

# NS-398对HGF诱导的肝癌细胞株MMP-7, MMP-9, TIMP-1表达的影响

殷积彬, 刘铁夫, 孟祥宁, 赵丽莉, 刘晓川

殷积彬, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化科 黑龙江省哈尔滨市 150086  
刘铁夫, 赵丽莉, 刘晓川, 哈尔滨医科大学附属第四医院消化科 黑龙江省哈尔滨市 150001  
孟祥宁, 哈尔滨医科大学遗传教研室 黑龙江省哈尔滨市 150086  
殷积彬, 1998年哈尔滨医科大学学士, 2003年哈尔滨医科大学附属第四医院消化科博士生, 主要从事肝胆疾病的诊断与治疗。  
通讯作者: 刘铁夫, 150001, 黑龙江省哈尔滨市, 黑龙江省哈尔滨医科大学附属第四医院消化科。TFLiu@mail.csoft.com.cn  
电话: 0451-82576696  
收稿日期: 2006-06-06 接受日期: 2006-06-30

## Effect of NS-398 on matrix metalloproteinase expression in hepatocyte growth factor-induced HepG2 cell line

Ji-Bin Yin, Tie-Fu Liu, Xiang-Ning Meng, Li-Li Zhao, Xiao-Chuan Liu

Ji-Bin Yin, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China  
Tie-Fu Liu, Li-Li Zhao, Xiao-Chuan Liu, Department of Gastroenterology, the Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China  
Xiang-Ning Meng, Department of Genetics, Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China  
Correspondence to: Tie-Fu Liu, Department of Gastroenterology, the Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China. TFLiu@mail.csoft.com.cn  
Received: 2006-06-06 Accepted: 2006-06-30

## Abstract

**AIM:** To investigate the effect of the selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor NS-398 on the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) in liver cancer cell line induced by hepatocyte growth factor (HGF), and to explore the possible mechanism of NS-398 in depressing tumor cell invasiveness.

**METHODS:** HGF-induced liver cancer cells HepG2 were treated with different concentrations of NS-398 (0, 20, 40, 60, 80  $\mu\text{mol/L}$ ). The

expression of MMP-7, MMP-9 and TIMP-1 inside the cells, the contents outside of the cells and the levels of mRNA were observed by immunohistochemistry staining, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), respectively.

**RESULTS:** After HepG2 cells were treated with NS-398 for 48 h, the expression of MMP-7, MMP-9 and TIMP-1 protein in the cells were decreased; the content of MMP-7 in the culture fluid was  $8.2 \pm 0.6$ ,  $5.8 \pm 0.8$ ,  $4.3 \pm 0.8$ ,  $2.7 \pm 0.4$ , and  $1.7 \pm 0.4$   $\mu\text{g/L}$ , respectively, as 0, 20, 40, 60, and 80  $\mu\text{mol/L}$  NS-398 was used; the relative level of MMP-7 mRNA in the cells was  $0.58 \pm 0.06$ ,  $0.42 \pm 0.03$ ,  $0.37 \pm 0.01$ ,  $0.36 \pm 0.01$ , and  $0.33 \pm 0.01$ , respectively; MMP-9 can not be detected in the culture fluid, but its relative mRNA level was  $0.32 \pm 0.02$ ,  $0.23 \pm 0.02$ ,  $0.21 \pm 0.01$ ,  $0.17 \pm 0.01$ , and  $0.13 \pm 0.01$ , respectively, in the cells; the content of TIMP-1 in the culture fluid was  $39.0 \pm 0.9$ ,  $29.5 \pm 2.8$ ,  $25.0 \pm 0.9$ ,  $16.8 \pm 0.4$ ,  $11.8 \pm 0.3$   $\mu\text{g/L}$  and its relative mRNA level in the cells was  $0.19 \pm 0.02$ ,  $0.17 \pm 0.02$ ,  $0.16 \pm 0.01$ ,  $0.13 \pm 0.01$ , and 0, respectively.

**CONCLUSION:** The selective COX-2 inhibitor can inhibit the gene transcription of MMP and TIMP, and lead to the imbalance of TIMP and MMP percentage, which is one of the possible mechanisms in reducing tumor cell invasive ability.

**Key Words:** Specific cyclooxygenase-2 inhibitor; Matrix metalloproteinase; Tissue inhibitor of metalloproteinase; Invasiveness; Liver cancer cell line

Yin JB, Liu TF, Meng XN, Zhao LL, Liu XC. Effect of NS-398 on matrix metalloproteinase expression in hepatocyte growth factor-induced HepG2 cell line. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(23):2301-2305

## 摘要

**目的:** 研究选择性COX-2抑制剂NS-398对肝癌细胞株MMP和TIMP表达的影响, 探讨选择

## ■背景资料

选择性COX-2抑制剂较多用于风湿性关节炎的镇痛和抗炎治疗, 效果很好。近些年研究发现, 其具有抑制肿瘤细胞的增殖、诱导其发生凋亡、改变细胞周期分布等作用, 并且这些作用不依赖于PGE<sub>2</sub>/COX-2的表达与否。

## ■相关报道

Abiru *et al*研究发现, 选择性COX-2抑制剂NS-398具有抑制肿瘤细胞增殖信号转导通路中的ERK1/2等酶的活化, 可能与选择性COX-2抑制剂的抗肿瘤作用直接相关。

性COX-2抑制剂降低肿瘤细胞侵袭力的机制。

**方法:** 以不同浓度的NS-398 (0, 20, 40, 60, 80  $\mu\text{mol/L}$ )作用于HGF诱导的HepG2细胞, 免疫组化法观察细胞中MMP-7, MMP-9, TIMP-1的蛋白质表达, ELISA法检测细胞外培养液中MMP-7, MMP-9, TIMP-1的含量, RT-PCR法分析3种蛋白酶的mRNA转录水平。

**结果:** NS-398作用细胞48 h后, 发现MMP-7, MMP-9, TIMP-1的蛋白质表达程度均下降, NS-398作用于HepG2细胞后, MMP-7在培养液中的含量和其在细胞内的mRNA相对水平分别为 $8.2 \pm 0.6$ ,  $5.8 \pm 0.8$ ,  $4.3 \pm 0.8$ ,  $2.7 \pm 0.4$ ,  $1.7 \pm 0.4$   $\mu\text{g/L}$ 和 $0.58 \pm 0.06$ ,  $0.42 \pm 0.03$ ,  $0.37 \pm 0.01$ ,  $0.36 \pm 0.01$ ,  $0.33 \pm 0.01$ ; MMP-9在培养液中未检出, 其细胞内mRNA相对水平分别为 $0.32 \pm 0.02$ ,  $0.23 \pm 0.02$ ,  $0.21 \pm 0.01$ ,  $0.17 \pm 0.01$ ,  $0.13 \pm 0.01$ ; TIMP-1在培养液中的含量和其在细胞内的mRNA相对水平分别为 $39.0 \pm 0.9$ ,  $29.5 \pm 2.8$ ,  $25.0 \pm 0.9$ ,  $16.8 \pm 0.4$ ,  $11.8 \pm 0.3$   $\mu\text{g/L}$ 和 $0.19 \pm 0.02$ ,  $0.17 \pm 0.02$ ,  $0.16 \pm 0.01$ ,  $0.13 \pm 0.01$ , 0。

**结论:** 选择性COX-2抑制剂能够抑制MMP和TIMP基因转录, 使TIMP/MMP比例失衡, 这可能是其降低肿瘤细胞侵袭力的机制之一。

**关键词:** COX-2抑制剂; 肝细胞生长因子; 基质金属蛋白酶; 基质金属蛋白酶抑制剂; 侵袭力; 肝癌细胞株

殷积彬, 刘铁夫, 孟祥宁, 赵丽莉, 刘晓川. NS-398对HGF诱导的肝癌细胞株MMP-7, MMP-9, TIMP-1表达的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(23):2301-2305

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2301.asp>

## 0 引言

选择性环氧化酶(COX)-2抑制剂不仅抑制肿瘤细胞增殖和诱导凋亡<sup>[1-2]</sup>, 还具有抑制肿瘤细胞运动的作用。但选择性COX-2抑制剂通过何种机制降低肿瘤细胞的运动能力尚不十分清楚。我们以选择性COX-2抑制剂NS-398作用于肝细胞生长因子(HGF)诱导的肝癌细胞株, 观察其对基质金属蛋白酶(MMP)-7, -9及其抑制剂TIMP-1表达的影响, 探讨选择性COX-2抑制剂降低肿瘤细胞侵袭力的可能机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人肝癌细胞株HepG2, 哈医大二院消化科刘冰熔教授惠赠。rhHGF购自美国CytoLab公

司; NS-398购自美国Cayman Chemical公司; 鼠抗人MMP-7, MMP-9和TIMP-1 mAb, 免疫组化试剂盒购于北京中杉金桥生物公司; TRIzol, RT-PCR试剂盒购于美国Invitrogen公司; ELISA试剂盒购于上海森雄生物公司; 胎牛血清购于天津灏源生物公司; DMEM培养基购自美国HyClone公司; 引物由上海博亚生物技术公司合成。HepG2细胞以100 mL/L FBS的DMEM培养基培养于25  $\text{cm}^2$ 培养瓶中, 置37 $^{\circ}\text{C}$ , 50 mL/L  $\text{CO}_2$ 的孵箱中, 2-3 d换培养液1次。最终逐渐过渡到含20 mL/L FBS和30  $\mu\text{g/L}$  rhHGF的低血清培养基中培养。

**1.2 方法** 按每孔 $2 \times 10^5$ 个细胞接种于24孔板, 分别以不同浓度的NS-398培养基200  $\mu\text{L}$ 培养48 h。加入5 g/L的MTT溶液20  $\mu\text{L}$ , 继续培养2 h。弃上清, 加入DMSO 200  $\mu\text{L}$ , 摇晃5 min, 取150  $\mu\text{L}$ 加入96孔板中。在酶标仪波长492 nm处测A值。设4个复孔。根据MTT结果、光镜和电镜下细胞形态选择NS-398药物浓度范围, 进行分组实验。

**1.2.1 免疫组化** 细胞爬片后, 以不含有和含有60  $\mu\text{mol/L}$ 的NS-398的低血清培养基处理48 h。40 g/L多聚甲醛室温固定15 min。PBS漂洗5 min 3次。滴加1:25, 1:25, 1:15稀释的抗MMP-7, MMP-9, TIMP-1抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。PBS漂洗后, 滴加二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min, DAB显色。苏木素复染后, 封片。结果判定: 深棕色(+++), 棕黄色(++), 浅棕色(+), 无色(-)。

**1.2.2 培养液中MMP-7, MMP-9, TIMP-1含量的检测** 按每孔 $2 \times 10^5$ 个细胞接种于24孔板, 培养48 h。以不含和含有NS-398(分别为20, 40, 60, 80  $\mu\text{mol/L}$ )的培养基500  $\mu\text{L}$ 培养48 h, 收获上清。分别取100  $\mu\text{L}$ 加入不同的酶标板中, 按试剂盒要求操作, 最后在酶标仪波长492 nm处测A值, 重复4次。根据标准曲线, 计算培养液中MMPs的含量, 取平均值。

**1.2.3 RT-PCR**  $10^7$ 个细胞加入TRIzol 1 mL, 提取总RNA。取RNA 2  $\mu\text{L}$ , 按照试剂盒说明在20  $\mu\text{L}$ 体系下完成逆转录, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。MMP-7引物为5'-ATGGGACATTCCTCTGA-3'和5'-CATTTATTGACATCTACGC-3', 产物长度372 bp; MMP-9引物为5'-TCCCTGGAGACCTGAGAACC-3'和5'-CGGCAAGTCTTCCGAGTAGTTT-3', 产物长度307 bp; TIMP-1引物为5'-CCGCAGCGAGGAGTTT-3'和5'-GGTCCGTCCACAAGCAA-3', 产物长度

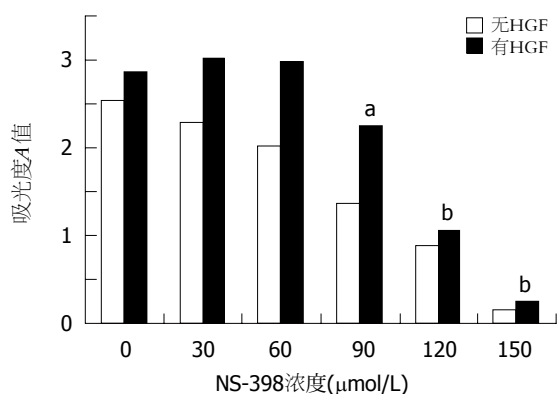


图 1 NS-398对HepG2细胞增殖的影响. <sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.01$  vs 无处理组.

表 1 NS-398处理48 h后上清中MMP-7, MMP-9, TIMP-1的含量变化

NS-398 ( $\mu\text{mol/L}$ )	MMP-7 ( $\mu\text{g/L}$ )	MMP-9 ( $\mu\text{g/L}$ )	TIMP-1 ( $\mu\text{g/L}$ )	TIMP-1 MMP-7
0	$8.2 \pm 0.6$		$39.0 \pm 0.9$	4.8
20	$5.8 \pm 0.8^a$		$29.5 \pm 2.8^a$	5.1
40	$4.3 \pm 0.8^b$		$25.0 \pm 0.9^b$	5.8
60	$2.7 \pm 0.4^b$		$16.8 \pm 0.4^b$	6.2
80	$1.7 \pm 0.4^b$		$11.8 \pm 0.3^b$	6.9

<sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.01$  vs 无处理组.

#### ■创新盘点

本研究证实, 选择性COX-2抑制剂NS-398在0-80  $\mu\text{mol/L}$ 的浓度范围内, 可能通过调节TIMP/MMP的比例, 达到降低肝癌细胞侵袭力的作用.

表 2 NS-398对MMP-7, MMP-9, TIMP-1的mRNA的影响

NS-398 ( $\mu\text{mol/L}$ )	MMP-7	MMP-9	TIMP-1	TIMP-1 mRNA MMP-7 mRNA	TIMP-1 mRNA MMP-9 mRNA
0	$0.58 \pm 0.06$	$0.32 \pm 0.02$	$0.19 \pm 0.02$	0.33	0.59
20	$0.42 \pm 0.03$	$0.23 \pm 0.02^a$	$0.17 \pm 0.02$	0.40	0.74
40	$0.37 \pm 0.01^a$	$0.21 \pm 0.01^a$	$0.16 \pm 0.01$	0.43	0.76
60	$0.36 \pm 0.01^a$	$0.17 \pm 0.01^a$	$0.13 \pm 0.01^a$	0.36	0.76
80	$0.33 \pm 0.01^a$	$0.13 \pm 0.01^b$	0		

<sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.01$  vs 无处理组.

215 bp;  $\beta$ -actin引物为5'-TTGTAACCAACTGG GACGATATGG-3'和5'-GATCTTGATCTTCATG GTGCTAGG-3', 产物长度745 bp. 反应条件为94℃变性30 s, 50℃退火30 s, 72℃延伸60 s, 30个循环. 取产物2  $\mu\text{L}$ 在110 V下经20 g/L琼脂糖凝胶电泳30 min, 利用凝胶成像系统(上海天能科技有限公司GIS-2010)扫描分析、拍照, 获取条带平均密度和面积数据, 计算MMP-7, MMP-9, TIMP-1的mRNA相对含量.

**统计学处理** 应用SPSS 11.5统计学软件进行数据分析.  $P<0.05$ 为差异有显著性.

## 2 结果

**2.1 NS-398对HepG2细胞形态和增殖的影响** 肿瘤细胞在无HGF的培养基中表现出对NS-398的浓度依赖性抑制( $P<0.05$ ). 当给予30  $\mu\text{g/L}$ 的HGF作用后, 30  $\mu\text{mol/L}$ 和60  $\mu\text{mol/L}$ 的NS-398组与未给药组之间的细胞增殖无显著性差异, 而90  $\mu\text{mol/L}$ , 120  $\mu\text{mol/L}$ , 150  $\mu\text{mol/L}$ 的NS-398组与未给药组之间的细胞增殖具有显著性统计学差异( $P<0.05$ , 图1).

**2.2 NS-398对细胞中MMP/TIMP表达的影响** 30  $\mu\text{g/L}$ 的HGF诱导HepG2细胞48 h后, MMP-7,

MMP-9, TIMP-1均匀表达于细胞质中, 呈细颗粒状, 三者的表达强度分别为(++), (++)和(弱+)/(+). 以60  $\mu\text{mol/L}$ 的NS-398作用细胞48 h后, 发现三者的蛋白质表达程度均下降, 分别为(弱+)/(+), (弱+)和(-)(图2).

**2.3 NS-398对细胞培养液中MMP/TIMP含量的影响** 用不同浓度的NS-398作用肿瘤细胞48 h, 培养液上清中MMP-7和TIMP-1的含量随NS-398浓度增加逐渐减少, 且TIMP-1/MMP-7的比值出现递增变化; 在培养液上清中没有检测到酶或酶原形式的MMP-9(表1).

**2.4 NS-398对MMP和TIMP的mRNA水平的影响** 以不同浓度的NS-398处理HGF诱导的HepG2细胞24 h, 细胞内MMP-7, MMP-9, TIMP-1的mRNA相对含量逐渐降低, 并且出现TIMP mRNA/MMP mRNA的比例失衡(图3, 表2), 提示NS-398能够影响细胞内MMP-7, MMP-9, TIMP-1基因的mRNA转录.

## 3 讨论

MMP是一组锌离子依赖性内肽酶, 翻译后分泌过程中前酶原逐渐被加工修饰形成酶原或酶, 在转录、激活和抑制剂3个水平接受调控, HGF

### ■应用要点

选择性COX-2抑制剂具有降低肿瘤细胞侵袭力的作用, 因此有望成为一种新型的临床抗肿瘤药物.

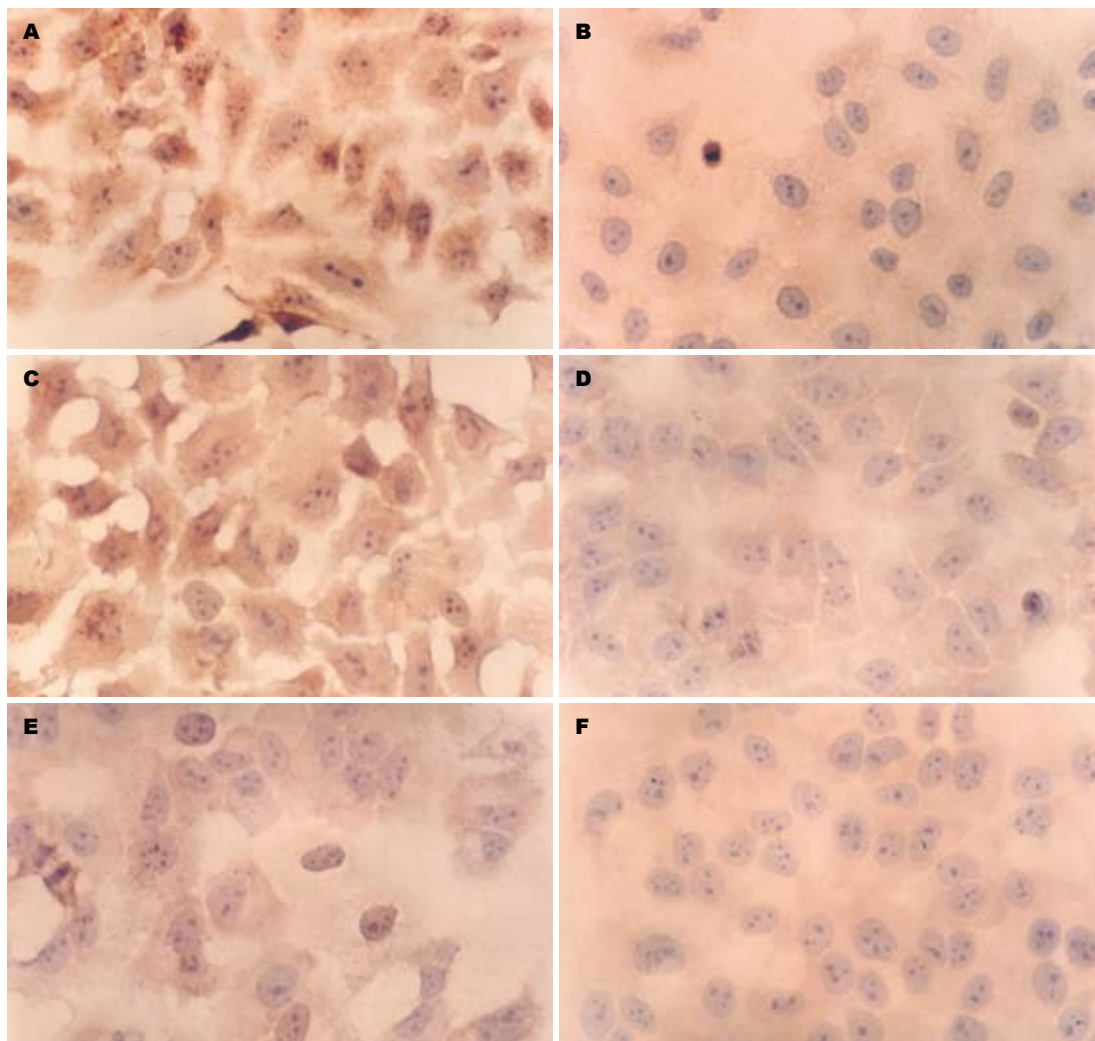


图 2 NS-398对HepG2细胞MMP和TIMP表达的影响( $\times 40$ ). A: MMP-7; B: NS-398处理后MMP-7; C: MMP-9; D: NS-398处理后MMP-9; E: TIMP-1; F: NS-398处理后TIMP-1.

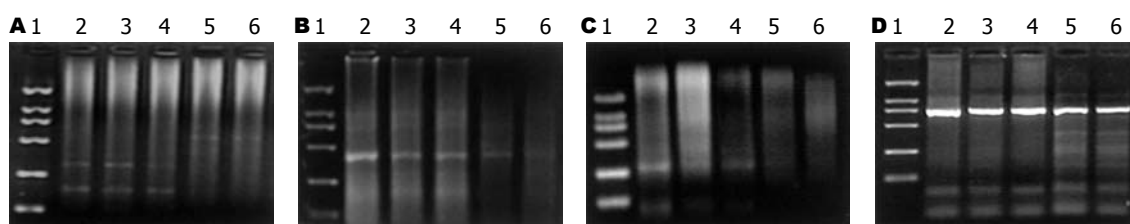


图 3 NS-398对MMPs mRNA表达的影响. A: MMP-7, 372 bp; B: MMP-9, 307 bp; C: TIMP-1, 215 bp; D:  $\beta$ -actin, 745 bp; 1: Maker为DL2000; 2: 无NS-398处理; 3: 20  $\mu\text{mol/L}$  NS-398处理; 4: 40  $\mu\text{mol/L}$  NS-398处理; 5: 60  $\mu\text{mol/L}$  NS-398处理; 6: 80  $\mu\text{mol/L}$  NS-398处理.

可以促进MMP的表达<sup>[3]</sup>. MMP-7属于基质溶素类, 主要降解基质中的层黏蛋白、纤维蛋白和蛋白多糖等, 是MMP家族中唯一由上皮性肿瘤细胞特异性表达的酶, 由于其能够抑制肿瘤细胞凋亡, 激活其他MMP成员(MMP-2, MMP-9等)和灭活serpins(丝氨酸蛋白酶抑制剂), 而被认为与肿瘤细胞转移直接相关; MMP-9属于明胶酶类, 主要降解IV/V型胶原, 与c-met、肿瘤大

小、肿瘤肝内转移或血管癌栓、生存时间等临床指标呈正相关, 对评估肝癌的进展和转移十分重要. TIMP-1特异的抑制MMP-7和MMP-9的活性, 降低肿瘤细胞的迁移能力. Abiru *et al*<sup>[4]</sup>利用Matrigel检测细胞侵袭力, 发现选择性COX-2抑制剂明显降低HepG2肝癌细胞株在人工基质中的迁移性. 我们的研究结果显示, NS-398作用于HGF诱导的HepG2肝癌细胞株后, MMP-7,

MMP-9和TIMP-1的mRNA和胞内胞外蛋白质表达均不同程度地减少, TIMP/MMP比值增加, 出现TIMP/MMP比例失衡, 这可能是选择性COX-2抑制剂抑制肿瘤细胞侵袭力的作用机制之一. 培养液中没有检测出分泌型MMP-9, 但细胞内却有前MMP-9的mRNA和蛋白质表达, 说明MMP-9在细胞内向细胞外分泌过程中可能受到抑制而难以激活. 实验中我们发现, 当NS-398浓度大于90  $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞受到明显的增殖抑制, 细胞形态变化较大, 随着培养时间的延长, 死亡细胞数量也增加, 提示选择性COX-2抑制剂的作用与药物浓度有关.

研究证实, 选择性COX-2抑制剂可以影响TIMP/MMP比例, 降低肿瘤细胞株的侵袭力, 但是否通过抑制HGF/c-met/ERK(细胞外信号调节的激酶)信号途径<sup>[5-6]</sup>, 抑制肿瘤细胞迁移力以及分子作用机制还需进一步研究. 另外, 选择性COX-2抑制剂虽然具有一定的预防和治疗消化道肿瘤的效果, 但也要重视其带来的不良反应, 合理掌握药物的使用方法及开发新型药物, 比如新近研发的NO释放Aspirin和COX抑制NO供体<sup>[7-8]</sup>都有助于提高其临床安全性. 因此, 深入研究COX-2抑制剂的抗肿瘤的分子生物学机制具有深远的临床意义.

#### 4 参考文献

- 1 Cheng J, Imanishi H, Liu W, Nakamura H, Morisaki T, Higashino K, Hada T. Involvement of cell cycle regulatory proteins and MAP kinase signaling pathway in growth inhibition and cell cycle arrest by a selective cyclooxygenase 2 inhibitor, etodolac, in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Cancer Sci* 2004; 95: 666-673
- 2 Huang DS, Shen KZ, Wei JF, Liang TB, Zheng SS, Xie HY. Specific COX-2 inhibitor NS398 induces apoptosis in human liver cancer cell line HepG2 through BCL-2. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 204-207
- 3 Ozaki I, Mizuta T, Zhao G, Zhang H, Yoshimura T, Kawazoe S, Eguchi Y, Yasutake T, Hisatomi A, Sakai T, Yamamoto K. Induction of multiple matrix metalloproteinase genes in human hepatocellular carcinoma by hepatocyte growth factor via a transcription factor Ets-1. *Hepatol Res* 2003; 27: 289-301
- 4 Abiru S, Nakao K, Ichikawa T, Migita K, Shigeno M, Sakamoto M, Ishikawa H, Hamasaki K, Nakata K, Eguchi K. Aspirin and NS-398 inhibit hepatocyte growth factor-induced invasiveness of human hepatoma cells. *Hepatology* 2002; 35: 1117-1124
- 5 Zhang Z, Lai GH, Sirica AE. Celecoxib-induced apoptosis in rat cholangiocarcinoma cells mediated by Akt inactivation and Bax translocation. *Hepatology* 2004; 39: 1028-1037
- 6 Wong BC, Jiang XH, Lin MC, Tu SP, Cui JT, Jiang SH, Wong WM, Yuen MF, Lam SK, Kung HF. Cyclooxygenase-2 inhibitor (SC-236) suppresses activator protein-1 through c-Jun NH2-terminal kinase. *Gastroenterology* 2004; 126: 136-147
- 7 Brzozowska I, Targosz A, Sliwowski Z, Kwiecien S, Drozdowicz D, Pajdo R, Konturek PC, Brzozowski T, Pawlik M, Konturek SJ, Pawlik WW, Hahn EG. Healing of chronic gastric ulcers in diabetic rats treated with native aspirin, nitric oxide (NO)-derivative of aspirin and cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor. *J Physiol Pharmacol* 2004; 55: 773-790
- 8 Hawkey CJ, Jones JI, Atherton CT, Skelly MM, Bebb JR, Fagerholm U, Jonzon B, Karlsson P, Bjarnason IT. Gastrointestinal safety of AZD3582, a cyclooxygenase inhibiting nitric oxide donator: proof of concept study in humans. *Gut* 2003; 52: 1537-1542

#### ■同行评价

本文选题先进, 选择性环氧化酶(COX-2)抑制剂不仅与肿瘤细胞运动有关, 而且与肿瘤增殖和凋亡有关, 探讨NS-398对MMP-7, -9, 及其抑制剂TIMP-1的影响, 从而探讨COX-2抑制剂降低肿瘤细胞侵袭力的机制十分有意义. 设计科学、技术合理、结果可信.

电编 张敏 编辑 潘伯荣