀释倍数	各观察时间点纤毛的运动程度(%)										
		0 h	12 h	χ^2 值,P 值	24 h	χ^2 值,P 值	36 h	χ^2 值,P 值	48 h	χ^2 值,P 值	72 h	χ^2 值,P 值
对照培养基		100	100		100		95		90		80	
3.1 菌液	0	100	50	64.02,0.000	5	177.16,0.000	0	177.16,0.000	0	160.02,0.000	0	130.02,0.000
194 菌液	0	100	75	26.33,0.000	40	82.88,0.000	20	112.04,0.000	0	160.02,0.000	0	130.02,0.000
3.1 菌液	10	100	55	55.51,0.000	20	130.02,0.000	5	158.42,0.000	0	160.02,0.000	0	130.02,0.000
194 菌液	10	100	75	26.33,0.000	55	55.51,0.000	25	99.18,0.000	5	141.47,0.000	0	130.02,0.000
3.1 菌液	100	100	60	47.53,0.000	40	82.88,0.000	10	141.47,0.000	0	160.02,0.000	0	130.02,0.000
194 菌液	100	100	75	26.33,0.000	55	55.51,0.000	35	76.51,0.000	15	109.79,0.000	5	112.04,0.000
3.1 菌液	1000	100	65	40.03,0.000	40	82.88,0.000	10	141.47,0.000	0	160.02,0.000	0	130.02,0.000
194 菌液	1000	100	85	14.12,0.002	85	14.12,0.002	75	14.16,0.002	50	36.21,0.000	20	69.62,0.000

注:各菌液组均分别与同一时间对照培养基组比较,常规卡方检验或 Yates 校正卡方检验;比较次数 $K=8$,调整检验水准,取 $\alpha'=0.05/8 \approx 0.007$

2.2 *G.vaginalis* 3.1, *G.vaginalis* 194 细菌冻融滤液与热处理滤液对输卵管组织运动能力影响

分别将 *G.vaginalis* 3.1, *G.vaginalis* 194 增菌培养 48 h 后收集菌液上清并过滤除菌, 对其采取反复冻融或热处理 (56 °C × 30 min), 将此滤液分别按照一定稀释倍数加入到输卵管组织培养皿中, 判断不同时间点输卵管组织纤毛的运动程度。见表 2、3。

对输卵管培养组织块进行快速冰冻切片后进行苏木素-伊红染色, 和对照组相比, 没有观察到明显的组织损伤。但是

对组织进行扫描电镜观察, 发现纤毛数量和长度明显减少, 见图 1。

2.3 受体 CD59 参与介导毒素引起的损伤且毒性作用依赖 p38 MAPK 途径

进一步研究了此种耐热耐冻融的毒素导致输卵管损伤的机制, 仍然采用组织培养的方式对其进行比较。Gelber 等^[6]曾经发现 *G.vaginalis* 产生的一种溶血素是通过 CD59 依赖的途径, 并通过激活 MAPK 来介导溶血和组织损伤, 此种耐热耐冻融的可溶性毒素是否也是通过 CD59 发挥其作用呢? 检

表 2 不同浓度 *G.vaginalis* 3.1, *G.vaginalis* 194 冻融菌液对输卵管纤毛组织运动能力的影响

Tab.2 Effects of freeze-thaw bacteria liquid with different concentrations of *G.vaginalis* 3.1 and *G.vaginalis* 194 on tubal cilia movement ability

刺激物	稀释倍数	各观察时间点纤毛的运动程度 (%)						
		0	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h	96 h
对照冻融培养基		100	100	100	100	100	95	80
3.1 菌液滤液 (未冻融)		100	65 ^a	0 ^a	0	0	0	0
	0	100	60 ^a	0 ^a	0	0	0	0
3.1 菌液冻融滤液	4	100	70 ^a	10 ^a	0	0	0	0
	20	100	75 ^a	10 ^a	5 ^a	0	0	0
194 菌液滤液 (未冻融)		100	70 ^{ab}	20 ^{ab}	15 ^{ab}	5 ^a	0	0
	0	100	70 ^a	25 ^{ac}	15 ^{ac}	10 ^{ac}	0	0
194 菌液冻融滤液	4	100	70 ^a	35 ^{ac}	30 ^c	10 ^{ac}	5 ^a	0
	20	100	100 ^c	45 ^{ac}	40 ^c	25 ^{ac}	20 ^{ac}	10 ^{ac}

注 1: 本表进行两类比较, (1) 各时点与 0 h 的组内比较, 采用调整检验水准之后的配对卡方 - 优势卡方检验; 需比较次数从表中第 2 行到最后 1 行, 分别为 2、3、5、7 (实验规定: 当某时点运动程度为 0 则结束观测, 故各行需比较时点数不同)。权衡后参考表 2 调整原则, 即检验水准调整为 $\alpha' = 0.05/8 \approx 0.007$; (2) 是各组间的两两比较, 采用常规卡方检验

注 2: 本表由于比较指标很多, 故不再单独列示各时点差值比较的统计参数及 *P* 值

注 3: 与 0 h 时点的组内比较: a, $P < 0.007$; 与同一时间点 3.1 菌液滤液 (未冻融) 的组间比较: b, $P < 0.007$; 与同一时间点 3.1 菌液冻融滤液的组间比较 c, $P < 0.007$

表 3 不同浓度 *G.vaginalis* 3.1, *G.vaginalis* 194 热处理菌液对输卵管纤毛组织运动能力的影响

Tab.3 Effects of heat treated bacterial liquid with different concentrations of *G.vaginalis* 3.1 and *G.vaginalis* 194 on tubal cilia movement ability

刺激物	稀释倍数	各观察时间点纤毛的运动程度 (%)						
		0	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h	96 h
对照热处理培养基		100	100	100	100	100	95	80
3.1 菌液滤液 (未热处理)		100	60 ^a	10 ^a	5 ^a	0	0	0
	0	100	65 ^a	10 ^a	0	0	0	0
3.1 菌液热处理滤液	4	100	75 ^a	15 ^a	0	0	0	0
	20	100	75 ^a	20 ^a	5 ^a	0	0	0
194 菌液滤液 (未热处理)		100	70 ^a	20 ^{ab}	15 ^{ab}	5 ^a	0	0
	0	100	70 ^a	25 ^{ac}	15 ^{ac}	10 ^{ac}	0	0
194 菌液热处理滤液	4	100	80 ^a	40 ^{ac}	30 ^{ac}	10 ^{ac}	5 ^a	0
	20	100	100 ^c	55 ^{ac}	35 ^{ac}	25 ^{ac}	10 ^{ac}	0

注 1: 本表进行两类比较, (1) 各时点与 0 h 的组内比较, 采用调整检验水准之后的配对卡方 - 优势卡方检验; 需比较次数从表中第 2 行到最后 1 行, 分别为 2、3、5、7 (实验规定: 当某时点运动程度为 0 则结束观测, 故各行需比较时点数不同)。权衡后参考表 2 调整原则, 即检验水准调整为 $\alpha' = 0.05/8 \approx 0.007$; (2) 是各组间的两两比较, 采用常规卡方检验

注 2: 本表由于比较指标很多, 故不再单独列示各时点差值比较的统计参数及 *P* 值

注 3: 与 0 h 时点的组内比较: a, $P < 0.007$; 与同一时间点 3.1 菌液滤液 (未冻融) 的组间比较: b, $P < 0.007$; 与同一时间点 3.1 菌液冻融滤液的组间比较 c, $P < 0.007$

测了 3.1 上清和 194 上清培养刺激后的牛输卵管组织的 MAPK 表达,发现刺激后 p38 MAPK 的表达明显高于未刺激组(结果另文发表),同时使用了特异性的 CD59 抗体和 p38 MAPK 途径抑制剂来阻断这一过程。结果发现,无论是封闭 CD59 还是抑制 p38 MAPK 途径,均能明显降低菌液对组织培养物造成的毒性损伤。但是将 CD59 封闭和 p38 MAPK 途径抑制剂共同作用,并不能产生对纤毛组织保护的叠加。如图 2 所示。



A. 牛输卵管组织,对照培养基
处理 3 d,纤毛运动程度 95%



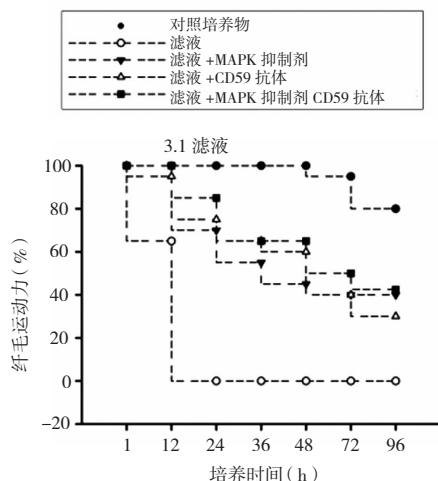
B. 牛输卵管组织,*G.vaginalis* 194 冻融滤液
(稀释 4 倍)处理 24 h,纤毛运动程度 35%



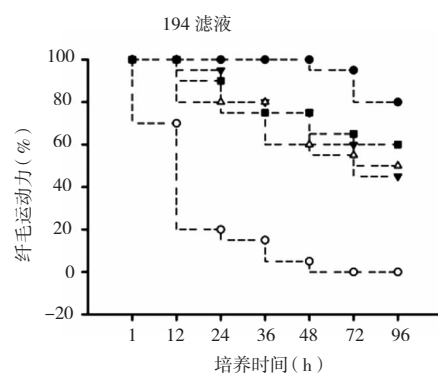
C. 牛输卵管组织,*G.vaginalis* 194 冻融滤液
(稀释 20 倍)处理 72 h,纤毛运动程度 5%

图 1 不同程度纤毛损伤程度组织扫描电镜观察 (1 772 ×)

Fig.1 Different degrees of cilia damage observed by scanning electron microscope (1 772 ×)



A. p38 MAPK 抑制剂和 CD59 抗体
对 3.1 滤液损伤纤毛运动力的影响



B. p38 MAPK 抑制剂和 CD59 抗体对
194 滤液损伤纤毛运动力的影响

图 2 毒素引起损伤与受体 CD59 及 p38 MAPK 有关

Fig.2 Association of toxin caused tubal tissue injury with CD59 and p38 MAPK

3 讨论

G.vaginalis 广泛存在于妇女的阴道内,除了主要引起女性生殖道感染外^[2],还能引起如骨盆^[3]、输卵管^[4]等组织的感染,成为影响女性生殖健康不容忽视的病原菌。其不仅在女性生殖道内存在,男性的生殖器官也会有少量的 *G.vaginalis* 存在,因此也会造成男女通过性传播,但其一般不导致严重的感染。也有报道称假关节置入术中发生感染的病原菌是 *G.vaginalis*^[4],*G.vaginalis* 感染和输卵管损伤之间有着紧密的联系^[5]。Gelber 等^[6]2008 年的 1 项报道表明:*G.vaginalis* 能产生 1 种对人类特异的溶血素,会引起阴道上皮细胞损伤。

体外组织培养能有效避开体内的免疫系统,而产生的影响是针对整个组织,其整体效果优于单纯的体外细胞培养。组织培养的发展为体外研究生殖道感染对组织产生的影响提供了基础^[7]。Taylor-Robinson 与 Boustouller 的研究^[8]发现 *G.vaginalis* 既可以造成人输卵管组织损伤,还可以造成牛输卵管组织损伤,这说明 *G.vaginalis* 并不是对人的组织具有特异性,牛输卵管组织得到具有便利性,这也为研究生殖道组织的感染提供了便利,而非和淋球菌一样,引起输卵管组织损伤对灵长类具有特异性^[9]。

本研究选择 2 株不同的 *G.vaginalis*,*G.vaginalis* 194 电镜下可见到菌毛而 *G.vaginalis* 3.1 无菌毛。首先用菌液去刺激黏膜组织,结果发现在 *G.vaginalis* 3.1 浓度为 10^6 pfu/ml 培养 12 h 的时候,其运动能力大幅下降至 0 h 时候的 50%;*G.vaginalis* 194 造成

的下降幅度较 *G.vaginalis* 3.1 要小,但也使其运动程度大大降低,造成这种差异可能与细菌本身有无菌毛有关,194 为有菌毛菌,而 3.1 无菌毛。同时电镜照片显示实验因素还会使黏膜组织上纤毛的数量和长度明显减短,这可能和黏膜的损伤程度不同有关。将菌液浓度下调也可以明显观察到其对输卵管纤毛运动能力的损伤作用也发生不同程度的减弱。为了探清到底是细菌自身产生了这种效应还是由于细菌释放了某种物质介导的纤毛运动能力减弱,将细菌培养液分离出后除菌,按照一定的浓度梯度刺激输卵管组织,结果发现细菌培养液中确实存在一种能够损伤黏膜组织纤毛的物质。

接下来将这种滤液进行反复冻融处理与加热处理后再去刺激输卵管组织,同样判断黏膜上纤毛的运动能力和组织损伤,值得注意的是,这样的处理方式并没有削弱细菌培养滤液的作用。处理后滤液的作用和没有处理的滤液作用几乎一致,对组织块进行快速冰冻切片后用苏木精-伊红染色观察不到明显的组织损伤,但是对组织块黏膜层的扫描电镜结果很清晰地发现纤毛长度和密度明显降低。这一结果进一步说明,细菌培养滤液里确实存在能够引起输卵管纤毛运动程度减弱的物质。

CD59 为一种膜分子,能通过特异性的 CD59 抗体对其进行封闭处理。*G.vaginalis* 能通过 CD59 和 MPK 介导其产生的溶血素导致组织损伤^[6]。本研究中,将 CD59 分子用特异性的抗体封闭后发现其能削弱这种损伤,说明产生的这种损伤至少部分是通过 CD59 分子介导。同样,用 p38 MAPK 抑制剂特异性地阻断这一信号通路也能起到同样的作用,但是将二者联合使用并没有得到叠加的效果,提示在这种损伤中 CD59 分子可能是引起 p38 MAPK 激活的上游分子。

总之,本研究发现 *G.vaginalis* 能产生一种可溶形式的毒素,能对输卵管组织黏膜造成损伤,发现这一物质会对研究由 *G.vaginalis* 引发的感染造成的损伤提供基础。

参 考 文 献

- [1] Rosenstein I J, Morgan D J, Sheehan M, et al. Bacterial vaginosis in pregnancy: distribution of bacterial species in different gram-stain categories of the vaginal flora[J]. J Med Microbiol, 1996, 45(2): 120-126.
- [2] Deligeorgiou E, Salakos N, Makrakis E, et al. Infections of the lower female genital tract during childhood and adolescence[J]. Clin Exp Obstet Gynecol, 2004, 31(3): 175-178.
- [3] No authors listed. Pelvic inflammatory disease: guidelines for prevention and management[J]. MMWR Recomm Rep, 1991, 40(RR-5): 1-25.
- [4] Hoarau G, Bernard S, Pavese P, et al. Gardnerella vaginalis as a rare cause of prosthetic joint infection[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(12): 4154-4156.
- [5] Wilson J D, Ralph S G, Rutherford A J. Rates of bacterial vaginosis in women undergoing in vitro fertilisation for different types of infertility[J]. BJOG, 2002, 109(6): 714-717.
- [6] Gelber S E, Aguilar J L, Lewis K L, et al. Functional and phylogenetic characterization of Vaginolysin, the human-specific cytotoxin from Gardnerella vaginalis[J]. J Bacteriol, 2008, 190(11): 3896-3903.
- [7] Taylor-Robinson A W, Borriello S P, Taylor-Robinson D. Identification and preliminary characterization of a cytotoxin isolated from Mobiluncus spp[J]. Int J Exp Pathol, 1993, 74(4): 357-366.
- [8] Taylor-Robinson D, Boustouller Y L. Damage to oviduct organ cultures by Gardnerella vaginalis[J]. Int J Exp Pathol, 2011, 92(4): 260-265.
- [9] McGee Z A, Gregg C R, Johnson A P, et al. The evolutionary watershed of susceptibility to gonococcal infection[J]. Microb Pathog, 1990, 9(2): 131-139.

(责任编辑:冉明会)

祝贺本刊被 CSCD 核心库收录