

核糖核酸酶抑制因子与人乳腺癌细胞恶性增殖的相关性研究

唐晓燕¹, 章菊¹, 夏俊², 陈俊霞³, 崔秀云⁴

[摘要] 目的:探讨核糖核酸酶抑制因子(ribo-nucleasae inhibitor, RI)的表达与人乳腺癌细胞 MCF-7、MDA-MB-231、SKBR-3 恶性增殖之间的关系。方法:四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测细胞增殖情况,流式细胞术检测细胞周期分布,RT-PCR 检测 RI 基因表达水平,细胞免疫化学技术检测 RI 蛋白表达情况。结果:人乳腺癌细胞 MCF-7 细胞增殖速度、S 期所占比例均小于人乳腺癌细胞 MDA-MB-231、SKBR-3($P < 0.05 \sim P < 0.01$),且 MCF-7 细胞中 RI 基因表达水平、蛋白表达水平明显高于 MDA-MB-231、SKBR-3 细胞($P < 0.01$)。结论:RI 与人乳腺癌细胞恶性增殖生长有一定的相关性。

[关键词] 乳腺肿瘤;肿瘤,核糖核酸;核糖核酸酶抑制因子;细胞株;细胞增殖

[中国图书资料分类法分类号] R 737.9;Q 522.5 **[文献标识码]** A

The relevant research between expression of ribonuclease inhibitor and the malignant proliferation in human breast cancer cells

TANG Xiao-yan¹, ZHANG Ju¹, XIA Jun², CHEN Jun-xia³, CUI Xiu-yun⁴

(1. Research Center of Clinical Laboratory Science, 2. Department of Biochemistry and Molecular, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030; 3. Department of Biochemistry and Molecular, Chongqing Medical University; Chongqing 400016; 4. Department of Biochemistry and Molecular, Dalian Medical University, Dalian Liaoning 116027, China)

[Abstract] **Objective:** To study the relation between the change of ribonuclease inhibitor(RI) and malignant proferations in different malignant degree human breast cancer cell lines MCF-7,MDA-MB-231,SKBR-3. **Methods:** Cell profigeration was determined by MTT assay;The cell cycle was measured by flow cytometry (FCM);the expression of RI mRNA was examined by semi-quantitative RT-PCR; immunohistochemistry was used to detected the protein expression of RI. **Results:** Human breast cancer cell lines MCF-7 cell malignant proliferation. S period was less than the propotion of human breast cancer cell lines MDA-MB-231,SKBR-3($P < 0.05 \sim P < 0.01$), and the expressions of RI mRNA and protein in the human breast cancer cell lines MCF-7 were higer than that of human breast cancer cell lines MDA-MB-231,SKBR-3($P < 0.01$). **Conclusions:** RI and human breast cancer cells malignant profigeration growth has certain relevance.

[Key words] breast neoplasms;neoplasms,RNA;ribonuclease inhibitor;human cell time;cell proliferation

[收稿日期] 2008-05-08

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究资助项目(2006kj394B);重庆市科技厅基金资助项目课题(CSTC,2006BB528)

[作者单位] 蚌埠医学院 1. 临床检验诊断学实验中心,2. 生物化学与分子生物学教研室,安徽蚌埠 233030;3. 重庆医科大学生物教研室,重庆 400016;4. 大连医科大学生物化学与分子生物学教研室,辽宁大连 116027

[作者简介] 唐晓燕(1978-),女,硕士研究生。

[通讯作者] 夏俊,研究生导师,教授。

核糖核酸酶抑制因子(ribo-nucleasae inhibitor, RI)

是一种分子量为 50 kDa 的酸性糖蛋白,由 460 个氨基酸残基组成,广泛分布于哺乳动物的各种组织器官中,以人胎盘中的含量最为丰富^[1]。有研究表明 RI 能抑制实体瘤的生长^[2,3],但 RI 表达与肿瘤细胞恶性增殖之间是否存在相关性未见报道。本实验以 RT-PCR 和免疫细胞化学法检测不同人乳腺癌细胞

【参 考 文 献】

[1] 陈治文,夏俊,胡守芬,等. 三氧化二砷对恶性黑色素瘤 A₃₇₅ 细胞的增殖抑制作用[J]. 中国药理学通报,2002,18(5): 567-569.

[2] 夏俊,陈俊霞,于丽华,等. 三氧化二砷抑制小鼠 B16 黑色素瘤生长作用及其机制[J]. 中国药理学通报,2004,20(9): 1 054-1 058.

[3] 马佳,沈继龙,黄桦,等. 三氧化二砷对鼠恶性黑色素瘤 B16 细胞凋亡的影响[J]. 蚌埠医学院学报,2006,31(3):233-234.

[4] Han SS, Kim K, Hahm ER, et al. Arsenic trioxide represses constitutive activation of NF-κB and COX-2 expression in human acute myeloid leukemia, HL-60[J]. J Cell Biochem,2005,94(4): 695-707.

[5] Mathas S, Lietz A, Janz M, et al. Inhibition of NF-κB essentially contributes to arsenic-induced apoptosis[J]. Blood,2003,102(3): 1 028-1 034.

[6] El-Sabban ME, Nasr R, Dbaibo G, et al. Arsenic-interferon-α-triggered apoptosis in HTLV-I transformed cells is associated with tax down-regulation and reversal of NF-κB activation[J]. Blood, 2000,96(8):2 849-2 855.

[7] Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, et al. NF-κB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation[J]. Science,1998,281(5 383):1 680-1 683.

[8] Scholz C, Wiedner T, Starck L, et al. Arsenic trioxide triggers a regulated form of caspase-independent necrotic cell death via the mitochondrial death pathway[J]. Oncogene,2005,24(11):1 904-1 913.

[9] Lemarie A, Morzadec C, Mérimo D, et al. Arsenic trioxide induces apoptosis of human monocytes during macrophagic differentiation through nuclear factor-κB-related survival pathway down-regulation[J]. J Pharmacol Exp Ther,2006,316(1):304-314.

中 RI 基因的表达,探讨不同乳腺癌细胞株中 RI 基因 mRNA 表达水平和蛋白表达变化,及其与肿瘤细胞恶性增殖之间的关系,以期为 RI 的实际应用提供进一步实验依据。

1 材料与方 法

1.1 材料 (1)细胞株:人乳腺癌细胞 MCF-7、SKBR-3、MDA-MB-231 由本实验室冻存。(2)试剂:二甲亚砜(DMSO)购自美国 Sigma 公司;四甲基偶氮唑蓝(MTT)上海生工生物工程公司(用 PBS 配制成 0.5 mol/L 浓缩液);RT-PCR 试剂盒(MBI Fermentas 公司);Trizol 试剂(Invitrogen 公司);兔抗人 RI 抗体由大连医科大学崔秀云教授惠赠,羊抗兔 IgG、羊抗鼠 IgG、 β -actin 抗体(北京中杉金桥公司)。(3)仪器:CO₂ 培养箱(日本科学株式会社);CX-201 超净工作台(蚌埠净化设备厂);FACSCalibur 流式细胞仪(FCM)(美国 BECTON DICKINSON 公司);PCR 扩增仪(日本 Astack 公司);Multiskan Ascent 酶标仪(芬兰);水平垂直电泳槽、电转移装置(美国 BIO-RAD 公司);DDY-I1131C 稳流电泳仪(北京六一仪器公司)。

1.2 细胞培养 人乳腺癌细胞 MCF-7、SKBR-3、MDA-MB-231 接种于含 10% 灭活小牛血清的新鲜高糖 DMEM 培养液中,置 37 °C,饱和湿度,5% CO₂ 培养箱中,2~3 天传代 1 次。所有实验操作均采用对数生长期的细胞。

1.3 细胞增殖检测 接种 2.0×10^3 细胞于 96 孔板中,含 200 μ l 培养基,每 24 h 后每孔加入 10 μ l MTT(5 g/L),4 h 后去上清,然后每孔加入 150 μ l DMSO,置摇床上常温下避光低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 492 nm 处测量各孔的吸光度值,每 24 h 检测 1 次,连续检测 6 次,每组均设 5 个复孔,重复 5 次,取平均吸光度值。

1.4 流式细胞术检测细胞周期 细胞经胰酶消化后,用 PBS 洗涤 2 遍,以 70% 乙醇固定过夜,离心弃乙醇,加 RNase 酶(25 g/L)1.5 μ l,37 °C 作用 2 h,再加 PI(50 μ g/ml)12 μ l,混匀,避光,放置冰上 30 min,取 1×10^6 个细胞上流式细胞仪检测。

1.5 RT-PCR 检测 RI 表达

1.5.1 总 RNA 抽提与 cDNA 链合成 用不含小牛血清的 DMEM 培养液洗涤收集的 MCF-7、SKBR-3、MDA-MB-231 细胞 2 遍,计数 5×10^6 细胞,加入 Eppendorf 管,离心沉淀后加 Trizol 试剂 1 ml,按操作提取总 RNA,取 2 μ l 总 RNA 溶于 48 μ l 经 DEPC 处理的水中,用紫外分光光度计测定其 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值,检测其纯度和浓度,取约 2 μ g RNA,按逆转录试剂

盒说明书操作合成 cDNA。

1.5.2 PCR 反应及扩增产物分析 引物 RI 和 GAPDH 引物由上海 Sangon 公司合成。序列及扩增长度见表 1。

表 1 引物序列及扩增长度

引物	序列	扩增长度
RI	上游:5'-TCCTGGACCACCGCCCTCGAGCCA-3'	110 bp
	下游:5'-TGGCAGAAATAAGCGGATCTGACCG-3'	
GAPDH	上游:5'-GGGAAGGTGAAGCTCGGACTC-3'	375 bp
	下游:5'-AGCAGAGGGGGCAGAGATGAT-3'	

25 μ l 反应体系中含 10 \times buffer 2.5 μ l, Mg²⁺ 2 μ l, dNTPs 1 μ l, cDNA 2 μ l, 上下游引物各 1 μ l(20 pmol/L), Taq 酶 1 μ l。RI 反应条件:95 °C 3 min 预变性,95 °C 45 s,57 °C 45 s,72 °C 延伸 1 min,33 个循环后 72 °C 终止平衡 10 min。GAPDH 反应条件:95 °C 3 min 预变性,95 °C 45 s,63 °C 45 s,72 °C 延伸 1 min,30 个循环后 72 °C 终止平衡 10 min。PCR 扩增产物分析:在 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳,琼脂糖凝胶电泳结果用 Smartview 凝胶成像系统扫描电泳条带,以特异性扩增产物条带灰度值(A)与 GAPDH 条带灰度值(A)之比做半定量,分析人乳腺癌细胞 MCF-7、SKBR-3、MDA-MB-231 中 RI 基因表达水平。

1.6 免疫细胞化学检测 RI 蛋白的表达 人乳腺癌细胞 MCF-7、SKBR-3、MDA-MB-231 培养于含 10% 小牛血清的高糖 DMEM 中,37 °C、5% CO₂ 温箱孵育。胰酶消化后做细胞爬片,乙醇固定,按 S-P 法染色,阴性对照用 PBS 替代一抗染色。

1.7 Western blot 检测 RI 蛋白表达 收集 4×10^6 个 MCF-7、SKBR-3、MDA-MB-231 细胞,用预冷的细胞蛋白裂解液(PMSF)裂解,按说明书操作提取总蛋白,取上清液 16 μ l,加 4 μ l 5 \times 上样缓冲液混匀煮沸 5 min 后上样,进行 SDS-PAGE(5% 浓缩液,10% 分离胶)电泳,70 V 电泳 3 h。电转移条件为 250 mA 湿转 3 h,将凝胶中的蛋白质转移至 PVDF 膜上。丽春红 S 染膜、考马斯亮蓝染胶,通过与蛋白 Marker 比较,确定目的条带位置。5% 脱脂奶粉封闭 2 h,一抗 4 °C 孵育过夜,充分洗膜,辣根过氧化物酶标记二抗 37 °C 孵育 1 h,充分洗膜, ECL 显色。兔抗 RI 抗体:1:300, β -actin 工作浓度为 1:500, 抗兔 IgG 二抗工作浓度 1:10 000, 抗鼠 IgG 二抗工作浓度 1:10 000, 结果经 Smartview 成像系统扫描条带,以目的条带灰度值(A)与 β -actin 灰度值(A)之比作半定量,分析 MCF-7、SKBR-3、MDA-MB-231 细

胞 RI 蛋白表达水平。

1.8 统计学方法 采用方差分析和 *q* 检验。

2 结果

2.1 MTT 检测 3 株乳腺癌细胞增殖情况 结果表明,从第 2 至第 4 天,MCF-7 细胞增殖速度均低于 MDA-MB-231 细胞和 SKBR-3 细胞 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$),而 MDA-MB-231 细胞与 SKBR-3 细胞增殖速度差异均无统计学意义 ($P > 0.05$) (见图 1、表 2)。

2.2 细胞周期分布情况 通过流式细胞仪检测细胞周期分布作为细胞增殖活力的另一指标,MDA-MB-231 细胞和 SKBR-3 细胞中 G_2 、S 期所占比例均

高于 MCF-7 细胞,而 MDA-MB-231 细胞和 SKBR-3 细胞中 G_1 所占比例低于 MCF-7 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$) (见图 2、表 3)。

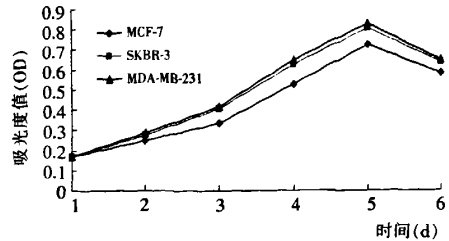


图 1 不同人乳腺癌细胞株细胞生长曲线

表 2 不同人乳腺癌细胞株细胞增殖速度比较 ($n_i = 5; \bar{x} \pm s$)

时间 (d)	MCF-7	SKBR-3	MDA-MB-231	F	P	MS _{组内}
1	0.169 5 ± 0.014 7	0.170 2 ± 0.015 9	0.170 4 ± 0.016 3	0.00	> 0.05	0.000 2
2	0.245 5 ± 0.019 7	0.275 1 ± 0.021 7	0.283 1 ± 0.025 4 *	3.91	< 0.05	0.000 5
3	0.335 6 ± 0.026 8	0.407 8 ± 0.036 7 **	0.417 5 ± 0.035 8 **	8.97	< 0.01	0.001 1
4	0.524 3 ± 0.041 9	0.625 9 ± 0.043 8 **	0.669 7 ± 0.061 0 **	11.29	< 0.01	0.002 5
5	0.724 6 ± 0.057 9	0.805 3 ± 0.072 5	0.828 1 ± 0.074 5	3.13	> 0.05	0.004 7
6	0.584 3 ± 0.046 7	0.637 5 ± 0.057 3	0.649 1 ± 0.051 9	2.20	> 0.05	0.002 7

q 检验:与 MCF-7 比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

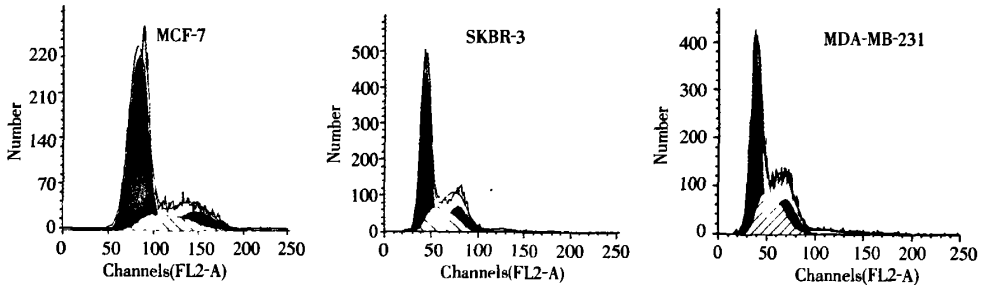


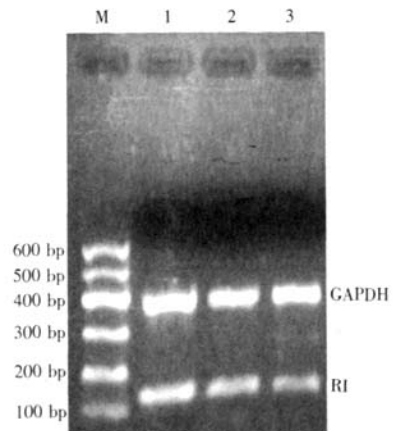
图 2 不同乳腺癌细胞株细胞周期分布

表 3 不同人乳腺癌细胞株细胞周期比较 ($n_i = 3; \bar{x} \pm s$)

分组	G_1 (%)	S (%)	G_2 (%)
MCF-7	73.17 ± 5.89	11.91 ± 0.84	14.94 ± 1.27
SKBR-3	58.10 ± 4.72 *	24.20 ± 1.95 **	17.70 ± 1.45
MDA-MB-231	54.57 ± 4.35 **	25.44 ± 2.05 **	19.99 ± 1.59 *
F	11.57	57.80	9.22
P	< 0.01	< 0.01	< 0.05
MS _{组内}	25.298	2.904	2.081

q 检验:与 MCF-7 比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.3 RT-PCR 结果 经 RT-PCR 扩增,2.0% 琼脂糖凝胶电泳后,凝胶成像分析可见 MCF-7 细胞 RI 基因 mRNA 的表达高于 MDA-MB-231 细胞和 SKBR-3 细胞 ($P < 0.01$);而 MDA-MB-231 细胞与 SKBR-3 细胞之间 mRNA 的表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (见图 3、表 4)。



M:Marker;1:MCF-7;2:SKBR-3;3:MDA-MB-231

图 3 不同乳腺癌细胞株 RI mRNA 表达

表4 RI mRNA 在不同乳腺癌细胞株中表达的变化 ($n_i = 3$; $\bar{x} \pm s$)

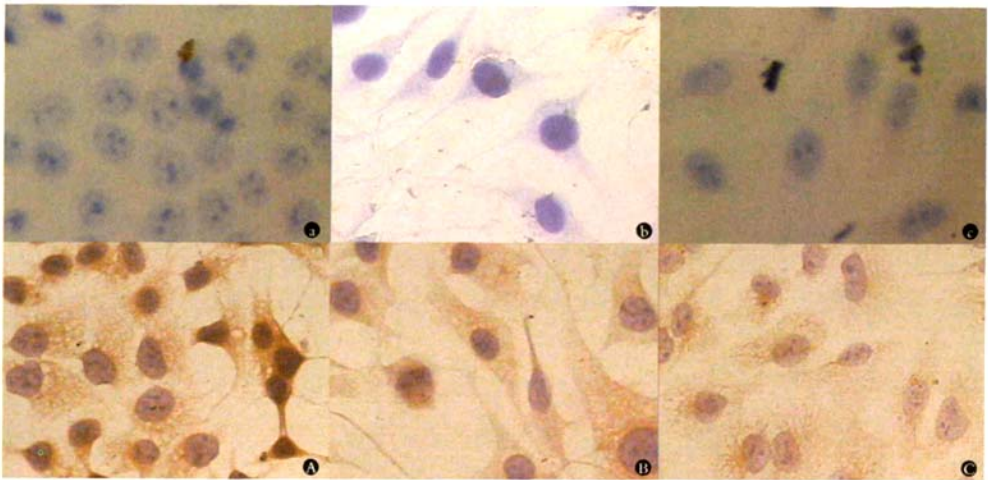
分组	RI mRNA/GAPDH mRNA	F	P	MS _{组内}
MCF-7	0.405 1 ± 0.042 4			
SKBR-3	0.318 3 ± 0.040 5 *	7.85	<0.05	0.001 4
MDA-MB-231	0.286 9 ± 0.029 3 *			

q 检验:与 MCF-7 比较 * $P < 0.05$

2.4 免疫细胞化学检测 RI 蛋白的表达 3 株乳腺癌细胞经细胞化学染色后,结果显示 MCF-7 细胞胞

质内有更深的棕色颗粒信号,可见 RI 在 MCF-7 细胞中的蛋白表达高于 MDA-MB-231 细胞和 SKBR-3 细胞(见图 4)。

2.5 Western blot 检测 RI 蛋白表达水平 经 Smartview 分析,MCF-7 细胞 RI 蛋白表达均高于 MDA-MB-231 细胞和 SKBR-3 细胞 ($P < 0.01$);而 MDA-MB-231 细胞与 SKBR-3 细胞之间 RI 蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (见图 5、表 5)。



a: MCF-7 阴性对照; b: SKBR-3 阴性对照; c: MDA-MB-231 阴性对照; A: MCF-7 阳性结果; B: SKBR-3 阳性结果; C: MDA-MB-231 阳性结果

图4 不同乳腺癌细胞株 RI 的蛋白表达(S-P法 ×400)

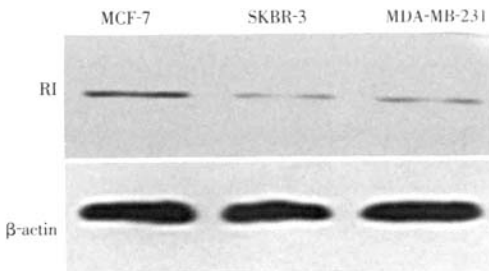


图5 不同乳腺癌细胞株 RI 的蛋白表达

表5 RI 蛋白在不同乳腺癌细胞株中表达的变化 ($n_i = 3$; $\bar{x} \pm s$)

分组	RI/ β -actin	F	P	MS _{组内}
MCF-7	0.283 7 ± 0.022 7			
SKBR-3	0.141 1 ± 0.012 8 **	81.74	<0.01	0.000 3
MDA-MB-231	0.129 6 ± 0.011 5 **			

q 检验:与 MCF-7 比较 * * $P < 0.01$

3 讨论

恶性增殖和转移是恶性肿瘤的特征之一,1971

年 Foluman 最早提出肿瘤生长是血管依赖性的。新生血管生成之前,肿瘤体积多不超过 $2 \sim 3 \text{ mm}^3$, 其所需氧和营养由细胞外基质通过弥散渗透方式提供,但此时所得营养是有限的,肿瘤的生长极为缓慢或不增长,可以处于原位癌状态。一定条件下,由于肿瘤的旁分泌作用产生多种血管生成肽以及微环境的多种细胞因子的作用,血管内皮细胞开始增殖并形成新的毛细血管。一旦新生血管形成,肿瘤所需氧和营养由血管灌注提供,肿瘤呈不可控制的生长、增殖,并沿新生血管转移,对人体形成严重危害。

RI 是核糖核酸酶 A (RNaseA) 的抑制剂,空间构象为“马蹄形”,恰好与“肾形”结构的 RNaseA 紧密结合,能有效地抑制其生物学活性。血管生长因子 (angiogenin, Ang) 是由肿瘤细胞和正常细胞分泌的分子量为 14.4 kDa 的蛋白质,在体内外均有强烈诱发血管生成的活性。根据 cDNA 序列分析,Ang 和 RNaseA 有 35% 的同源性,属 RNases 超家族的一员。由于 Ang 和 RNaseA 有着极其相似的立体结构,故 RI 能与 Ang 紧密结合。Ang 的表达能够促进肿瘤的生长^[4],目前认为 RI 抑制肿瘤生长及转移

的主要机制是与 Ang 结合后强烈抑制 Ang 的血管生成活性,抑制新生血管网的形成,从而抑制肿瘤生长和转移。有实验表明,在注射 RI 的动物实体瘤的坏死部位不是发生在瘤组织内部,而是发生在靠近外部的区域,这说明坏死不是由于肿瘤生长过盛供血不足引起的,而且注射 RI 的动物实体瘤血管数目明显减少,坏死面积明显增大^[5]。在恶性肿瘤组织内,RI 的表达量明显低于癌旁正常组织,但用 SSCP 法及一定的限制性内切酶分析未发现 RI 基因发生突变^[6,7],这表明肿瘤的生长可能与 RI 表达下降有关,由于 RI 表达下降,其直接抑制血管生成因子的能力下降,从而可能使癌组织周边新生血管的形成未受到有效抑制,未受到抑制的新生血管能够为肿瘤细胞不断提供营养物质,利于肿瘤的生长^[8]。RI 不仅是 RNaseA 的抑制剂,还具有抗氧化的作用,研究表明,RI 对 H₂O₂ 所导致的细胞过氧化损伤具有保护作用^[9],RI 是否具有预防肿瘤的作用有待于进一步研究。

本实验通过对 3 株人乳腺癌细胞株 MCF-7、MDA-MB-231、SKBR-3 中 RI mRNA 和蛋白的检测及 MCF-7、MDA-MB-231、SKBR-3 细胞增殖、细胞周期分布的检测,发现 MDA-MB-231、SKBR-3 细胞中 RI mRNA、蛋白含量低于 MCF-7 细胞,且 MDA-MB-231、SKBR-3 细胞增殖速度高于 MCF-7 细胞,由此可推测 RI 与人乳腺癌细胞的恶性增殖生长有一定的相关性。下一步本实验将用 RI 基因转染人乳腺

癌细胞,观察转染 RI 基因的人乳腺癌细胞与未转染的人乳腺癌细胞在细胞增殖、细胞凋亡、细胞转移能力的差异,进一步研究 RI 在抗肿瘤方面的作用。

[参 考 文 献]

- [1] 崔秀云. 核糖核酸酶抑制因子的结构及其功能[J]. 生命的化学, 1991, 11(3): 19-20.
- [2] 王 艇, 杨明洁, 王 钊, 等. 逆转录病毒载体介导 hRI 在小鼠模型中抑制黑色素瘤生长的研究[J]. 中国美容整形外科杂志, 2006, 17(4): 314-318.
- [3] Chen JX, Gao Y, Liu JW, et al. Antitumor effects of human ribonuclease inhibitor gene transfected on B16 melanoma cells [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005, 37(6): 1 219-1 231.
- [4] Katona TM, Neubauer BL, Iversen PW, et al. Elevated expression of angiogenin in prostate cancer and its precursors [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(23): 8 358-8 363.
- [5] 于秀萍, 高 颖, 田余祥, 等. 核糖核酸酶抑制因子对小鼠 S180 的抑制作用机制研究[J]. 实用肿瘤杂志, 1999, 14(1): 23-25.
- [6] 田余祥, 张 毅, 于秀萍, 等. 核糖核酸酶抑制因子基因在人乳腺癌组织中的表达及突变分析[J]. 肿瘤, 2002, 22(5): 402-404.
- [7] 卢行安, 段 莹, 王化丽, 等. 宫颈癌患者核糖核酸酶抑制因子基因突变的分析[J]. 中国微生态学杂志, 2007, 9(4): 347-350.
- [8] 许 凝, 孙 兵, 李继良. 核糖核酸酶抑制因子在肺癌中的表达[J]. 中国误诊学杂志, 2005, 5(3): 426-428.
- [9] 夏 俊, 阎 平, 陈俊霞, 等. 核糖核酸酶抑制因子对 H₂O₂ 所致的细胞过氧化损伤的保护作用[J]. 癌变·畸变·突变, 2005, 17(1): 4-7.

E-mail 投稿的要求及注意事项

由于网络的发展, E-mail 投稿已为越来越多的期刊编辑部所采用, 我刊也不例外。与传统信函邮寄投稿相比较, E-mail 投稿具有快捷、方便、直观和费用低廉等特点。为规范 E-mail 投稿, 确保其安全性, 我刊特作如下规定:

- 1 E-mail 投稿时, 必须把文章作为附件发送, 严禁将文章放在 E-mail 书写窗口内。
- 2 附件中的文章应为 Word 格式。书写时, 进入 Word 界面后, 应首先进入页面设置窗口设置页面, 参数如下: (1) 纸型为 A4; (2) 页边距上为 2.0 cm, 下为 2.0 cm, 左为 2.2 cm, 右为 2.0 cm; (3) 文档网格为每行 45 个汉字, 每页 40 行; (4) 字体为中文五号宋体。然后, 点击选择其它参数, 如“单倍行距”、“两端对齐”、“页面显示”等。
- 3 插图粘贴于正文相应位置中, 表格直接在正文中绘制; 标题与注释直接写于文章相应位置, 严禁以文本框形式插入。
- 4 E-mail 投稿时, 科研基金资助项目批准书和单位介绍信不要扫描放入 E-mail 内, 请另用信函邮寄至编辑部, 以方便存档。
- 5 请在 E-mail 附件内写明作者联系地址、邮政编码及联系电话, 主题中应注明“投稿”。