

[文章编号] 1007-3949(2007)15-08-0613-05

• 实验研究 •

人单核细胞上尿激酶型纤溶酶原激活物受体参与细胞迁移

陈未, 朱文玲, 方全, 陈连凤, 张抒扬, 陈太波, 刘震宇, 谢洪智

(中国医学科学院 中国协和医科大学 北京协和医院心内科, 北京市 100730)

[关键词] 医学细胞生物学; 尿激酶型纤溶酶原激活物受体; 单核细胞; 单核细胞趋化蛋白 1; 细胞迁移; 氨基末端; 分子间相互作用

[摘要] **目的** 研究单核细胞膜蛋白-尿激酶型纤溶酶原激活物受体在细胞迁移过程中的作用及相关机制。**方法** 采用密度梯度离心和粘附法分离、纯化人外周血单核细胞; 在单核细胞趋化蛋白 1 诱导下, 观察尿激酶型纤溶酶原激活物及其抗体、纤溶酶原激活物抑制剂 1 和尿激酶型纤溶酶原激活物受体抗体等因子对单核细胞迁移的影响。**结果** 在 25 $\mu\text{g/L}$ 单核细胞趋化蛋白 1 诱导下, 尿激酶型纤溶酶原激活物有促进单核细胞迁移的倾向, 迁移细胞由对照组的 179.40 \pm 38.49 升高至 251.00 \pm 26.11, $P = 0.076$; 尿激酶型纤溶酶原激活物抗体和纤溶酶原激活物抑制剂 1 对细胞迁移没有明显影响; 而尿激酶型纤溶酶原激活物氨基末端则抑制迁移的细胞数至 56.40 \pm 76.98, 与对照组比较, 差异有显著性 ($P < 0.01$)。加入抗尿激酶型纤溶酶原激活物受体抗体之后单核细胞迁移也受到抑制, 160 $\mu\text{g/L}$ 组迁移细胞数为 151.20 \pm 20.33, 与 10 $\mu\text{g/L}$ 组 (228.40 \pm 83.96) 比较显著降低 ($P < 0.05$)。**结论** 尿激酶型纤溶酶原激活物受体参与单核细胞趋化蛋白 1 诱导的单核细胞迁移, 尿激酶型纤溶酶原激活物氨基末端对迁移具抑制作用, 该作用甚至强于尿激酶型纤溶酶原激活物受体抗体, 提示单核细胞迁移中尿激酶型纤溶酶原激活物及其受体分子间相互作用的重要性。

[中图分类号] Q2

[文献标识码] A

Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor Expression in Monocytes Mediates Cell Migration

CHEN Wei, ZHU Wen-Ling, FANG Quan, CHEN Lian-Feng, ZHANG Shu-Yang, CHEN Tai-Bo, LIU Zhen-Yu, and XIE Hong-Zhi

(Department of Cardiology, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College; Beijing 100730, China)

[KEY WORDS] Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor; Monocytes; Monocyte Chemotactic Protein 1; Cell Migration; Amino Terminal Fragment; Molecular Interaction

[ABSTRACT] **Aim** To examine the roles of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR), a cellular receptor for the urokinase-type plasminogen activator (uPA) in monocytic migration induced by Monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1).

Methods Monocytes were separated and purified by density gradient centrifugation and adhering assay. MCP-1 were added into each lower chamber of Transwell^R at a concentration of 25 $\mu\text{g/L}$. In the upper chamber, monocytes were incubated with uPA antibody, uPAR antibody, uPA and Plasminogen Activator Inhibitor (PAI-1) respectively, the number of monocytes moved through Transwell^R membrane were calculated to detect their effect on cell migration.

Results uPA had a trend to promote monocytic migration, the number of migrated cells was increased from 179.40 \pm 38.49 of the control to 251.00 \pm 26.11, $P = 0.076$. PAI-1 and uPA antibody had no effect on cell migration, however the amino terminal fragment of uPA (ATF) significantly suppressed the cells to migrate through transwell, from 179.40 \pm 38.49 of the control to 56.40 \pm 76.98, $P < 0.05$. Similar result was observed in uPAR antibody, the number of migrated monocytes was decreased from 228.40 \pm 83.96 to 151.20 \pm 20.33, when the concentration of uPAR rised from 10 $\mu\text{g/L}$ to 160 $\mu\text{g/L}$, $P < 0.05$.

Conclusions uPAR, a membrane protein, participated in monocytic migration induced by MCP-1. The suppressive effect of ATF, which was stronger than that of anti-uPAR antibody, indicated that a specific uPA-uPAR interaction may play an important role in monocytic migration.

动脉粥样硬化发生发展过程中有多种炎症细胞浸润内膜, 其中单核细胞约占 80%, 淋巴细胞约

占 5% ~ 20%, 这些细胞的侵袭和迁移都需要趋化因子的作用。单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemotactic protein 1, MCP-1) 是由内皮细胞和平滑肌细胞分泌的细胞因子, 调节单核细胞进入内皮下^[1]。近年来发现单核细胞在多种因素刺激下能够表达尿激酶型纤溶酶原激活物 (urokinase plasminogen activator, uPA) 及其受体 (urokinase plasminogen activator recep

[收稿日期] 2007-05-26 [修回日期] 2007-07-16

[作者简介] 陈未, 博士, 主治医师, 研究方向为纤溶系统与冠心病发病机制, 联系电话为 13911363358 或 010-65295067, E-mail 为 chenwei0201@gmail.com。朱文玲, 学士, 主任医师, 研究方向为冠心病发病机制, 联系电话为 010-65295067, E-mail 为 zhuwenling@163.com。方全, 硕士, 主任医师, 研究方向为心脏电生理及心脏介入治疗, 联系电话为 010-65295062, E-mail 为 quanfang2002@yahoo.com.cn。

tor, uPAR), 而 uPA 和 uPAR 在一些实体癌的侵袭和转移中起重要作用。本研究探讨体外 MCP-1 诱导下, uPAR 如何参与人单核细胞迁移及其相关机制。

1 材料和方法

1.1 人外周血单核细胞的分离和鉴定

从 16 名健康志愿者分别抽取外周静脉血 20 mL, 用人淋巴细胞分离液(天津灏洋生物制品有限公司)分离出单个核细胞后用 RPMI 1640(GIBCOBRL 公司) + DMEM(GIBCOBRL 公司) + 10% 胎牛血清(fatal bovine serum, FBS, 杭州四季青生物工程材料公司) + 双抗培养基制成细胞悬液。置于 5% 二氧化碳, 37 °C 细胞培养箱 2 h 后换液一次, 再培养 24 h。用含 0.4% 乙二胺四乙酸(ethylene diaminetetracetate, EDTA)的培养基消化 3 min, 吹打均匀后制成悬液。台盼蓝法鉴定细胞活力; 用异硫氰酸荧光素(FITC)标记的小鼠抗人 CD14 单克隆抗体(CD14-FITC, BD 公司)染色涂片, 荧光显微镜(Nikon ECLIPSE 80i)下观察。

1.2 尿激酶型纤溶酶原激活物受体对单核细胞趋化蛋白 1 诱导的单核细胞迁移的影响

单核细胞分成下列实验组: 对照组用含 10% FBS RPMI-1640+ DMEM+ 双抗培养基进行培养; ④ 抗 uPA 组(单克隆鼠抗人 uPA, LabVision 公司)上室加入 10 mg/L(终浓度, 下同)的抗 uPA 抗体; ④uPA 组(人 uPA, Sigma 公司)上室加入 1 mg/L 的 uPA; 纤溶酶原激活物抑制剂 1(Plasminogen Activator Inhibitor, PAI-1)组(人重组 PAI-1, Chemicon International 公司)上室加入 10 mg/L 的 PAI-1; uPA 氨基末端(amino terminal fragment, ATF)组(uPA-ATF, Chemicon International 公司)上室加入 4 mg/L 的 ATF; 抗 uPAR 组(多克隆羊抗人 uPAR, Chemicon International 公司)上室分别加入 10 μg/L、20 μg/L、40 μg/L、80 μg/L 和 160 μg/L 的抗 uPAR 抗体。调节单核细胞悬液浓度为 $2 \times 10^5/L$, 在 Transwell^R 细胞培养室上室分别加入 80 μL 细胞悬液和相应浓度的刺激物, 总液体积量 100 μL; 上室预先孵育 8 h; 然后在下室加入培养基 400 μL, 下室中加入终浓度为 25 μg/L 的 MCP-1(重组人 MCP-1/CCL2, CYTOLAB 公司); 将上下室装配好孵育 72 h。清洗后 4% 多聚甲醛室温固定 15 min。用棉球反复擦拭、冲洗滤膜上室面; 切下滤膜, 下室面朝上置于载玻片上; 1: 2000 DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染色 30 min; 荧光显微镜下观察。

图像处理及计数方法: 荧光显微镜下每张滤膜随机选取 5 个视野进行照片, 相片用 Image J 软件处理, 测量背景图中聚碳酸酯膜上的微孔大小, 像素值为 300 ± 50 。故以像素 300 为界限, 小于 300 的不计算入颗粒数, 计数像素大于 300 的颗粒作为迁移的细胞数量。

1.3 细胞药物毒性实验

采用细胞计数试剂盒 8(Cell Counting kit 8, CCK8, Dojindo Laboratories), 将 80 μL 单核细胞悬液($2 \times 10^5/L$)种植在 96 孔板内。实验分组同上, 并设立对照组和各试验组再加 MCP-1 共同刺激组, 孵育 8 h 后, 共同刺激组加入 MCP-1, 所有组再培养 72 h。每组设 3 个复孔; 加 10 μL CCK-8 至每孔, 孵育 1.5 h; 在 450 nm 酶标仪读数。

1.4 统计学分析

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 11.5 软件进行统计分析, 符合正态分布时用方差分析, 多组数据多重比较时采用 LST 检验; 不符合正态分布的改用非参数检验方法 Wilcoxon Kruskal-Wallis 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞鉴定

在荧光显微镜下, 经过粘附分离和纯化的细胞均被 CD14-FITC 染成绿色, 提示为单核细胞(图 1)。

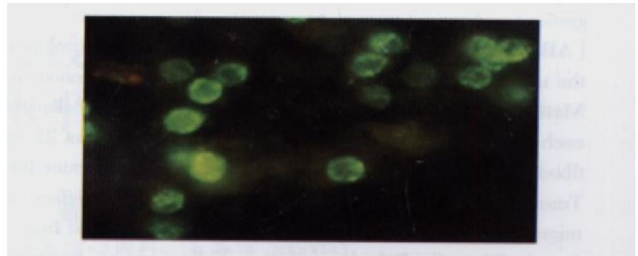


图 1. 单核细胞鉴定(10×60) 绿色为 CD 14-异硫氰酸荧光素阳性的单核细胞。

2.2 细胞毒性试验

与空白组比较, 抗 uPA、uPA、ATF、最大浓度 uPAR 和 MCP-1 组的光密度值(optical density, OD) 差异均无显著性; 各组加上 MCP-1 之后, OD 值有所升高, 但较单个刺激差异无显著性。

2.3 迁移结果

将单核细胞加入聚碳酸酯膜上室面后, 细胞在光镜下为圆形的球状, 这些单核细胞有聚集成团的特性(图 2)。单核细胞跨过微孔进入下室面, 可见部分细胞完全迁移穿出微孔, 分布于微孔周围; 少数

细胞尚未迁移出微孔, 将微孔填充; 也有的细胞部分跨过微孔, 滤膜下室面仅见细胞的一部分。

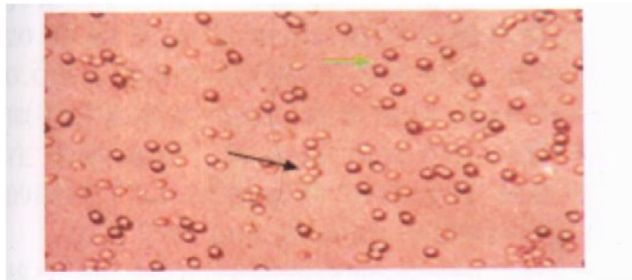


图 2. Transwell 上室中的单核细胞(10×10) 绿色箭头为 PC 膜上的微孔; 黑色箭头为上室面的单核细胞。

2.4 单核细胞趋化蛋白 1 对单核细胞的趋化作用

不加任何其它刺激因素时, MCP-1(-/+) 组迁移的细胞数为 179.40 ± 38.49 , 与 MCP-1(-/-)、MCP-1(+ /+) 两组比较, 差异均有显著性(表 1)。

表 1. 单核细胞趋化蛋白 1 对单核细胞趋化的影响($\bar{x} \pm s$)

| MCP-1(上室/下室) | 迁移的细胞数 |
|--------------|----------------------|
| MCP-1(-/-) | 113.40 ± 27.63 |
| MCP-1(-/+) | 179.40 ± 38.49^a |
| MCP-1(+ /+) | 109.40 ± 36.86 |

a 为 $P < 0.05$, 与其它两组比较。

2.5 不同刺激因素对单核细胞趋化的影响

用 1 mg/L 的 uPA 和 10 mg/L 的 PAF-1 孵育单核细胞后, 对 MCP-1 导致的单核细胞迁移均无显著影响, 但 uPA 有促进单核细胞迁移的倾向, 迁移细胞由对照的 179.40 ± 38.49 升高至 251.00 ± 26.11 , $P = 0.076$ 。uPA 的氨基末端可以和 uPAR 特异性结合, 当用鼠抗人 uPA 的单克隆抗体孵育单核细胞后, 对单核细胞的迁移的影响较对照组差异无显著

性, 抗 uPA 组为 209.20 ± 76.65 , 对照组为 179.40 ± 38.49 ; 但是当给予 ATF 孵育之后, 单核细胞的迁移受到了抑制, 由对照组的 179.40 ± 38.49 降至 ATF 组的 56.40 ± 76.98 , ($P < 0.01$; 表 2, 图 3)。

表 2. 不同刺激因素对单核细胞迁移的影响($\bar{x} \pm s$)

| 分 组 | 迁移细胞数 |
|---------|---------------------|
| 抗 uPA 组 | 209.20 ± 76.65 |
| uPA 组 | 251.00 ± 26.11 |
| PAF-1 组 | 194.00 ± 65.65 |
| ATF 组 | 56.40 ± 76.98^a |
| 对照组 | 179.40 ± 38.49 |

a 为 $P < 0.01$, 与其它组比较。

2.6 不同浓度抗尿激酶型纤溶酶原激活物受体抗体对单核细胞趋化的影响

当单核细胞和不同浓度的 uPAR 抗体进行孵育之后, 随着 uPAR 抗体浓度的递增, 单核细胞的迁移呈递减的变化。uPAR 抗体浓度最高组迁移的细胞数为 151.20 ± 20.33 , 较 uPAR 抗体浓度最低组细胞数 228.40 ± 83.96 显著降低($P < 0.05$; 表 3, 图 4)。

表 3. 不同浓度抗尿激酶型纤溶酶原激活物受体抗体对单核细胞趋化的影响($\bar{x} \pm s$)

| uPAR 浓度 ($\mu\text{g/L}$) | 迁移细胞数 |
|-----------------------------|----------------------|
| 10 | 228.40 ± 83.96 |
| 20 | 198.80 ± 39.51 |
| 40 | 184.80 ± 51.99 |
| 80 | 176.00 ± 50.61 |
| 160 | 151.20 ± 20.33^a |

a 为 $P < 0.05$. 与 10 $\mu\text{g/L}$ 组比较。

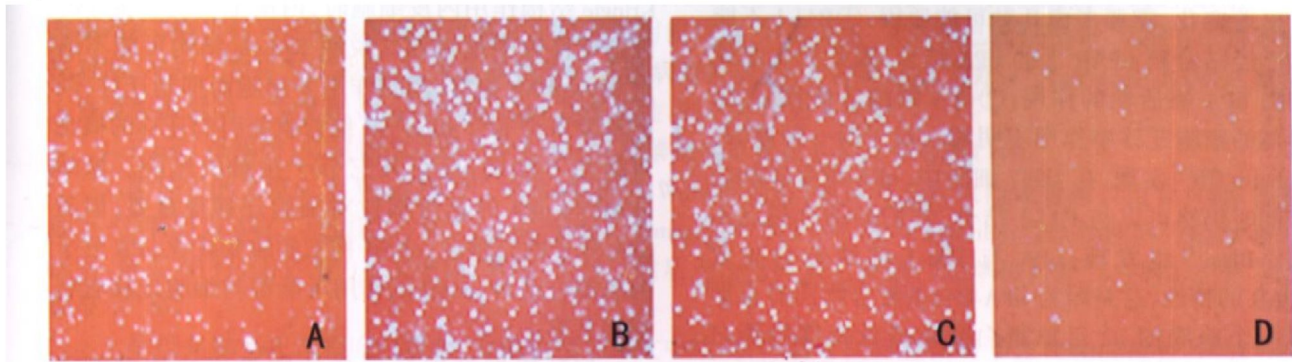


图 3. 不同刺激因子对单核细胞迁移的影响(10×10) A、B、C 和 D 分别为在上室中加入了 10 mg/L 抗尿激酶型纤溶酶原激活物抗体, 1 mg/L 尿激酶型纤溶酶原激活物, 10 mg/L 纤溶酶原激活物抑制剂 1 和 4 mg/L 尿激酶型纤溶酶原激活物氨基末端后迁移到聚碳酸酯膜下室面的细胞核的荧光照片。

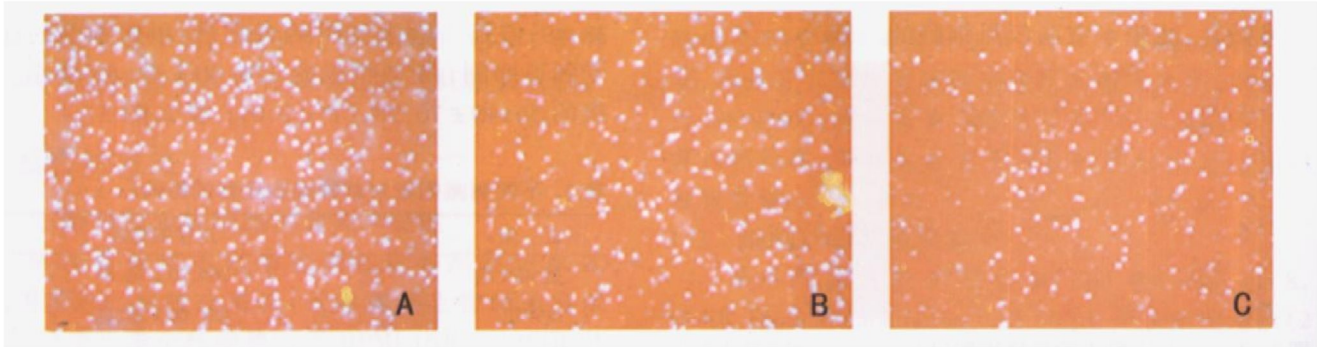


图 4. 不同浓度的尿激酶型纤溶酶原激活物受体抗体对单核细胞迁移的影响(10×10) A、B、C 分别为加入尿激酶型纤溶酶原激活物受体抗体 20 μg/L、40 μg/L 和 80 μg/L 后迁移到聚碳酸酯膜下室面的细胞核荧光照片。

3 讨论

尿激酶型纤溶酶原激活物受体位于单核/巨噬细胞等多种正常细胞和一些癌细胞表面,在迁移面的细胞膜处 uPAR 大量表达,分布具有极性^[2,3]。uPAR 配体除 uPA 外,还有玻璃体粘连蛋白(vitronectin, VN)、整合素等^[4,5]。单核细胞粘附于内皮并进入内膜是动脉粥样硬化形成中的关键步骤之一,内皮细胞和平滑肌细胞分泌的 MCP-1 对单核细胞具有很强的趋化作用^[1]。uPAR 系统(包括 uPA、uPAR、PAF-1 和 uPAR 抗体等)在 MCP-1 诱导的单核细胞迁移中扮演怎样的角色,值得深入探讨。

尿激酶型纤溶酶原激活物与细胞表面的 uPAR 特异性结合位点在 uPA 氨基末端中的生长因子模体中,两者的结合有很高亲和性。uPA 和 uPAR 的相互作用造成 uPAR 构型改变,使之不仅具有受体功能,即在细胞表面特定部位限定 uPA 的蛋白酶解活性;而且参与调节细胞粘附和迁移。本实验发现,加入外源的 uPA 之后,单核细胞的迁移有增加的趋势。加入 PAF-1 之后单核细胞的迁移与对照比较没有显著变化,需要考虑几种可能原因: PAF-1 不能和已经结合到 uPAR 上的 uPA 结合,因此无法起到抑制 uPA 酶活性的作用;④uPA 的酶活性在 uPAR 参与的细胞迁移中作用不明显。对于前一种原因, Cubellis 等^[6]发现,在 U937 细胞中, uPA 与受体的结合时仍然可以与 PAF-1 结合,它们的结合位点不同。Blasi^[7]也发现: uPA 与 PAF-1 的结合会改变 uPAR 的特性,这是因为 uPA-PAF-1 复合物同时也形成一个跨膜的 α2 巨球蛋白受体或低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)受体相关蛋白(LDL related protein, LRP)的结合位点,由于 uPAR 和 LRP 的联合, uPA-PAF-1 复合物被细胞内吞降解,而 uPAR 可以通过循环重新返回细胞膜实现再分布。因此

PAF-1 可以与结合受体的 uPA 作用,而且促进了 uPA 的清除。对于第二个原因,研究发现在 uPA 基因敲除的小鼠中,巨噬细胞的趋化显著下降, uPA 和 uPAR 的结合是细胞迁移的必要条件;而不具有酶活性的 uPA 氨基末端即 ATF,也能够显著影响 uPAR 介导的细胞迁移,说明 uPA 的酶活性并不是细胞迁移所必需的。因此加入 PAF-1 之后细胞迁移并没有显著影响。

尿激酶型纤溶酶原激活物由氨基端的生长因子, Kringle 结构域(形态上类似于丹麦馅饼的结构,由三个二硫键连接成的双环状多肽)和氮末端的蛋白酶结构域组成。生长因子负责 uPA 与其受体 uPAR 的结合。该结合能促进趋化作用,那么为什么在本研究中另外加入 uPA 氨基末端(ATF)后,细胞的迁移被显著抑制呢?可能的原因为: ATF 作为阻断剂抑制了 uPA 完整分子和 uPAR 之间的作用;④ATF 包括两个组成部分:生长因子和 Kringle, Kim 等^[8]研究认为生长因子才是真正与受体结合的部位,而 Kringle 结构不能与 uPAR 直接结合,当用单纯 Kringle 结构作用内皮细胞时,内皮生长因子诱导的细胞迁移被明显抑制。说明 Kringle 结构可能不通过 uPA-uPAR 途径,间接作用于细胞而抑制迁移,因此单纯认为 uPA 和 uPAR 结合就能引起迁移的概念可能并不准确,还受其它分子接触的影响。虽然 uPAR 与 uPA 的结合部位对细胞迁移很重要,但是 uPA 分子的完整性、uPAR 构型的改变或者 uPA 分子的非结合区对 uPAR 的作用可能都与细胞迁移有密切的关系。

尿激酶型纤溶酶原激活物受体抗体抑制了 MCP-1 诱导的单核细胞迁移,具有浓度依赖的特点。uPAR 抗体与 uPAR 特异性结合,同样阻断了 uPA 与 uPAR 的相互作用,因此抑制了细胞的迁移,但是如

果将本实验中最高浓度的 uPAR 抗体组与 ATF 组进行比较会发现两组的迁移细胞数分别为 151.20 ± 20.33 和 56.40 ± 76.98 , 差异仍然具有显著性 ($P=0.016$), 这说明虽然都是阻断受体, 氨基末端的阻断似乎更彻底更完全。这是因为 uPAR 介导的趋化存在“旁路激活”, 与 uPAR 抗体相比, ATF 可能更彻底的阻断了 uPAR 的这种“旁路激活”的作用。

通过干预 uPA 和 uPAR 来抑制粥样硬化早期单核/巨噬细胞的迁移和侵袭, 是否能够延缓粥样硬化的发生, 是值得深入探讨的课题。从肿瘤转移研究结果看到, 干预 uPA 和 uPAR 的表达后肿瘤转移受到了显著抑制, 例如: 应用 uPAR 单克隆抗体或针对 uPA-uPAR 结合位点的多肽样物质可以抑制 uPA、uPAR 表达, 从而显著抑制肿瘤的生长和转移^[9-11], 暗示了通过干预 uPAR 系统来调节单核细胞功能, 从而有可能预防和治疗动脉粥样硬化的意义和前景。本研究的不足之处在于细胞迁移过程中应用的 uPA 及其抗体、PAI-1 等刺激因子参考了相关文献中的常用浓度, 未进行浓度梯度的探索, 有待进一步完善补充。

[参考文献]

[1] Navab M, Imes SS, Hama Y S, Hough P G, Ross A L, Bork R, et al. Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in Cocultures of human wall cells is due to induction of monocyte chemoattractant protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein [J]. *Clin Invest*, 1991,

88 (6): 2 039-046.

- [2] Steins MB, Padr T, Schwaenen C, Ruiz S, Mesters MR, Berdel WE, et al. Overexpression of Urokinase Receptor and Cell Surface Urokinase-type Plasminogen Activator in the Human Vessel Wall with Different Types of Atherosclerotic Lesions [J]. *Blood Coagul Fibr*, 2004, 15 (5): 383-391.
- [3] Raghunath PN, Tomaszewski EJ, Brady ST, Caron J R, Okada SS, and Barnathan SE. Plasminogen Activator System in Human Coronary Atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, 15 (9): 1 432-443.
- [4] Kanse MS, Chavakis T, AfFakhri N, Hersenmeyer K, Monard D, Preissner TK. Reciprocal regulation of Urokinase Receptor (CD87)-mediated Cell Adhesion by Plasminogen Activator Inhibitor-1 and Protease Nexin-1 [J]. *J Cell Sci*, 2003, 117 (3): 477-485.
- [5] Solberg H, Lober D, Eriksen J, Ploug M, Ronne E, Behrendt N, et al. Identification and Characterization of the Murine Cell Surface Receptor for the Urokinase-type Plasminogen Activator [J]. *Eur J Biochem*, 1992, 205 (2): 451-458.
- [6] Cubellis VM, Andreassen P, Ragno P, Mayer M, Dano K, and Blasi F. Accessibility of Receptor-bound Urokinase to type 1 Plasminogen Activator Inhibitor [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1989, 86 (13): 4 828-832.
- [7] Blasi F. The Urokinase Receptor: a cell surface, regulated chemokine [J]. *APMIS*, 1999, 107 (1): 96-101.
- [8] Kim KS, Hong YK Lee, Shin JY, Chang SI, Chung S II. Differential Inhibition of Endothelial Cell Proliferation and Migration by Urokinase Subdomains: Amino terminal Fragment and Kringle Domain [J]. *Exper Mol Med*, 2003, 35 (6): 578-585.
- [9] Pulkuri SM, Gondi CS, Lakka SS, Jutla A, Estes N, Gujrati M, et al. RNA interference directed knockdown of urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor inhibits prostate cancer cell invasion, survival, and tumorigenicity in vivo [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280 (43): 36 529-540.
- [10] Margheri F, D' Alessio S, Serrati S, Pucci M, Annunziato F, Cosmi L, et al. Effects of Blocking Urokinase Receptor Signaling by Antisense Oligonucleotides in a Mouse Model of Experimental Prostate Cancer Bone Metastases [J]. *Gene Ther*, 2005, 12 (8): 702-714.
- [11] Rabbani SA, Glady J. Urokinase receptor antibody can reduce tumor volume and detect the presence of occult tumor metastases in vivo [J]. *Cancer Res*, 2002, 62 (8): 2 390-397.

(此文编辑 李小玲)

•读者•作者•编者•

关于 E-mail 投稿的要求及注意事项

本刊编辑部

由于网络的发展, E-mail 投稿已为越来越多的期刊编辑部采用, 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、直观等特点, 且费用低廉。然而, 在接受 E-mail 投稿过程中我们发现, 稿件文本不一, 格式各异。有些甚至直接将文章放在书写窗口内, 经过传输, 文章早已面目全非, 又没有纸打印稿作对照, 不知文章里写了些什么, 尤其是当今计算机病毒肆虐, 新的病毒层出不穷, 一不小心染上病毒, 整个文件就要被删除。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: 纸型为 A4; ④页边距上为 2.0 mm, 下为 2.0 mm, 左为 2.2 mm, 右为 2.0 mm; ④文档网格为每行 45 个汉字, 每页 40 行; 字体为中文宋体、常规、五号。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正文相应位置, 严禁以文本框形式插入。

4、E-mail 投稿时, 严禁把科研基金资助项目批准书的复印件和单位介绍信扫描放入 E-mail 内, 请另用信函形式邮寄编辑部, 以方便存档。

5、请在 E-mail 附件内写明联系方式。