

Research on the Prevention and Treatment Effects of *Bletilla striata* Polysaccharide on Subacute Injury Induced by Repeated Exposure to PM2.5 in Mice

Yingzhi Shen¹, Yue Yao¹, Xinghong Ding², Fusheng Jiang³, Lixia Jin¹, Meiya Li², Fangmei Zhou^{1*}

¹College of Medical Technology, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou Zhejiang

²College of Life Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou Zhejiang

³College of Basic Medicine, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou Zhejiang

Email: 562612561@qq.com, *zfm1213@163.com

Received: Oct. 24th, 2018; accepted: Nov. 7th, 2018; published: Nov. 15th, 2018

Abstract

Objective: To investigate the preventive and therapeutic effects of *Bletilla striata* polysaccharide on subacute injury induced by PM2.5 in mice. **Methods:** The 96 male ICR mice were randomly divided into normal group, model group, protective group of *Bletilla striata* polysaccharide, treatment group of *Bletilla striata* polysaccharide. *Bletilla striata* polysaccharide groups were set low, medium and high dose. The model of subacute pulmonary injury in mice was established by instilling PM2.5 suspension in tracheal. Protective group and treatment group were gavaged the different doses of *Bletilla striata* polysaccharide solution before and after the PM2.5 contamination, lasting for one week. The levels of EOS, NEUT, MONO in peripheral blood of mice were detected by automatic hematology analyzer. The changes of lung, heart and spleen coefficient were calculated and compared. The pathological changes of lung tissue were observed with optical microscope. The levels of TNF- α , IFN- γ , MCP-1, IL-6, IL-10 and IL-12 in BALF were detected by CBA. **Results:** The pulmonary and splenic coefficients of model group increased significantly. To some extent, the expressions of six cytokines in BALF increased and the secretion of EOS, NEUT and MONO in peripheral blood increased as well, the differences were significant ($P < 0.01$). Both protective group and treatment group could ease inflammatory infiltration of lung tissue in mice, regulate the coefficients of lung, heart and spleen tending to the normal level, inhibit the over-expressions of immune factors in BALF and relieve the local to systemic inflammation reaction caused by blood circulation, compared with the model group ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$). **Conclusion:** *Bletilla striata* polysaccharide can prevent and treat PM2.5-interrelated diseases effectively, which is related to the reduction of inflammation and immune damage, indicating that Chinese medicine anti-smog technology has a good prospect.

Keywords

Bletilla striata Polysaccharide, PM2.5, Subacute Injury, Prevention and Treatment Effects

*通讯作者。

文章引用: 沈颖芝, 姚玥, 丁兴红, 蒋福升, 金丽霞, 李美芽, 周芳美. 白及多糖对 PM2.5 致小鼠亚急性损伤的防治作用研究[J]. 药物资讯, 2018, 7(6): 144-151. DOI: 10.12677/pi.2018.76024

白及多糖对PM2.5致小鼠亚急性损伤的防治作用研究

沈颖芝¹, 姚 玥¹, 丁兴红², 蒋福升³, 金丽霞¹, 李美芽², 周芳美^{1*}

¹浙江中医药大学医学技术学院, 浙江 杭州

²浙江中医药大学基础医学院, 浙江 杭州

³浙江中医药大学生命科学院, 浙江 杭州

Email: 562612561@qq.com, *zfm1213@163.com

收稿日期: 2018年10月24日; 录用日期: 2018年11月7日; 发布日期: 2018年11月15日

摘 要

目的: 探讨白及多糖对PM2.5致小鼠亚急性损伤的防治作用。方法: 96只雄性ICR小鼠随机均分为正常组、模型组、白及多糖预保护组、白及多糖治疗组, 白及多糖另设低、中、高剂量。采用气管滴注PM2.5悬液的方法建立小鼠亚急性肺损伤模型。预保护组和治疗组分别于造模前后灌胃不同剂量的白及多糖溶液, 均持续1周。全自动血细胞分析仪检测小鼠外周血中嗜酸性粒细胞(EOS)、中性粒细胞(NEUT)、单核细胞(MONO)含量; 计算比较肺、心脏、脾脏系数变化; 光镜下观察小鼠肺组织病理学变化; 采用CBA法检测小鼠肺泡灌洗液(BALF)中TNF- α 、IFN- γ 、MCP-1、IL-6、IL-10、IL-12水平。结果: 模型组小鼠全肺系数和脾系数明显升高, BALF中六种细胞因子表达不同程度增强, 外周血中EOS、NEUT、MONO分泌增加, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。白及多糖预保护组和治疗组均能改善小鼠肺组织炎症浸润, 调节肺、心脏、脾脏系数趋于正常水平, 抑制BALF中免疫因子过度表达, 缓解由局部经血液循环引发的全身炎症反应, 与模型组比较差异有统计学意义(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。结论: 白及多糖能够有效预防和治疗PM2.5相关疾病, 与减轻炎症和免疫损伤有关, 显示白及抗雾霾具有良好的发展前景。

关键词

白及多糖, PM2.5, 亚急性损伤, 防治作用

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

随着工业化和城市化进程加快, 由煤炭燃烧、汽车尾气排放等因素导致的大气污染严重影响人类健康, 其中以细颗粒物(PM2.5)危害性最强[1], 易引起系统性炎症反应, 造成呼吸系统、心血管系统、神经系统、生殖系统等多方面病变[2], 甚至诱发癌症。因此, 寻找有效防治雾霾的途径迫在眉睫。

中医倡导“正气存内, 邪不可干”和“治未病”, 强调“正气胜邪, 祛邪外出方可平衡阴阳; 或未病先治以明摄生”, 由此提出的“中药抗雾霾法”已经成为健康领域新的研究热点。传统中药白及 *Bletilla striata* (Thunb.) Reiehb.f.盛产于云南、浙江、湖北、贵州等地, 能够止血、消肿、生肌、抗炎、抑菌、镇

痛等[3], 主治肺伤咳血、肺结核和矽肺, 极具药用价值。在中医理论指导下, 本研究探讨白及多糖对 PM_{2.5} 所致亚急性损伤的防治作用和机制, 旨在为中药抗雾霾研究提供科学实验依据, 并可望今后应用于环境污染相关疾病的防治, 具有十分重要的现实意义。

2. 材料

2.1. 动物

SPF 级健康成年雄性 ICR 小鼠, 体重 20~25 g, 购于上海斯莱克实验动物有限责任公司提供(许可证号: SCXK(沪)2012-000), 饲养于浙江中医药大学动物实验研究中心, 且本研究获得浙江中医药大学实验动物伦理委员会批准。小鼠自由摄食饮水, 适应性喂养 7 d 后进入实验阶段。

2.2. 药材

白及干燥块茎切片由浙江恩睿生物科技有限公司提供, 经浙江中医药大学丁志山教授鉴定为紫花药用白及块茎。

2.3. 试剂与仪器

IL-10 试剂盒、IL-12 试剂盒、MCP-1 试剂盒、TNF- α 试剂盒、IL-6 试剂盒、IFN- γ 试剂盒(均由上海信帆生物科技有限公司提供, 批号 20160925019), BCA 蛋白定量试剂盒(康为世纪生物科技有限公司), 石英膜(GE Healthcare 公司), ECLIPSE Ti-DH 荧光倒置显微镜(日本 Nikon 公司), DS-580i 全自动血细胞分析仪(华创普惠医疗器械有限公司), 大流量大气颗粒物采样器(青岛聚创环保设备有限公司), 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

3. 方法

3.1. 白及多糖制备与纯化

干燥白及块茎切片粉碎过 60 目筛。准确称取, 按照物料比 1:30, 加入蒸馏水冷凝回流提取 2 次, 每次 1.5 h, 过滤, 合并滤液, 减压浓缩, 缓慢加入 3 倍量 95%乙醇, 沉淀, 4℃静置过夜, 4200 r/min 离心 15 min, 得白及粗多糖。采用 Sevag 法[4]去蛋白, 冷冻干燥, 称重, -20℃储存备用。

3.2. PM_{2.5} 采样与处理

2017 年 10 月至同年 11 月, 在浙江中医药大学经大流量大气颗粒物采样器采用石英膜采样 PM_{2.5}。将富载 PM_{2.5} 细颗粒物的滤膜裁剪成 1 × 1 cm 大小, 浸入超纯水, 避光超声 40 min × 2 次, 摇床 200 r/min 洗脱样品 16 h。2 次洗脱液经 6 层无菌纱布过滤, 滤液真空冷冻干燥得 PM_{2.5} 颗粒, 称重, -80℃避光储存备用。用生理盐水配成浓度 5 mg/mL 的 PM_{2.5} 悬液, 超声 20 min, 高温灭菌, 4℃保存, 临用前充分混匀即可。

3.3. 动物分组与给药

SPF 级雄性 ICR 小鼠随机分成 8 组(n = 12)。给药剂量分为 3 组: 低剂量组, 50 mg/(kg·BW); 中剂量组, 200 mg/(kg·BW); 高剂量组, 400 mg/(kg·BW), 上述药物剂量在实验室前期研究基础的指导下, 通过预实验测试计算不同剂量小鼠的半数致死量得以确定。实验中另设预保护组、治疗组、正常对照组和模型对照组: 预保护组于造模前灌胃相应剂量的白及多糖溶液, 连续 7 d; 治疗组于造模期间和造模后连续灌胃相应剂量的白及多糖溶液, 共计 7 d; 正常对照组和模型对照组均相应灌胃生理盐水进行对照。

3.4. PM2.5 染毒

采用气管滴注法染毒。用 10%水合氯醛麻醉小鼠后,用丝线挂住小鼠门牙将其悬挂在木板上(倾角约 60°),用拇指、食指轻轻顺向拉出舌头;透射灯对准动物颈部打开光源;用咽拭子轻轻将咽部分泌物擦净;手持套管针通过声门裂后,将动物垂直位,套管针顺势下插至阻力大停止;此时若成功插入气道,事先注入带有静脉留置针的 PVC 软管内的 PM2.5 悬液会随着呼吸左右波动,以此确认插管成功。迅速从气道拔出套管针,关闭光源,悬挂约 5~10 s 后将小鼠放下侧卧位放置,待麻醉苏醒后放回鼠笼。单次滴注剂量为 1.6 mL/(kg·BW),隔天染毒,共计 4 次。

3.5. 指标检测

3.5.1. 血细胞计数

10%水合氯醛麻醉小鼠后摘眼球取血,血液流入 EDTA 抗凝管,即可颠倒混匀试管。经全自动血细胞分析仪对嗜酸性粒细胞(EOS)、中性粒细胞(NEUT)、单核细胞(MONO)进行计数分析。

3.5.2. 脏器系数测定

脱颈处死小鼠,解剖取肺、心脏、脾脏,生理盐水快速洗去血迹,滤纸吸干,称重,利用公式计算。

$$\text{脏器重量系数/\%} = \text{脏器重量/体重(禁食后)} * 100 \quad (1)$$

3.5.3. 肺组织病理学改变

取肺,4%甲醛固定,乙醇脱水,二甲苯透明、浸蜡,石蜡包埋,切片,经 HE 染色后中性树胶封片,倒置显微镜下观察各组小鼠肺组织结构形态改变。

3.5.4. 肺泡灌洗液(BALF)提取与指标分析

解剖小鼠暴露气管,用止血钳夹闭主气管近喉端,缓慢注入 0.5 mL 生理盐水,然后缓慢抽出灌洗液,操作同时轻按胸部以提高洗出率。如上反复灌洗 3 次,得肺泡灌洗液。经 4℃、3000 r·min⁻¹ 离心 15 min,加入细胞裂解液后 4℃ 静置 30 min,再于 4℃、1200 r·min⁻¹ 离心 30 min,取上清液。按照试剂盒说明书,采用流式液相多重蛋白定量技术(CBA 法)检测肺泡灌洗液中 TNF- α 、IFN- γ 、MCP-1、IL-6、IL-10、IL-12 的表达水平。

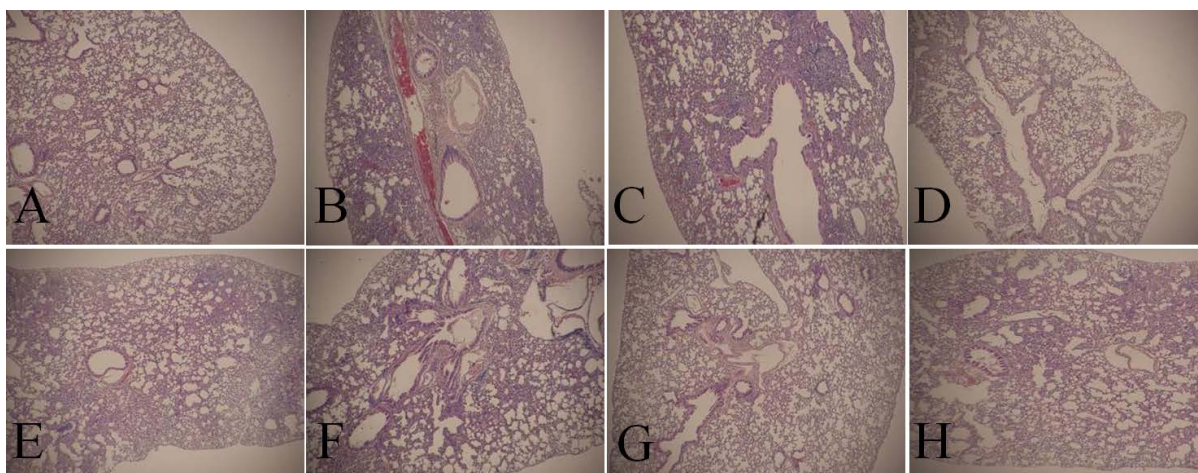
3.6. 统计学处理

采用 Graph Pad Prism 5.0 和 SPSS 19.0 统计软件进行实验数据分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 One-way ANOVA 比较多组间差异,采用 One-way ANOVA 和 LSD 检验方法分析组间差异,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

4. 结果

4.1. 肺组织病理学改变

经 HE 染色后光镜观察,结果如图 1 所示:正常组小鼠肺组织仅少量炎性细胞浸润,肺泡结构完整,分布均匀,肺泡腔内无渗出物,肺泡间隔正常,小支气管壁结构较完整。模型组小鼠肺组织出现大量炎性细胞,小支气管部分损伤,支气管肿胀,肺泡发生断裂、融合,肺泡腔增大,间隔增厚,伴有明显出血、渗出现象。白及多糖组小鼠肺组织炎性浸润明显改善,肺泡结构较完整,支气管黏膜和支气管壁较完整,出血、渗出减少。中、高剂量白及多糖的疗效优于低剂量,预保护组小鼠的改善情况优于治疗组。见图 1。



注: A.正常组; B.模型组; C.低浓度预保护组; D.中浓度预保护组; E.高浓度预保护组; F.低浓度治疗组; G.中浓度治疗组; H.高浓度预治疗组

Figure 1. The pathohistological changes of lung tissues in mice

图 1. 小鼠肺组织病理切片($\times 40$)

4.2. 对小鼠全肺、心、脾系数的影响

与正常组比较, PM_{2.5} 染毒后小鼠的全肺系数和脾脏系数明显升高, 但心脏系数下降, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较, 不同浓度的白及多糖组小鼠的全肺、心脏、脾脏系数均不同程度下降, 其中中剂量的白及多糖对小鼠脏体比的影响最明显, 差异有统计学意义($*P < 0.05$, $**P < 0.01$)。见表 1。

Table 1. The results of whole lung, heart and spleen coefficients in mice

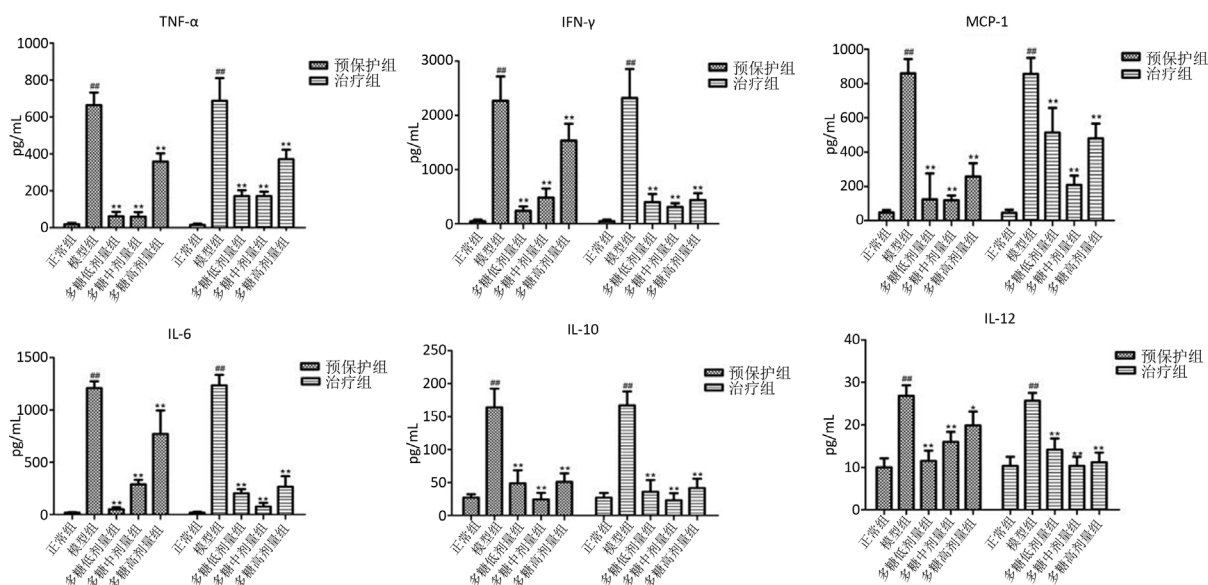
表 1. 小鼠全肺、心脏、脾脏系数测定结果比较/ $n = 6$, $\bar{x} \pm s$, %

| 组别 | 全肺系数 | 心脏系数 | 脾脏系数 |
|---------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 正常组 | 0.61 ± 0.07 | 0.68 ± 0.06 | 0.35 ± 0.02 |
| 模型组 | $1.35 \pm 0.14^{###}$ | $0.62 \pm 0.08^{###}$ | $0.52 \pm 0.04^{###}$ |
| 预保护低剂量组 | $1.18 \pm 0.10^{**}$ | $0.55 \pm 0.03^{**}$ | $0.37 \pm 0.03^{**}$ |
| 预保护中剂量组 | $1.15 \pm 0.08^{**}$ | $0.54 \pm 0.06^{**}$ | $0.36 \pm 0.03^{**}$ |
| 预保护高剂量组 | 1.25 ± 0.10 | $0.60 \pm 0.12^*$ | $0.37 \pm 0.03^*$ |
| 治疗低剂量组 | $1.17 \pm 0.06^{**}$ | $0.59 \pm 0.07^{**}$ | $0.37 \pm 0.03^*$ |
| 治疗中剂量组 | $1.08 \pm 0.06^{**}$ | $0.61 \pm 0.08^*$ | $0.34 \pm 0.03^{**}$ |
| 治疗高剂量组 | $1.16 \pm 0.07^{**}$ | 0.58 ± 0.07 | $0.39 \pm 0.03^{**}$ |

注: 与正常组比较, $^{###}$: $*P < 0.01$; 与模型组比较, * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$ 。

4.3. 对肺泡灌洗液(BALF)中免疫指标的影响

PM_{2.5} 染毒后肺泡灌洗液中 TNF- α 、IFN- γ 、MCP-1、IL-6、IL-10、IL-12 含量增加, 模型组与正常组比较存在显著性差异($P < 0.01$)。造模前后灌胃不同剂量的白及多糖溶液, 均使上述细胞因子表达水平降低。预保护组中、低剂量和治疗组中剂量的白及多糖抑制效果最明显, 各组表现出一定的剂量-反应关系。六因子中 TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 表达更敏感。各剂量白及多糖组与模型组相比, 均在统计学上存在显著差异($*P < 0.05$, $**P < 0.01$)。见图 2。



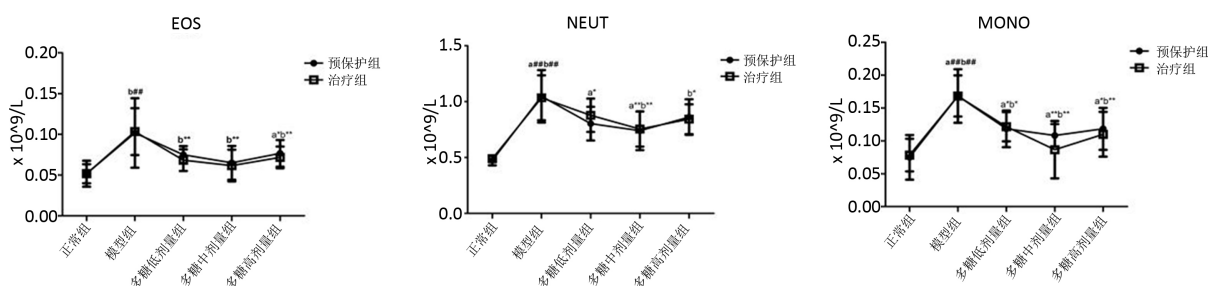
注: 与正常组比较, $###$: $P < 0.01$; 与模型组比较, $*$: $P < 0.05$, $**$: $P < 0.01$ 。

Figure 2. The levels of inflammatory cytokines in BALF of mice

图 2. 小鼠肺泡灌洗液中细胞因子改变

4.4. 血细胞计数结果

PM_{2.5} 染毒诱发炎症反应, 与正常组比较, 模型组小鼠血液中的嗜酸性粒细胞(EOS)、中性粒细胞(NEUT)、单核细胞(MONO)含量明显增加, 两组计数差异存在统计学意义($P < 0.01$)。低、中、高剂量白及多糖干预后, 炎性细胞均减少, 其中中剂量组细胞计数下降最显著($*P < 0.05$, $**P < 0.01$)。见图 3。



注: 与正常组比较, $###$: $P < 0.01$; 与模型组比较, $*$: $P < 0.05$, $**$: $P < 0.01$ (a: 预保护组; b: 治疗组)。

Figure 3. Blood cell counting of mice

图 3. 血细胞计数

5. 结论

大气细颗粒物 PM_{2.5} 污染严重影响人类生活生产, 威胁机体健康, 对肺、心脏、肝脏、脑等均产生不同程度的毒效应[5] [6] [7] [8]。某研究显示, 虽然我国以煤烟主导的大气污染模式正逐步向煤-油复合型转变, 但目前煤炭污染仍较为严重, 在燃油、燃煤、冶金、烟尘、交通、建筑六种主要污染源中, 燃煤源在 PM_{2.5} 组分中占比最大[9]。炎症反应是自身免疫系统主动抵御外界刺激并及时修复炎性损伤的一种防治措施[10]。PM_{2.5} 通过活化炎症细胞, 调节炎症因子释放及其与细胞因子的相互作用[11], 如 PM_{2.5} 刺激能够导致 TNF- α 、IL-6、IL-12 等炎性因子异常释放, 免疫调节紊乱, 并趋化嗜酸性粒细胞、中性粒细胞等过度表达引起炎症级联反应使局部损伤全身化[12], 促进局部和系统相关急慢性疾病的、发展。

同时机体促炎和抑炎反应相互影响,如 IL-10 能够抑制单核细胞分泌 IL-6、TNF- α 、IL-12、IFN- γ 等促炎因子[13],通过负反馈机制调控免疫系统动态平衡,减轻炎症损伤。

依据中医学“固本扶正”的思想,从病机入手,标本兼顾。相关研究表明,红景天能够抑制机体氧化应激,改善肺功能;参莲能够抵抗炎症,修复细胞损伤;冬虫夏草能够增强巨噬细胞的吞噬能力,促进 PM_{2.5} 超细颗粒物从肠道排出等[14][15][16]。现代药理研究亦表明,白及具有多脏俱补的扶正功效,尤在益气补肺[17],其多糖成分具有调节免疫、平衡炎症体系的作用[18],能够提高自身防御能力。本研究表明,不同浓度的白及多糖主要通过抑制局部和全身多系统炎症反应,进一步提高对 PM_{2.5} 致亚急性损伤的修复能力,具体表现在能够不同程度地减轻小鼠肺组织和气管的炎症浸润,选择性地改善肺、心、脾等脏器代偿性肥大,有效抑制小鼠肺泡灌洗液中 TNF- α 、IFN- γ 、MCP-1、IL-6、IL-10、IL-12 的表达,此外也参与调节外周血液循环中的炎症反应。另外关于药物具体的干预机制和相互影响,尚需深入探究。综上所述,本研究为中医从“正气存内,邪不可干”和“治未病”角度防治 PM_{2.5} 相关疾病提供新思路,加之多糖本身毒副作用少、生物活性广等特点,使白及多糖的开发研究极具应用前景和卫生学意义。

基金项目

国家自然科学基金资助(81673672, 81503329);浙江省中医药科技计划项目(2017ZZ005);中国博士后科学基金资助(2016M592022)。

参考文献

- [1] 秦玉英,刘颖,敬岳,等. PM_{2.5} 对呼吸系统的病理影响及中医药防治[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(10): 3477-3482.
- [2] 张少红,于少华. PM_{2.5} 的来源、危害及防治措施研究[J]. 环境科学与管理, 2014, 39(7): 92-94.
- [3] 汤逸飞,阮川芬,应晨,等. 白及属植物化学成分与药理作用研究进展[J]. 中草药, 2014, 45(19): 2864-2872.
- [4] 齐慧玲,魏绍云,王继伦,等. Sevag 法去除白及多糖中蛋白的研究[J]. 天津化工, 2000(3): 20-21.
- [5] 毛海霞,韩硃石,项文静,等. PM_{2.5} 对呼吸系统影响的相关研究进展[J]. 中华全科医学, 2015, 13(9): 1517-1519.
- [6] 袁凌珂,章明徐,朱娱,等. 不同浓度大气细颗粒污染物 PM_{2.5} 对心脏组织功能的影响[J]. 现代医药卫生, 2016, 32(19): 2942-2944.
- [7] Zheng, Z., Zhang, X.B., Wang, J.M., et al. (2015) Exposure to Fine Airborne Particulate Matters Induces Hepatic Fibrosis in Murine Models. *HHS Public Access*, **63**, 1397-1404.
- [8] 朱雨晴,李金泉,赵云,等. PM_{2.5} 对脑组织急性氧化损伤的影响研究[J]. 环境与健康杂志, 2016, 33(8): 679-682.
- [9] 王菲菲,王先良,刘芳盈,等. 燃煤 PM_{2.5} 不同组分对血管内皮细胞的氧化损伤效应[J]. 中国环境科学, 2014, 34(3): 780-785.
- [10] 全国辉,李煜,郑德胜,等. PM_{2.5} 通过激活 Nlrp3 炎症小体诱导小鼠肺炎反应[J]. 毒理学杂志, 2017, 31(3): 176-181.
- [11] Li, R.J., Kou, X.J., Xie, L.Z., et al. (2015) Effects of Ambient PM_{2.5} on Pathological Injury, Inflammation, Oxidative Stress, Metabolic Enzyme Activity, and Expression of c-fos and c-jun in Lungs of Rats. *Environmental Science and Pollution Research*, **22**, 20167-20176. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5222-z>
- [12] Liu, W., Zhang, M.J., Feng, J.Q., et al. (2017) The Influence of Quercetin on Maternal Immunity, Oxidative Stress, and Inflammation in Mice with Exposure of Fine Particulate Matter during Gestation. *Environmental Research and Public Health*, **14**, 592-608. <https://doi.org/10.3390/ijerph14060592>
- [13] Wang, H.T., Song, L.Y., Ju, W.H., et al. (2017) The Acute Airway Inflammation Induced by PM_{2.5} Exposure and the Treatment of Essential Oils in Balb/c Mice. *Scientific Reports*, **7**, Article Number: 44256. <https://doi.org/10.1038/srep44256>
- [14] 刘平安,莫阳,张国民,等. 红景天对细颗粒物 PM_{2.5} 所致急性肺损伤大鼠干预作用的研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2015, 35(7): 5-7.

- [15] 刘栩岑, 李玉洁, 王娅杰, 等. 参莲提取物对 PM2.5 染毒 RAW264.7 细胞损伤的保护作用[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(10): 1977-1983.
- [16] 劳乔聪, 孙岚, 张英鸽, 等. 冬虫夏草促进 PM2.5 超细颗粒物排出的作用和机制探讨[J]. 食品科技, 2017, 42(2): 67-71.
- [17] 郭琪, 孟焯, 赵阳, 等. 白及提取物对博莱霉素致大鼠肺纤维化的治疗作用[J]. 国际药学研究杂志, 2016, 43(3): 518-523.
- [18] Yue, L., Wang, W., Wang, Y., *et al.* (2016) *Bletilla striata* Polysaccharide Inhibits Angiotensin II-Induced ROS and Inflammation via NOX4 and TLR2 Pathways. *International Journal of Biological Macromolecules*, **89**, 376-388. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.05.002>

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2160-441X, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: pi@hanspub.org