

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2018.18.015

“肾脑相济”电针疗法对帕金森病模型小鼠中脑黑质胶质细胞的影响

万明珠¹, 任路^{1*}, 于嵩¹, 刘超²

(1. 辽宁中医药大学针灸推拿学院, 辽宁省沈阳市皇姑区崇山东路 79 号, 110847; 2. 广东省佛山市南海区人民医院)

摘要 目的 探讨电针治疗帕金森病的可能作用机制。方法 将 48 只小鼠随机分为空白组、模型组、电针组和美多芭组, 每组 12 只。除空白组外, 其余各组采用 1-甲基-4-苯基 1, 2, 3, 6 四氢吡啶 (MPTP) 腹腔注射建立帕金森病小鼠模型。空白组灌服生理盐水 0.2 ml, 美多芭组灌服美多芭混悬液 50 mg/kg, 每天 1 次。电针组给予“肾脑相济”电针疗法, 针刺“肾俞”“百会”“太溪”穴, 每日 1 次, 每次 20 min, 每日取左侧或右侧交替针刺治疗。各组均干预 4 周。观察小鼠的行为状态, 小鼠中脑黑质中酪氨酸羟化酶 (TH)、胶质纤维酸性蛋白 (GFAP)、离子钙接头分子 (Iba-1) 阳性细胞数及蛋白表达。结果 模型组小鼠行为状态较空白组明显变差, 美多芭组与电针组小鼠行为状态较模型组改善。与空白组比较, 模型组小鼠中脑黑质 TH 阳性细胞数量及蛋白表达明显减少, GFAP 和 Iba-1 阳性细胞数量及蛋白表达明显增多 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 电针组和美多芭组小鼠 TH 阳性细胞数量及蛋白表达明显增多, GFAP 和 Iba-1 阳性细胞数量及蛋白表达明显减少 ($P < 0.05$)。美多芭组与电针组各指标比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 “肾脑相济”电针疗法抑制星形胶质细胞和小胶质细胞的活性, 从而增加其对多巴胺能神经元的保护作用, 可能是其治疗帕金森病的作用机制之一。

关键词 电针; 帕金森病; 多巴胺能神经元; 星形胶质细胞; 小胶质细胞; 肾脑相济

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 又称为震颤麻痹, 是常见于中老年人的一种神经系统退行性疾病^[1]。该病具有病程长、致残率高的特点, 严重影响患者的生存质量, 临床上表现为静止时震颤、运动迟缓、肌强直和平衡障碍等^[2]。研究表明, 针灸对帕金森病的症状改善明显, 而且可以降低西药的毒副作用^[3]。胶质细胞包括星形胶质细胞和小胶质细胞, 胶质细胞的一般激活可对多巴胺能神经元起到保护作用, 但是帕金森病状态下胶质细胞会过度激活, 产生一些炎性因子影响帕金森病的病程^[4]。帕金森病归属于中医学“颤证”范畴, 其病变的部位在脑, 且与肾精亏虚关系密切。本研究从“肾脑相济”出发, 探究电针对帕金森病模型小鼠胶质细胞的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

48 只 9.5 月龄 C57BL/6J 小鼠, SPF 级, 雄性, 体重 (30 ± 5) g, 北京华阜康生物科技股份有限公司, 实验动物许可证号: SCXK 京 2014-0004。动物房温度维持在 21 ~ 24℃, 湿度 10% ~ 30%, 采用 12 h/12 h 昼夜节律 (08:00 - 20:00), 实验期间动物自由饮水和进食。

1.2 实验药物

美多芭片 (上海罗氏制药有限公司生产, 批号: SH2958)。

1.3 主要试剂及仪器

PBS (批号: ZLI-9062) 无锡傲锐东源生物科技有限公司; 兔抗体免疫组化 SP 试剂盒 (兔链霉卵白素-生物素法检测系统, 批号: KGSP03), 江苏凯基生物科技股份有限公司; 兔抗小鼠酪氨酸羟化酶 (TH) 抗体 (批号: EP1532Y)、兔抗小鼠胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 抗体 (批号: EPR1034Y) 和兔抗小鼠离子钙接头分子 (Iba-1)

基金项目: 辽宁省教育厅创新团队 (LT2015016); 辽宁省教育厅“辽宁特聘教授”

* 通讯作者: renlu2008.student@sina.com

抗体 (批号: EPR16589), 均为英国 Abcam (上海) 公司产品; 1-甲基-4-苯基 1, 2, 3, 6 四氢吡啶 (MPTP, 批号: M0896), 美国 Sigma 公司; SDS-PAGE 凝胶试剂盒 (批号: P0012A), 上海碧云天生物技术有限公司; 丽春红染色液 (上海碧云天生物技术有限公司, 批号: P0022)。

毫针 (批号: 160010), 苏州医疗用品有限公司, 规格 0.25 mm × 13 mm; SDZ-III 型华佗牌电针仪, 苏州医疗用品厂有限公司; Legend Micro17R 型离心机, 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司。

1.4 动物分组、造模及干预

48 只小鼠适应性饲养 3 天, 根据体重用随机数字表法分为空白组、模型组、电针组和美多芭组, 每组 12 只。随机方法: 从随机数字表中第 6 行第 6 列数字 49 开始, 向后依次抄写 48 个数字, 将对应的数字除以 4 余数为 0 分为空白组 11 只, 余数 1 为模型组 11 只, 余数 2 为电针组 12 只, 余数 3 为美多芭组 14 只, 采用随机方法从这 48 个数字后边抄 2 个数字分别除以 14 和 13, 余数为 8 和 7, 将美多芭组中第 8 只小鼠改为模型组, 第 7 只改为空白组, 使各组小鼠数量相同。

参照文献 [5-6] 制备帕金森病模型。除空白组外其余各组给予 20 mg/(kg · d) MPTP 腹腔注射, 空白组给予等量的生理盐水腹腔注射, 各组均给药 7 天。造模后小鼠黑质酪氨酸羟化酶的阳性细胞数量与空白组比较明显减少, 行为学表现小鼠出现震颤、强直、跳窜、竖尾、立毛等表现, 满足此两个条件说明小鼠造模成功。在造模过程中, 模型组、电针组、美多芭组各死亡 2 只, 空白组死亡 2 只。

造模完成后第 2 天开始空白组灌服生理盐水 0.2 ml, 美多芭组灌服美多芭片混悬液 50 mg/kg (0.2 ml), 每日 1 次。电针组从造模结束后第 2 天开始电针刺激。电针时小鼠用自制装置固定使其安静, 用毫针刺刺“肾俞”“百会”“太溪”穴。穴位定位参照《实验针灸学》[7]。针刺后接通电源, 太溪连肾俞, 百会连湿棉片, 频率 100 Hz, 电压 2~4 V, 连续波, 每日 1 次, 每次 20 min, 每日取左侧或右侧交替针刺, 各组均干预 4 周。刺激过程中, 电针组、美多芭组各死亡 2 只, 模型组和空白组各死亡 1 只。模型组和空白组小鼠剩余 9 只, 美多芭组和电针组小鼠剩余 8 只。最后每组采用抽签法随机选取 6 只小鼠用于最终数据统计。

1.5 观察指标及方法

于造模及干预前后观察各组小鼠行为学改变,

包括运动情况、肢体协调能力等。实验结束后取小鼠静脉血入 EP 管中, 后采用断脊法处死, 于冰盘上迅速将小鼠脑组织剥离, 每组取 2 只小鼠的半脑和 2 只小鼠的全脑, 置于多聚甲醛固定液中固定。剩余部分小鼠脑组织置于预冷的 PBS 缓冲液中浸泡 5 min, 随即分离出小鼠纹状体和中脑组织, 分别装在事先标记好的冷冻管中, 放在 -80℃ 的冰箱中保存备用。将所取的静脉血 12 000 r/min 4℃ 离心 5~10 min 后, 取 EP 管中的上层血清, 放在标记的冷冻管中保存备测。

1.5.1 免疫组织化学法检测中脑黑质 TH、GFAP 和 Iba-1 阳性细胞数量 将在多聚甲醛固定液中固定 24 h 以上的小鼠全脑和半脑组织, 经脱水、透明、石蜡包埋, 切取 5~7 μm 厚的冠状切片, 常温保存备用。免疫组化染色步骤: 二甲苯脱蜡、梯度乙醇至水→PBS 冲洗→微波修复柠檬酸缓冲液→PBS 冲洗→按照试剂盒说明, 依次加入试剂 A, 10 min, PBS 冲洗→加试剂 B, 10 min, 弃 B→加入兔抗小鼠 TH 抗体 (1: 750)、兔抗小鼠 GFAP 抗体 (1: 1000) 和兔抗小鼠 Iba-1 抗体 (1: 10000), 室温下孵育 60 min 或者 4℃ 过夜, PBS 冲洗→加试剂 C, 10 min, PBS 冲洗→加试剂 D, 10 min, PBS 冲洗→DAB 显色, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。

1.5.2 Western Blot 法检测中脑黑质 TH、GFAP 和 Iba-1 蛋白含量 SDS-PAGE 凝胶按照试剂盒说明配制适当浓度的分离胶和浓缩胶。收集的小鼠脑黑质蛋白样品中加入 PBS 液体 (空白组、模型组、电针组、美多芭组加样量分别为 3.92、3.4、3.71、3.64 μl) 和 2 μl 的蛋白上样缓冲液, 将配制的蛋白样品沸水浴加热 5 min, 使蛋白充分变性。待蛋白样品冷却到室温后, 将标记蛋白和蛋白样品上样到 SDS-PAGE 胶加样孔内。按照 3.03 g 三羟甲基氨基甲烷 + 14.4 g 甘氨酸 + 1 g 十二烷基硫酸钠 + 1000 ml 蒸馏水的比例配制电泳液, 电泳时上层胶时使用 90V 恒压电泳, 而在溴酚蓝进入下层胶时使用 120V 恒压电泳, 至溴酚蓝到达胶的底端处附近时停止电泳, 或者根据预染蛋白质分子量的标准电泳情况, 目的蛋白被适当分离后可停止电泳。提前 30 min 根据适当的比例配制转印液, 实验中选用 PVDF 膜, 将转移膜用甲醇液浸泡 10 min, 转印时用 50V 恒压转印 2 h, 转印时在转印槽外边加冰块或者把转膜槽放置在冰浴中以散热。用丽春红染色液对膜进行染色, 以观察转膜效果。将转印膜根

据需要的蛋白量裁剪条带,裁膜之后用 TBST 洗涤液漂洗 1~2 min,将膜上的洗涤液除去,加入按照一定比例配制的牛奶封闭液,在摇床上缓慢摇动,室温封闭 60 min,除去封闭液,加入按照 TH (1:500)、GFAP (1:10 000)、Iba-1 (1:1000) 的比例稀释好的一抗,室温下摇床孵育 1 h 后放入 4℃ 过夜。回收一抗,在摇床上用 TBST 洗涤 3 次,每次 10 min。根据一抗选择合适的二抗,参考二抗的说明书,按照适当比例用稀释辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗,除去封闭液,加入稀释好的二抗,室温下摇床孵育 1 h。回收二抗,在摇床上用 TBST 洗涤 3 次,每次 10 min。曝光,显影,蛋白检测,数据用其与 β -action 的比值表示。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件包进行统计分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,数据均满足正态性和方差齐性,多组间比较采用单因素方差分析。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 各组小鼠行为学观察结果

造模前各组小鼠动作灵敏,无肢体不协调的情况,行为症状无明显差异;在第 1 天注射 MPTP 30 min 后,模型组、电针组和美多芭组小鼠表现出不同程度的垂尾,竖毛,跳动活跃,抽搐和其他运动;1 h 后小鼠逐渐出现肢体震颤和后肢僵硬,活动不灵敏;每天在相同的时间段注射 MPTP,注射该药物 7 天后,小鼠运动功能发生障碍,动作缓慢,活动明显减少。干预后电针组和美多芭组小鼠行为状态改善明显,跳窜反应明显减少,肢体协调能力明显改善。

2.2 各组小鼠中脑黑质 TH、GFAP 和 Iba-1 阳性细胞数比较

表 1 示,与空白组比较,模型组小鼠中脑黑质 TH 阳性细胞数明显减少,GFAP、Iba-1 阳性细胞数明显增多 ($P < 0.05$),说明小鼠造模成功。与模型组比较,电针组和美多芭组小鼠中脑黑质 TH 阳性细胞数明显增多,GFAP、Iba-1 阳性细胞数明显减少 ($P < 0.05$),且与空白组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。美多芭组与电针组组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 各组小鼠中脑黑质 TH、GFAP 和 Iba-1 蛋白表达比较

表 2 示,与空白组比较,模型组小鼠中脑黑质 TH 蛋白表达明显减少,GFAP 和 Iba-1 蛋白表达明

显增多 ($P < 0.05$)。与模型组比较,电针组和美多芭组中脑黑质 TH 蛋白表达增多,GFAP 和 Iba-1 蛋白表达明显减少 ($P < 0.05$)。美多芭组与电针组组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组小鼠中脑黑质 TH、GFAP、Iba-1 蛋白电泳图见图 1。

表 1 各组小鼠中脑黑质 TH、GFAP、Iba-1 阳性细胞数比较 (个, $\bar{x} \pm s$)

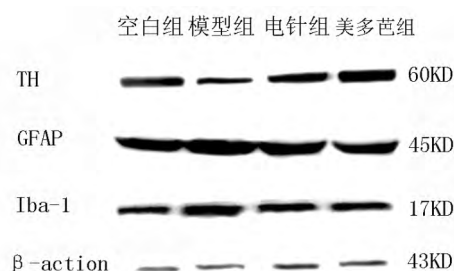
组别	鼠数	TH	GFAP	Iba-1
空白组	6	799.33 $\pm$ 127.90	7.00 $\pm$ 0.89	5.67 $\pm$ 0.82
模型组	6	194.17 $\pm$ 48.54*	27.67 $\pm$ 1.63*	15.67 $\pm$ 1.63*
电针组	6	763.67 $\pm$ 94.80 Δ	12.17 $\pm$ 1.94 Δ	9.83 $\pm$ 0.98 Δ
美多芭组	6	626.00 $\pm$ 80.96 Δ	13.83 $\pm$ 0.75 Δ	10.00 $\pm$ 0.89 Δ

注: TH, 酪氨酸羟化酶; GFAP, 胶质原纤维酸性蛋白; Iba-1, 离子钙接头分子; 与空白组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

表 2 各组小鼠中脑黑质 TH、GFAP 和 Iba-1 蛋白表达比较 (β -action, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TH	GFAP	Iba-1
空白组	6	1.00 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.01
模型组	6	0.54 $\pm$ 0.11*	1.46 $\pm$ 0.19*	1.44 $\pm$ 0.20*
电针组	6	0.71 $\pm$ 0.12 Δ	1.20 $\pm$ 0.11 Δ	1.12 $\pm$ 0.11 Δ
美多芭组	6	0.69 $\pm$ 0.11 Δ	1.12 $\pm$ 0.14 Δ	1.06 $\pm$ 0.10 Δ

注: TH, 酪氨酸羟化酶; GFAP, 胶质原纤维酸性蛋白; Iba-1, 离子钙接头分子; 与空白组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$



注: TH, 酪氨酸羟化酶; GFAP, 胶质纤维酸性蛋白; Iba-1, 离子钙接头分子

图 1 各组小鼠中脑黑质 TH、GFAP 和 Iba-1 蛋白电泳图

3 讨论

帕金森病归属于中医学“颤证”范畴,其病变的部位在脑且与肾精亏虚关系密切。研究^[8-9]表明,运用“肾脑相济”针刺治疗帕金森病有理论基础和指导意义。帕金森病的形成发展与肾虚有关,人体年龄越来越大,肾气亏虚,脑失充养,机体逐渐衰弱,动作失灵。帕金森病病位在脑,脑为髓海。肾主骨生髓,髓向上充于脑,化生脑髓;肾气肾精充盛,髓海充实则可以积精健脑,脑发育健全,脑髓充养,则脑神健全、身体强健,精力充

沛,思维敏捷,则较少生病;脑神功能正常则五脏功能正常发挥,则肾主骨髓功能正常发挥。反之,当肾精亏虚,肾气不足之时,肾气不能推动肾精上承,不能生髓充脑,导致髓海不足,脑髓空虚,脑失去正常的养护,脑的发育不健全,会出现头摇动、肢体颤抖、拘急挛缩、肢体活动减少以及活动笨拙等症状。“肾脑相济”这一理论则是肾和脑一荣俱荣,一损俱损,相互济济。本课题在肾脑相济的中医理论指导下,选取小鼠“百会”“肾俞”“太溪”作为电针组的治疗穴位,百会为巅顶督脉上的穴位,为诸阳之会,与足太阳膀胱经交会,通达脑肾,能够开窍、醒脑、补肾。肾俞是足太阳膀胱经的经穴,调补肾俞可以调补脑、肾。太溪为足少阴肾经输穴、原穴,为足少阴肾经动脉,取之以候肾气。

帕金森病是黑质纹状体多巴胺严重不足导致的一种神经退行性疾病,TH是多巴胺生物合成的关键酶^[1]。模型组小鼠中脑黑质TH的阳性细胞数目、蛋白表达明显减少,同时GFAP是星形胶质细胞的特异性标志物^[1]。Iba-1是小胶质细胞的特异性标志物。星形胶质细胞和小胶质细胞对帕金森病存在保护机制也存在一定的损害机制^[4,12]。星形胶质细胞在帕金森病的发病中起着双重作用,一方面参与中枢神经系统的自身免疫,产生大量的炎症因子使多巴胺能神经元丢失明显,加重帕金森病的损伤过程^[13];另一方面病变周围的星形胶质细胞激活后参与了神经元的清除过程,并可以释放对帕金森病动物模型起保护作用的营养因子,促进多巴胺能神经元对抗损伤^[14]。GFAP和Iba-1的阳性细胞数目和蛋白表达情况反应了小鼠胶质细胞的变化。各组小鼠行为学改变明显,说明MPTP对小鼠起作用,模型建立成功。本实验结果显示,与空白组相比,模型组小鼠GFAP和Iba-1表达明显升高,提示星形胶质细胞和小胶质细胞过度激活。与模型组相比,电针组和美多芭组GFAP和Iba-1表达明显降低,提示电针和西药都能缓解星形胶质细胞和小胶质细胞的过度激活。

综上所述,“肾脑相济”电针疗法可以抑制帕金森病小鼠中脑黑质星形胶质细胞和小胶质细胞的过度激活,使MPTP对多巴胺神经元的损伤减小,

增加对多巴胺能神经元的保护作用,促进病情恢复。

参考文献

- [1] 中华医学会神经病学分会帕金森病及运动障碍学组. 中国帕金森病治疗指南(第三版) [J]. 中华神经科杂志, 2014, 47(6): 428-433.
- [2] 刘承勇, 漆松涛. 帕金森病外科治疗学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 53-55.
- [3] 邱崇笙, 王旭慧. 帕金森病的针灸治疗研究进展 [J]. 湖南中医杂志, 2015, 31(5): 181-182.
- [4] 吕凤月, 赵咏梅. 星形胶质细胞在帕金森病发病机制中的作用 [J]. 基础医学与临床, 2008, 28(5): 516-518.
- [5] KLEMMANN CJHM, MARTENS GJM, POELMANS G, et al. Validity of the MPTP-treated mouse as a model for Parkinson's Disease [J]. Mol Neurobiol, 2016, 53(3): 1625-1636.
- [6] 许耀刚, 庞晓峰, 汲娟娟. MPTP损伤的小鼠PD模型的制作与评价 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2006, 33(10): 1014-1018.
- [7] 李忠仁. 实验针灸学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 147-150.
- [8] 万明珠, 于嵩, 刘超, 等. 从“肾、脑、督脉”法论治帕金森证 [J]. 光明中医, 2017, 32(20): 2913-2915.
- [9] 万明珠, 于嵩, 陈亚丽, 等. “脑肾相济”针刺疗法治疗帕金森病理论探讨 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(2): 172-174.
- [10] 张晓录, 张逢春, 李尧华. 酪氨酸羟化酶与帕金森病的关系研究 [J]. 北华大学学报(自然), 2005, 6(3): 224-227.
- [11] 庄文欣, 付文玉, 吕娥, 等. 帕金森病大鼠黑质小胶质细胞及星形胶质细胞的变化 [J]. 解剖学报, 2010, 41(3): 344-348.
- [12] 汪明玉, 刘志辉, 孙杨. 小胶质细胞在帕金森病发病中的作用机制 [J]. 临床神经病学杂志, 2014, 27(3): 230-231.
- [13] OUCHI Y, YOSHIKAWA E, SEKINE Y, et al. Microglial activation and dopamine terminal loss in early Parkinson's disease [J]. Ann Neurol, 2005, 57(2): 168-175.
- [14] ATHIYA S, RANJU V, KALAIVANI P, et al. Telmisartan attenuates MPTP induced dopaminergic degeneration and motor dysfunction through regulation of α -synuclein and neurotrophic factors (BDNF and GDNF) expression in C57BL/6J mice [J]. Neuropharmacology, 2013, 73(6): 98-110.

Effects of Electro-Acupuncture Therapy with Coordination between Kidney and Brain on Substantia Nigra Neuroglia Cell in Parkinson's Disease Model Mice

WAN Mingzhu¹, REN Lu¹, YU Song¹, LIU Chao²

(1. School of Acupuncture & Moxibustion and Tuina, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang, 110847; 2. Nanhai District People's Hospital of Foshan City, Guangdong)

ABSTRACT Objective To study the possible mechanism of electro-acupuncture therapy on Parkinson's disease (PD). **Methods** A total of 48 mice were randomly divided into blank group, model group, electro-acupuncture group and Meddoba group, with 12 mice in each group. 1-Methyl-4-phenyl 1, 2, 3, 6 tetrahydropyridine (MPTP) was used to establish PD model mice by intraperitoneal injection in all groups except blank group. 0.2 ml saline solution was given to the blank group. Meddoba suspension (50 mg/kg) was given to Meddoba group, once a day. Electro-acupuncture stimulation with coordination between kidney and brain was used in electro-acupuncture group on "Shenshu" (BL23), "Baihui" (GV20) and "Taixi" (K13), once a day, and 20 minutes each time with unilateral alternative treatment. The interventions in each group were all continuous for 4 weeks. The behaviors, amount of positive cells and expression of tyrosine hydroxylase (TH), glial fibrillary acidic protein (GFAP), Ionized calcium binding adaptor molecule-1 (Iba-1) in substantia nigra of the mice were observed. **Results** The behaviors of mice in model group were significantly inferior to the blank group, while Meddoba group and electro-acupuncture group were better than model group. The amount of positive cells and expression of TH in substantia nigra was significantly reduced in the model group, while GFAP and Iba-1 were obviously increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the amount of positive cells and expression of TH was significantly increased in electro-acupuncture group and meddoba group, while GFAP and Iba-1 were significantly reduced ($P < 0.05$). The index in meddoba group and electro-acupuncture group had no significant difference ($P > 0.05$). **Conclusion** Electro-acupuncture therapy with coordination between kidney and brain can inhibit the activity of astrocyte and microglia, and further potentiate the protection of dopaminergic neuron, which might be the mechanism of PD.

Keywords electro-acupuncture; Parkinson's disease; dopaminergic neuron; astrocyte; microglia; coordination between kidney and brain

(收稿日期: 2018-03-01; 修回日期: 2018-06-19)

编辑: 王利芬



现代化煎药配送服务中心

——专业、全方位的服务模式 150余家机构的安心选择

深度融合2大网络:

互联网+物联网

紧密连接4大群体:

中医组织、饮片企业、患者、监管单位

智能控制7大环节:

接单和打码 → 调剂与复核 → 饮片浸泡
物流配送 ← 膏方制作 ← 汤剂包装 ← 饮片煎煮



北京东华原医疗设备有限公司

咨询热线: 400-888-0258 / 800-810-0359

官方网站: <http://www.donghuayuan.com>



智能煎药机 十功能自动煎药机
扫描二维码, 更多精彩等着您