

## BMPR I a 在人脑胶质瘤中的表达\*

陈彩霞<sup>1</sup>, 邹杰<sup>1</sup>, 李素珍<sup>1</sup>, 鲍玉洲<sup>2</sup>, 步星耀<sup>3△</sup>

(河南省人民医院:1. 检验科;2. 眼科研究所;3. 神经外科三, 郑州 450000)

**摘要:**目的 检测 BMPs/BMPR/Smads 信号转导通路上的 BMPR I a 人脑胶质瘤组织中的表达, 研究其与人脑胶质瘤发生、发展中的作用及其与临床病理分级的关系。方法 分别应用 RT-PCR 技术和免疫组织化学 SABC 法检测 20 例正常脑组织和 40 例不同级别人脑胶质瘤组织中 BMPR I a mRNA 和蛋白质表达量, 并分析其与患者的年龄、性别、病理分级的相关性。结果 人脑胶质瘤组织 BMPR I a mRNA 和蛋白质表达量比正常脑组织显著降低, 并以 III、IV 期肿瘤组织中的表达显著低于 I、II 期; 上述指标的变化与患者的年龄及性别无关。结论 在人脑胶质瘤发生、发展过程中 BMPR I a 可能起到抑制作用, 且与年龄和性别无关。

**关键词:** 脑胶质瘤; BMPRs; 逆转录-聚合酶链式反应; 免疫组织化学

**中图分类号:** R739.41

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1671-8348(2014)23-3005-03

## Expression and significance of BMPR I a in human glioma\*

Chen Cai.xia<sup>1</sup>, Zou Jie<sup>1</sup>, Li Suzhen<sup>1</sup>, Bao Yuzhou<sup>2</sup>, Bu Xingyao<sup>3△</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou, Henan 450000, China;

2. Eye Institute, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou, Henan 450000, China;

3. Three Department of Neurosurgery, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou, Henan 450000, China)

**Abstract: Objective** To detect the expressions of BMPR I a of BMPs/BMPR/Smads signaling transduction pathway in human brain glioma, to research the role of its in tumorigenesis and progression of brain glioma and its correlation to clinical pathology.

**Methods** The mRNA and protein expressions of BMPR I a was detected in 20 normal brain tissues and 40 samples with human glioma by RT-PCR and SABC immunohistochemical methods, respectively, and analyzed the correlation with the patient's age, gender and pathological grade. **Results** Compared with normal brain tissues, BMPR I a mRNA and protein expressions in human glioma were reduced significantly, especially in III and IV stage tumor tissues. The difference was not related with the patient's age and gender. **Conclusion** In progression of glioma, BMPR I a may play a role in restraining, and has nothing to do with age and sex.

**Key words:** glioma; BMPRs; signal transduction pathways; RT-PCR; immunohistochemistry

胶质瘤是颅内最常见的恶性肿瘤。迄今为止, 因缺乏有效的治疗方法, 平均生存期不到 1 年<sup>[1]</sup>。脑胶质瘤的发生也是一个多基因参与的多阶段的发生、发展过程, 对胶质瘤进展相关基因的探索及其发病机理和分子机制的深入研究将为发现新的分子疗法和靶向治疗提供依据。已有研究发现<sup>[2-3]</sup>, 抑癌基因 p53、PTEN/DMBT1 的缺失或突变, EGF/EGFR 和 VEGF/VEGFR 过表达, 以及 PDGF-PDGFR、RB、PI3K/AKT、Notch、JAK-STAT、MAPK、Wnt/ $\beta$ -catenin、BMPs-Smads 信号通路等分子基因水平的改变与胶质瘤发生、发展相关联, 并相互之间存在着错综复杂的串话机制(cross talking), 对脑胶质瘤的发展起到正调控或负调控的作用。所以, 单独研究一个基因在癌症发生、发展过程的研究, 都具有一定的局限性。为了突破以往研究的局限, 研究 BMP 受体(bone morphogenetic proteins receptor, BMPR) I a 与胶质瘤发生、发展的相关性。对胶质瘤防治、预后提出了新的问题, 也为胶质瘤的治疗提供了一种可能途径。为此, 本研究在检测了脑胶质瘤中 BMPR I a 上应用逆转录-聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)技术和免疫组织化学染色技术(streptavidin-biotin complex, SABC 法), 检测 BMPs/BMPR/Smads 通路中关键分子的 mRNA 及其蛋白在正常脑组织和脑胶质瘤

组织中的表达, 探讨其在脑胶质瘤组织中的表达及其与脑胶质瘤临床分级的关系。从分子水平研究胶质瘤, 发现可能用于诊断和治疗的靶基因是一件非常有意义的工作。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集本院脑外科 2009 年 1 月至 2010 年 11 月手术切除的新鲜人脑胶质瘤标本 40 份, 患者年龄 17~64 岁, 其中, 男 26 例, 女 14 例。患者均为第 1 次接受手术治疗, 且术前均未行任何放疗和化疗, 术后均经病理学切片证实为胶质瘤。按照世界卫生组织(WHO)脑肿瘤分类标准确定为 I 级胶质瘤 13 例, II 级胶质瘤 9 例, III 级胶质瘤 11 例, IV 级胶质瘤 7 例。另取脑外伤患者行内减压手术而取得的新鲜正常脑组织 20 例(已通过伦理学协会)作为对照组。从手术室取得的新鲜标本, 切取瘤体中心部位组织, 除部分留作常规病理诊断和免疫组织化学染色外, 其余组织用无 RNA 酶去离子水处理后置于液氮中保存、备用做 RT-PCR 检测。

**1.2 主要仪器与试剂** PCR 仪为美国 PE 公司产品。DNA marker、Taq DNA 聚合酶及一步法 RT-PCR 试剂盒均购于大连宝生物公司, cDNA 逆转录试剂盒为上海生工生物工程有限公司产品, 琼脂糖为 Oxoid 公司产品, Trizol 试剂盒为 Invitrogen 公司产品, DAB 显色剂购于北京中杉金桥公司, 一抗为兔

表 1 BMP I a RT-PCR 扩增引物

基因名称	引物序列	退火温度(℃)	产物长度(bp)
BMPR I a	上游引物:5'-CAT TGC TTT GCC ATC ATA GAA-3'	60	450
BMPR I a	下游引物:5'-AAT AGT TCG CTG AAC CAA TAA-3'		
GAPDH	上游引物:5'-ACC TGA CCT GCC GTC TAG AA-3'	62	247
GAPDH	下游引物:5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'		

抗人 BMPR I a 多克隆抗体羊抗兔 LG-HRP,二抗由博迈德公司生产,其他试剂均为国产分析纯。RNA 提取所用的实验耗材均经过无 RNA 酶去离子水处理,均为无 RNA 酶产品,由 Axygtn 公司生产。

**1.3 引物序列** 由 BMPR I a(GenBank Accession Number: NM\_004329.2)内参照 GAPDH(GenBank Accession Number: NM\_002046.3)基因序列,利用 Primer5.0 软件自行设计,进行特异性和惟一性分析后由北京三博远志生物技术有限责任公司 DNA 合成,其序列见表 1。

#### 1.4 RT-PCR

**1.4.1 提取总 RNA** 严格按照 Trizol 说明书进行操作,用紫外分光测定 RNA 浓度,并保证  $A_{260}/A_{280}$  比值  $\geq 1.8$ 。

**1.4.2 cDNA 的合成** 根据北京三博远志生物技术有限责任公司 DNA 合成报告单合成,本 Oligo DNA 是以  $OD_{260}$  为单位来计量的,是指在 1 mL 体积 1 cm 光程标准比色皿中,260 nm 波长下吸光度为  $1A_{260\text{nm}}$  的 Oligo 溶液定义为  $1OD_{260}$  单位。根据此定义,  $1OD_{260}$  单位相当于 33  $\mu\text{g}$  的 Oligo DNA,本公司提供的序列报告中分子量计算公式如下:  $MW = (A \text{ 碱基数} \times 312) + (G \text{ 碱基数} \times 288) + (T \text{ 碱基数} \times 303) - 61$ 。

**1.4.3 PCR 扩增** 取第一链 cDNA 2  $\mu\text{L}$ ,依次加入 10 pmol/L 下游引物各 2  $\mu\text{L}$ 、dNTP 4  $\mu\text{L}$ 、2 U/ $\mu\text{L}$  Taq 酶 1  $\mu\text{L}$ 、10 $\times$  PCR buffer 5  $\mu\text{L}$  后,再加入 36  $\mu\text{L}$  无 RNA 酶去离子水  $\text{H}_2\text{O}$ ,轻轻混匀构建 50  $\mu\text{L}$  扩增体系。反应条件为 95  $^\circ\text{C}$  预变性 5 min,94  $^\circ\text{C}$  1 min,55  $^\circ\text{C}$  40 s,72  $^\circ\text{C}$  50 s,进行 35 个循环,72  $^\circ\text{C}$  延伸 7 min。取 PCR 产物约 5  $\mu\text{L}$  用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,紫外透照下观察结果,并拍照。

**1.4.4 PCR 产物半定量分析** 以 PCR 产物量作为衡量相应基因表达水平的指标。将电泳凝胶置于 Gel Doc2000 凝胶图像分析系统进行灰度体积积分分析,以各自内参照的灰度值为参照,每张图片的每个指标重复 6 次进行灰度体积积分测定,取其平均值来反映 mRNA 的表达水平。

#### 1.5 免疫组织化学染色分析

**1.5.1 免疫组织化学反应** 所有反应均在湿盒中进行。将石

蜡切片常规脱蜡入水后,用 pH6.0 柠檬酸缓冲液煮沸法进行抗原修复,0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  消除内源性过氧化氢酶,10% BSA 室温封闭,滴加稀释后的第一抗体(1:100)置湿盒中 4  $^\circ\text{C}$  过夜,空白对照用等量的 PBS 替代一抗,次日滴加生物素过氧化物酶复合物,室温孵育 1 h;用含 0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  的 DAB 液显色 5 min 左右终止反应,室温下光镜监视其显色;镜检。

**1.5.2 结果判断** 镜下观察各组进行免疫组织化学反应的标本,以细胞质内出现清晰可见的棕黄色或棕色颗粒为免疫组织化学阳性信号,记为表达相应蛋白的阳性细胞。按照文献[2]报道的人工计数法,每张标本于高倍镜( $\times 400$ )下随机选取 10 个互不重叠的视野,统计阳性细胞百分率即阳性细胞占同类细胞的百分比,以阳性细胞百分率大于或等于 10% 者为阳性表达,阳性细胞百分率小于 10% 为阴性表达。部分切片其染色呈现为棕黄色染色连成片状不易鉴别者,阳性细胞百分率计算方法为:(高倍镜下棕黄色染色面积/该高倍镜视野总面积) $\times 100\%$ 。最后再计算每组标本的总体阳性率( $\%$ )=(本组阳性标本总数/本组标本总数) $\times 100\%$ 。

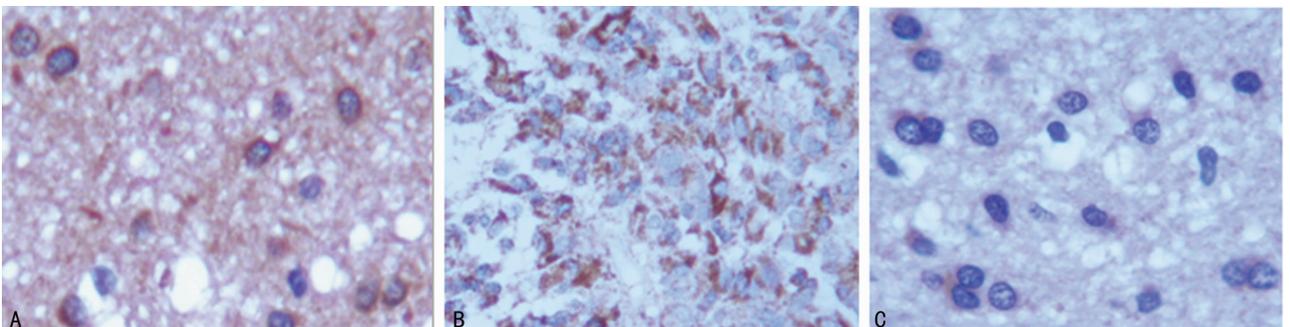
**1.6 统计学处理** 采用 SPSS17.0 统计软件对检测结果进行统计分析,对相关数据采用  $\chi^2$  或  $t$  检验进行比较分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 BMPR I a 的表达及其与脑胶质瘤临床分级的关系** 对 BMPR I a 进行 RT-PCR 扩增,BMPR I a mRNA 的表达显著高于正常脑组织( $P < 0.05$ ),并以 III、IV 级显著高于 I、II 级( $P < 0.05$ )。

免疫组织化学染色结果显示,BMPR I a 蛋白质表达主要定位于正常脑组织和脑胶质瘤细胞的细胞质中,呈弥散分布的棕色或棕黄色颗粒,强弱不等。BMPR I a 蛋白的表达显著低于正常脑组织( $P < 0.01$ ),并以 III、IV 级显著低于 I、II 级( $P < 0.05$ )。

**2.2 BMPR I a mRNA 和蛋白的表达在不同年龄组及不同性别组患者间比较** 见图 1 和表 2、3。



A: 正常脑组织(BMPR I a); B: II 期胶质瘤组织(BMPR I a); C: IV 期胶质瘤组织(BMPR I a)。

图 1 BMPR I a 蛋白在正常脑组织和脑胶质瘤组织中的表达(IHC 法,  $\times 200$ )

**表 2 BMPR I a mRNA 在正常脑组织和脑胶质瘤组织中的表达( $\bar{x}\pm s$ ,灰度值)**

组别	n	BMPR I a mRNA	t	P
正常脑组织	20	0.395±0.101	-3.511	0.001
胶质瘤组织	40	0.513±0.132		
年龄(岁)				
≤50	31	0.438±0.102	-0.379	0.707
>50	9	0.453±0.114		
性别				
男	26	0.476±0.108	1.297	0.203
女	14	0.431±0.098		
分级				
I~II级	22	0.334±0.131	-2.461	0.019
III~IV级	18	0.427±0.102		

**表 3 BMPR I a 蛋白在正常脑组织和脑胶质瘤组织中的表达**

组别	n	BMPR I a mRNA(%)	$\chi^2$	P
正常脑组织	20	75.00	12.251	0.000
胶质瘤组织	40	27.50		
年龄(岁)				
≤50	31	25.81	0.198	0.656
>50	9	33.33		
性别				
男	26	23.08	0.792	0.393
女	14	35.71		
分级				
I~II级	22	40.91	4.409	0.036
III~IV级	18	11.11		

**3 讨 论**

作为细胞质的细胞因子,BMPs 依靠与 BMPR 结合后才能向细胞内传递信息,并作为 TGF-β 超家族的重要成员,其受体也主要分为 I 型受体和 II 型受体(BMPR II),并结构和功能上与 TGF-β 超家族的 I、II 型受体具有同源性[4]。目前已知,BMPR I 型受体又分为 BMPR-I a/ALK-3、BMPR I b/ALK-6、ALK-2 共 3 种亚型,它们和 BMPR II 受体都是一种跨膜型蛋白,结构也十分相似[5-6],它们的胞外段都很短,胞内区具有丝氨酸酶、苏氨酸酶的活性。BMPR I 胞内区的近膜部分(N 末端)的丝氨酸、甘氨酸(GS)结构域高度保守,是活化的起始部位;BMPR II 较 BMPR I 大,胞内羧基端(C 末端)富含苏氨酸和丝氨酸[7]。由于 BMPs 在结构和特性上都与 TGF-β 和激活素等有所区别,其受体也存在一定的差别。虽然 BMPR I a、BMPR I b 及 BMPR II 都可以单独与 BMPs 结合,但各自与 BMP 的亲合力很弱,所以均不能单独介导信号传递。BMPR II 型受体属于结构活性型受体,与配体结合后可发生自身磷酸化而被自身激活,活化后 BMPR II 型受体进一步磷酸化 BMPR I 型受体保守区的丝/苏氨酸残基从而激活 BMPR I 型受体,从而完成 BMPs 受体的激活和受体复合物形成。因此,两

型受体均为 BMPs 信号转导所必需。在无 BMPR I 时,BMPR II 可以与 BMPs 配体结合,但却不能传导信号;BMPR I a 及 BMPR I b 的磷酸化依赖于下游的 BMPR II,在无 BMPR II 时,BMPR I a 及 BMPR I b 不能与 BMPs 结合,其激酶保持在非活化状态。当 BMPs 与 BMPR II 结合时,BMPR II 会将 BMPR I a 和 BMPR I b 细胞膜下部的甘氨酸结构域磷酸化,然后 BMPR I a 和 BMPR I b 与两分子 BMPR II 形成与 BMPs 有高亲和力的四聚体,而使 BMPR I a 和 BMPR I b 的激酶也被活化。活化的 BMPR I a 和 BMPR I b 可将细胞质内的 Smad-1、5、8 的 MH2 结构域磷酸化,结合成二聚体进入核内调控下游靶基因的表达,进而改变细胞的生物学特性。根据配体的不同,3 种亚型的 BMPR I 受体与 BMPR II 型受体的作用能力不同,所形成的相应的受体复合物的信号传导能力也不同[8]。一般认为[9],BMPR I 特别是 BMPR I a 可以和稍过量的配体结合而在信号转导中起主要作用,而 BMPR II 与配体的结合则是特异性的,表明受体与配体结合的特异性主要取决于 BMPR II。

目前,针对 BMPR I b 在肿瘤细胞中的研究较多,但对 BMPR-I a 和 BMPR-II 的研究很少。已有研究表明[10],在前列腺癌细胞中,BMPR I b 可传递生长抑制信号。刘爽[11]的研究结果显示,BMPR I b 的 mRNA 在大部分恶性胶质瘤中处于低表达状态,并通过体外培养的 U251 细胞瞬时转染 BMPR I b 基因后,观察到过表达 BMPR I b 可活化 BMPs 信号通路而诱导瘤细胞的分化和凋亡,并观察到 BMP-II 可以时间依赖方式引起瘤细胞的增殖抑制和分化,使 BMPR I b 表达的上调。

本研究显示,与正常脑组织相比,脑胶质瘤组织中 BMPR I a 受体的 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低( $P<0.01$ ),并在 III、IV 级与 I、II 级之间差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见图 1 和表 2、3。本研究结果和结论与刘爽[11]的研究结果并不完全相同,相同之处在于 BMP-2 在表达水平的降低趋势上与其结论相似,但 BMP-2 并未引起 BMPR I b 表达的上调。结合已存在有争议的研究,作者分析,BMPs 可能对脑组织细胞中的作用具有“双向性”,并认为其可能的作用模式是:在正常脑组织细胞中,BMPs 处于低表达状态,与 BMPR I a、BMPR I b、BMPR II 结合后,通过下游的 Smads 构成一条完整的细胞信号转导通路,对神经细胞和神经胶质细胞起抑制增殖和促进分化的作用;而在脑胶质瘤发生和进展过程中,可能是因为 BMPR I a、BMPR I b、BMPR II 3 种受体的表达降低,一方面直接使胶质瘤细胞失去了 BMP-2 和 BMP-4 对瘤细胞的增殖抑制和促进分化的作用;另一方面,还可能因此使 BMP-2 和 BMP-4 的反馈性分泌增加,增加后的 BMP-2 和 BMP-4 通过其他信号转导机制促进了癌细胞的增殖和生长,并且,根据各种受体在不同组织中的分布不同,BMP-2 和 BMP-4 有可能在不同组织来源的肿瘤细胞的作用效果是不同的。

**参考文献:**

[1] 杨涛,张熙,周乐,等. p57kip2 和 p21cip1 在人脑胶质瘤中的表达和临床意义[J]. 西安交通大学学报:医学版,2008,29(5):562-565.  
 [2] 张丽英,李青,陈广生,等. 真核表达载体 pIRES2-EGFP-Axin 的构建及其在神经胶质瘤细胞内的表达[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2005,4(8):408-410. (下转第 3010 页)

活,其中补体 C3、C4 可反映机体补体水平,代表机体免疫功能状态<sup>[2,8]</sup>。补体系统激活时,补体各成分按照一定的顺序出现连锁酶促反应;其中,C3 参与经典途径的激活,而 C4 则在经典及旁路途径中都起作用<sup>[3-5]</sup>。以往的研究表明,术后疼痛能激活补体系统,通过补体的消耗,从而抑制机体的免疫功能<sup>[2,8-10]</sup>。本研究中,直肠癌术后患者血清补体 C3、C4 水平在术后 4、8、12、24、48 h 明显降低,说明手术创伤和术后疼痛能通过激活补体的经典和旁路途径,消耗血清中的 C3、C4,从而抑制机体的免疫功能。术后 72 h 后患者血清 C3、C4 水平逐渐恢复至术前水平,其原因可能是患者对于手术所致的应激反应下降,并逐渐适应了手术所致的疼痛,使补体消耗减少,机体免疫功能逐渐恢复至术前水平。

以往的文献中,术后疼痛患者 VAS 的较高评分往往对应着血清补体 C3、C4 水平降低<sup>[9-10]</sup>。本研究中,患者的 VAS 最高值与血清补体 C3、C4 水平的最低值均出现在术后 4 h,并且伴随着 VAS 评分的下降,血清补体 C3、C4 水平逐渐增高。术后 120 h,患者的 VAS 评分与血清补体 C3、C4 均恢复至术前水平。对患者的 VAS 分值与血清补体 C3、C4 水平进行 Pearson 相关分析,结果发现,VAS 分值与血清补体 C3、C4 水平均呈明显负相关。结果表明,患者术后疼痛的程度与血清补体 C3、C4 水平具有一定的相关性;随着患者 VAS 分值的降低,血清 C3、C4 水平逐渐升高。

综上所述,术后疼痛能通过激活补体的经典和旁路途径,消耗血清中的 C3、C4,从而抑制机体的免疫功能。

#### 参考文献:

[1] Viscusi ER, Schechter LN. Patient-controlled analgesia: Finding a balance between cost and comfort[J]. *Am J Health Syst Pharm*, 2006, 63(8 Suppl 1): S3-13, quiz S15-16.

(上接第 3007 页)

[3] Amos S, Redpath GT, Polar G, et al. Farnesylthiosialic acid induces caspase activation and apoptosis in glioblastoma cells[J]. *Cell Death Differ*, 2006, 13(4): 642-651.

[4] 那键, 孙大辉, 谷贵山, 等. 骨形态发生蛋白的细胞内信息传导机制[J]. *中国老年学杂志*, 2008, 28(24): 2512-2514.

[5] Schmitt JM, Hwang K, Winn SR, et al. Bone morphogenetic proteins: an update on basic biology and clinical relevance[J]. *J Orthop Res*, 1999, 17(2): 269-278.

[6] Aström AK, Jin D, Imamura T, et al. Chromosomal location of three human genes encoding bone morphogenetic protein receptors[J]. *Mamm Genome*, 1999, 10(3): 299-302.

[7] Sakou T. Bone morphogenetic proteins: from basic studies

[2] 林桂芳. 应激反应的调节与控制[J]. *中华麻醉学杂志*, 1998, 18(7): 445-447.

[3] Monsinjon T, Gasque P, Chan P, et al. Regulation by complement C3a and C5a anaphylatoxins of cytokine production in human umbilical vein endothelial cells[J]. *FASEB J*, 2003, 17(9): 1003-1014.

[4] Guo RF, Ward PA. Role of C5 a in inflammatory responses[J]. *Annu Rev Immunol*, 2005, 23(4): 821-852.

[5] Li M, Peake P, Charlesworth J, et al. Complement activation contributes to leukocyte recruitment and neuropathic pain following peripheral nerve injury in rats[J]. *Eur J Neurosci*, 2007, 26(12): 3486-3500.

[6] Griffin RS, Costigan M, Brenner GJ, et al. Complement induction in spinal cord microglia results in anaphylatoxin C5a-mediated pain hypersensitivity[J]. *Neurosci*, 2007, 27(32): 8699-8708.

[7] 刘俊杰, 赵俊. 现代麻醉学[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1997: 310-311.

[8] Bonifati DM, Kishore U. Role of complement in neurodegeneration and neuroinflammation [J]. *Mol Immunol*, 2007, 44(7): 999-1010.

[9] 王太, 张小平. 上腹部手术后患者自控镇痛对血浆补体 C3、C4 水平的影响[J]. *中华麻醉学杂志*, 2006, 26(6): 574-575.

[10] 陈理建, 梁慧英, 林锋. 下腹部手术后自控镇痛对血清补体 C3、C4 和 C-反应蛋白的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2007, 16(13): 1746-1747.

(收稿日期: 2014-01-06 修回日期: 2014-03-10)

to clinical approaches[J]. *Bone*, 1998, 22(6): 591-603.

[8] Rosenzweg BL, Imamura T, Okadome T, et al. Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins[J]. *Proc Natl Sci USA*, 1995, 92(6): 7632-7636.

[9] 宋兴贤. 骨形态发生蛋白的基础研究及临床应用[J]. *现代医药卫生*, 2007, 23(7): 1003-1004.

[10] Ide H, Yoshida T, Matsumoto N, et al. Growth regulation of human prostate cancer cells by bone morphogenetic protein-2[J]. *Cancer Res*, 1997, 57(22): 5022-5027.

[11] 刘爽. 胶质瘤中 BMPs/Smad1 信号路径的表达及功能研究[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2007.

(收稿日期: 2014-01-27 修回日期: 2014-03-20)

欢迎投稿

欢迎订阅