

聚乙二醇—聚乙烯亚胺介导小干扰 RNA 体外转染神经干细胞的研究

梁嫣然 刘中霖 毕伟 帅心涛 王伟伟 陶恩祥

【摘要】 目的 研究聚乙二醇-聚乙烯亚胺 (PEG-PEI) 作为非病毒纳米载体介导小干扰 RNA (siRNA) 体外转染 C17.2 NSCs 的效果。**方法** 采用自行设计合成的 PEG-PEI 与靶向 Nogo 受体复合体基因的 siRNA 形成复合物, 通过粒径与电位的测定、凝胶阻滞电泳实验等方法观察 PEG-PEI/siRNA 纳米复合物的表征及复合效果。以脂质体复合体系 Lipofectamine 2000/siRNA 为对照, 采用流式细胞仪检测不同 N/P 比 (PEG-PEI 中氮原子和 siRNA 中磷原子的摩尔比) 的 PEG-PEI/siRNA 复合物对 NSCs 的转染效率。**结果** PEG-PEI 和 siRNA 形成粒径为纳米级别的复合物, 随着 N/P 比增大, 复合物的粒径逐渐减小, 而表面电位逐渐增大。凝胶阻滞电泳实验表明 siRNA 与 PEG-PEI 可以通过静电相互作用而稳定结合。流式细胞仪检测细胞转染率后发现, N/P=15 时, PEG-PEI/siRNA 复合物转染率最高, 可达 (78.72±8.18)%。**结论** PEG-PEI 是一种有良好发展前景的非病毒型 siRNA 转运载体, 对神经干细胞基因治疗具有潜在的应用价值。

【关键词】 神经干细胞; 转染; 共聚物; 载体

【中图分类号】 Q26 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1671-8925(2011)08-784-05

Delivery of small interfering RNA into neural stem cells mediated by polyethylene glycol - polyethyleneimine in vitro LIANG Yan-ran*, LIU Zhong-lin*, BI Wei, SHUAI Xin-tao, WANG Wei-wei, TAO En-xiang*. *Department of Neurology, Sun Yat-sen Memorial Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China

Corresponding author: LIU Zhong-lin, Email: zhonglinliu@126.com

【Abstract】 Objective To explore the effect of polyethylene glycol-polyethyleneimine (PEG-PEI) serving as a non-viral vector in delivering small interfering RNA (siRNA) into C17.2 neural stem cells (NSCs) in vitro. **Methods** Complexes of PEG-PEI and siRNA targeting Nogo receptor were prepared, and their characterizations were estimated by measurements of particle size and zeta potential, and the complex abilities of PEG-PEI/siRNA complexes were observed by gel retardation assay. In addition, with liposome complex system (Lipofectamine 2000/siRNA) as positive control, the transfection efficiency of PEI-PEG/siRNA complexes at different N/P ratios (cationic nitrogen/siRNA phosphate molar ratio) was detected by flow cytometry. **Results** The siRNA molecules were condensed by PEG-PEI to form nanoscale complexes. As the proportion of N/P ratio enhancing, the surface potential of nanoparticles gradually increased and the particle sizes of PEI-PEG/siRNA complexes showed a decreasing trend. Gel retardation electrophoresis suggested that siRNA could be fully composited with PEG-PEI as a result of the coulombic force between them. Meanwhile, flow cytometry experiments revealed that the transfection efficiency of PEG-PEI mainly depended on N/P ratios of the nanoparticles, and the highest one was obtained at N/P=15 [(78.72±8.18)] %. **Conclusion** PEG-PEI might be a prospective candidate for siRNA delivery system, which enjoys its value in NSC gene therapy.

【Key words】 NSC; Transfection; Copolymer; Carrier

DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-8925.2011.08.007

基金项目:国家自然科学基金(81000466);广东省自然科学基金(8151008901000027);教育部博士点新教师基金(200805581126)

作者单位:510120 广州,中山大学孙逸仙纪念医院神经内科(梁嫣然、刘中霖、陶恩祥);510275 广州,中山大学化学与化学工程学院(帅心涛、王伟伟);510630 广州,暨南大学附属第一医院神经内科(毕伟)

通信作者:刘中霖,Email:zhonglinliu@126.com

中枢神经系统再生研究对老年性痴呆、帕金森病等神经退行性疾病与脑卒中、脊髓横断等神经损伤性疾病的治疗具有重要价值^[1-2]。自神经髓鞘相关抑制分子 Nogo-A 蛋白、髓磷脂相关糖蛋白(myelin-associated glycoprotein, MAG)和少突胶质细胞髓磷脂糖蛋白(oligodendrocyte myelin glycoprotein, Omgp)的共同受体—Nogo 受体复合体(Nogo receptor, NgR)被发现以来,就被视为抑制神经再生的信号通路会聚点而受到学者们的广泛关注。调节 NgR 表达与调控的基因治疗成为研究神经再生的热点^[3]。人们希望通过近年来新兴的 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术,高效、特异地沉默 NgR 基因的表达,下调其抑制神经再生的功能,为中枢神经系统疾病提供新颖高效的治疗手段。

本研究设计并合成新型的输送小干扰 RNA (siRNA) 至细胞的载体聚乙二醇—聚乙烯亚胺(polyethylene-glycol-polyethyleneimine, PEG-PEI), 通过粒径与电位的测定、凝胶阻滞电泳研究其与靶向 NgR 基因的 siRNA 形成稳定复合物的能力, 并检测了 PEG-PEI/siRNA 纳米复合体转染 C17.2 NSCs 的转染效率, 以期为 NSCs 基因治疗研究奠定基础。

材料与方法

一、实验材料与仪器

C17.2 NSCs 由本实验室保存, 兔抗小鼠 nestin 抗体、FITC 标记的羊抗兔 IgG 购自武汉博士德生物工程有限公司, 琼脂糖购自日本 TaKaRa 公司, 脂质体 lipofectamine2000(Lipo2000)购自美国 Invitrogen 公司, 靶向小鼠 NgR mRNA 的 siRNA 双链和荧光 siRNA 由上海吉玛公司进行设计合成, 支化聚乙烯亚胺 PEI(相对分子质量为 25 000)、单甲基醚聚乙二醇 mPEG-OH(相对分子质量为 2000)和 N- 羟基琥珀酰亚胺(NHS)购自美国 Sigma-Aldrich 公司, N, N'- 二环己基碳二亚胺(DCC)购自国药集团化学试剂有限公司, 透析袋(截留分子量为 3500)购自上海绿鸟公司。

FACS Calibur 流式细胞仪购自美国 Becton Dickinson 公司, UVI DOC 系列凝胶成像系统购自英国 Uvitec 公司, Ti-S 倒置荧光显微镜购自日本尼康公司。

二、实验方法

(一)C17.2 NSCs 的培养与鉴定

1. C17.2 NSCs 的培养: 方法详见参考文献[4]。
2. C17.2 NSCs 的鉴定: 常规细胞免疫化学方法

检测 NSCs 标志物神经 nestin。将合适数量的 C17.2 NSCs 接种于 24 孔板内, 贴壁 24 h 后细胞爬片约长满 70%, 用 40 g/L 多聚甲醛固定 10 min, 1% tritonX-100 孵育 30 min, 25% 正常血清封闭 30 min, 一抗选用兔抗小鼠 nestin 抗体, 二抗为 FITC 标记的羊抗兔 IgG。PBS 替代一抗作为阴性对照。DAPI 标记核。

(二)PEG-PEI 纳米材料的合成

把 5 g (2.5 mmol)mPEG-OH 真空干燥后, 用 20 mL 干燥三氯甲烷溶解, 再加入 1.25 g (12.5 mmol) 丁二酸酐, 70 ℃ 搅拌回流反应 48 h, 制得单甲基醚聚乙二醇丁二酸酯 (mPEG-SA); 再将 4.0 g (2.0 mmol) PEG-SA 用 0.46 g (4.0 mmol) NHS 和 0.82 g (4.0 mmol) DCC 室温搅拌反应 24 h 活化羧基, 得到中间产物 PEG-NHS。称取 2.5 g (0.1 mmol) 支化聚乙烯亚胺(hy-PEI)(相对分子质量为 2500)溶于 20 mL PBS (pH7.4)中, 然后加入 2 g (1 mmol) 活化的单甲基醚聚乙二醇丁二酸酯, 室温搅拌反应 24 h, 用透析袋在蒸馏水中透析 48 h 后冷冻干燥, 得到白色粉末状产物 PEG-PEI。

(三)PEG-PEI/siRNA 复合物的制备

根据不同的 N/P 比 (即纳米复合物中 PEG-PEI 中氮原子和 siRNA 中磷原子的摩尔比), 用去离子水稀释相应量的 PEG-PEI, 再与被去离子水稀释的 siRNA 混合, 涡旋振荡, 室温静置 30 min, 从而获得均匀的 PEG-PEI /siRNA 复合物。

(四)PEG-PEI/siRNA 复合物的物理性能检测

1. 粒径和 Zeta 电位测定: 取按照不同 N/P 比复合的 PEG-PEI/siRNA 复合物, 用去离子水稀释至 1.5 mL, 室温静置 30 min, 用 ZETA 电位及粒度分析仪(美国 Brookhaven 公司)测定粒径及 Zeta 电位, 重复实验 3 次。

2. 琼脂糖凝胶电泳阻滞实验: 将 40 pmol 的 siRNA 与 PEG-PEI 阳离子共聚物按照不同的 N/P 比(分别为 1、5、10、15、30、50)在去离子水中形成复合物, 室温静置 30 min。样品上样液组成: 18 μL 纳米复合物, 2 μL 10×胶体金, 2 μL 10×上样缓冲液。电泳条件: 1% 琼脂糖, 0.5×TBE 缓冲液, 电压 80 V, 电泳时间 30 min。在紫外凝胶成像仪上观察电泳结果并照相。

(五)细胞转染率测定

将 C17.2 NSCs 细胞接种到 12 孔板上, 密度为 20 000 个细胞 / 孔, 培养 24 h 后, 细胞汇合达 30%~50%, 用去离子水稀释相应量的 PEG-PEI(按 N/P=5、10、15、30), 与被去离子水稀释的 40 pmol FAM 标

记的 siRNA 混合,室温避光静置 30 min。转染前吸去旧的细胞培养液,每孔加入无 FBS 的 DMEM 高糖培养液 0.9 mL 与 100 μ L PEG-PEI/siRNA 复合物,细胞培养箱中培养 4 h 后,吸去转染复合物,加入含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液继续培养 20 h,转染后用 PBS 冲洗,再用 0.25 g/L 胰酶/EDTA 消化液将细胞消化下来,用 PBS 重悬细胞,转染率为流式细胞仪上每 10 000 个细胞中发荧光的细胞数。本实验以 Lipo2000/siRNA 脂质体复合物为对照组。转染操作前 24 h 接种好与实验组相同密度的 C17.2 NSCs,转染时根据 Lipo2000 说明书,取 2 μ L 的 Lipo2000 与 40 pmol FAM 标记的 siRNA 混合后进行细胞转染,4 h 后重新换入新鲜的与实验组相同的细胞培养液,继续培养 20 h 后送流式细胞仪检测转染率。

三、统计学分析

应用 SPSS16.0 软件进行统计学分析,计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,方法采用单因素方差分析及 SNK-q 检验, $P\leq 0.05$ 示差异有统计学意义。

结 果

一、C17.2 NSCs 鉴定结果

C17.2 NSCs 经传代接种后贴壁迅速,进入对数增殖期后,在荧光显微镜下可以观察到呈现多种不同形态的细胞,大部分为三角形及多角形,少数呈圆形。经 nestin 免疫荧光染色后,NSCs 胞质部分显现出绿色荧光,DAPI 染色后呈蓝色荧光(图 1)。

二、聚合物 PEG-PEI 的合成

通过 Mercury-Plus300 超导核磁共振波谱仪($^1\text{H-NMR}$)表征合成的共聚物 PEG-PEI,显示出质子特征化学位移: $\delta 3.4$ ppm 和 $\delta 3.63$ ppm 分别对应于 PEG 链上 $\text{CH}_3\text{O-}$ 和 $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ 质子的化学位移, $\delta 2.4\sim 2.8$ ppm 对应于 PEI 链上 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH-}$ 亚甲基的化学位移。由积分峰面积计算出 PEG 与 PEI 的摩尔比为 10:1。

三、PEG-PEI/siRNA 复合物的物理性能检测

1. 粒径和 Zeta 电位的测量: 不同 N/P 比的 PEG-PEI/siRNA 复合物粒径及 zeta 电位不同,详情见表 1。随着 N/P 值的不断增大,复合物的粒径逐渐减小, N/P=5 时为 (392.1 $\pm$ 92.8) nm 左右,此时 PEG-PEI 与 siRNA 的静电复合能力很弱,故粒径很大;随着 N/P 增大粒径逐渐减少,到 N/P=30,粒径为 (133.5 $\pm$ 1.7) nm。

Zeta 电位随着 N/P 增大粒径逐渐增大, N/P=5 时约为 (3.2 $\pm$ 2.5) mV,仅带有微弱的正电;到 N/P=30

时,PEG-PEI/siRNA 复合物的电位已增至 (25.6 $\pm$ 1.3) mV。从粒径和电位数据可知,随着 N/P 比增大,PEG-PEI/siRNA 复合物越来越稳定。

2. 琼脂糖凝胶电泳阻滞实验: 不同 N/P 比的 PEG-PEI 与 siRNA 具有不同的静电复合作用,可使用琼脂糖凝胶电泳法检测两者的结合效率。以裸 siRNA 组为对照组,从 N/P=1 开始,电泳条带亮度逐渐减弱,当 N/P=15 时,向正极泳动的条带基本消失,阻滞在加样孔内,此时 siRNA 已经完全被 PEG-PEI 复合(图 2)。

四、细胞转染实验

转染 24 h 后将不同实验组的细胞消化下来,使用流式细胞仪检测发荧光的阳性细胞率,结果如图 3 所示,红色曲线代表作为参照的未经转染的 NSCs 群,蓝色曲线代表经转染后的 NSC 群,蓝色曲线与横轴之间的面积代表细胞总数目,以 M1 划分出荧光细胞群体,转染率 = 进入 M1 区域的蓝色曲线下的面积 / 整条蓝色曲线下的面积。

当 N/P=5、10、15、30 时,细胞转染率分别为 4.60 $\pm$ 1.66、60.64 $\pm$ 5.65、78.72 $\pm$ 8.18、70.02 $\pm$ 7.06, Lipo2000 组细胞转染率为 73.94 $\pm$ 3.74,各组细胞转染率的差异

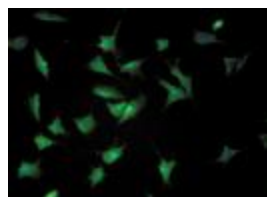


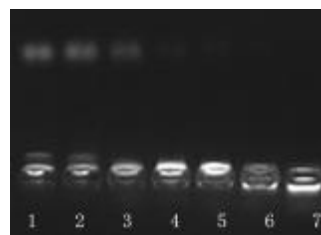
图 1 C17.2 NSCs nestin 免疫荧光染色($\times 200$)

Fig.1 Nestin positive cells with FITC immunocytochemistry ($\times 200$)

表 1 PEI-PEG/siRNA 复合体的粒径及表面电位($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Tab.1 Particle size and zeta potential of different PEG-PEI/siRNA complexus (Mean $\pm$ SD, $n=3$)

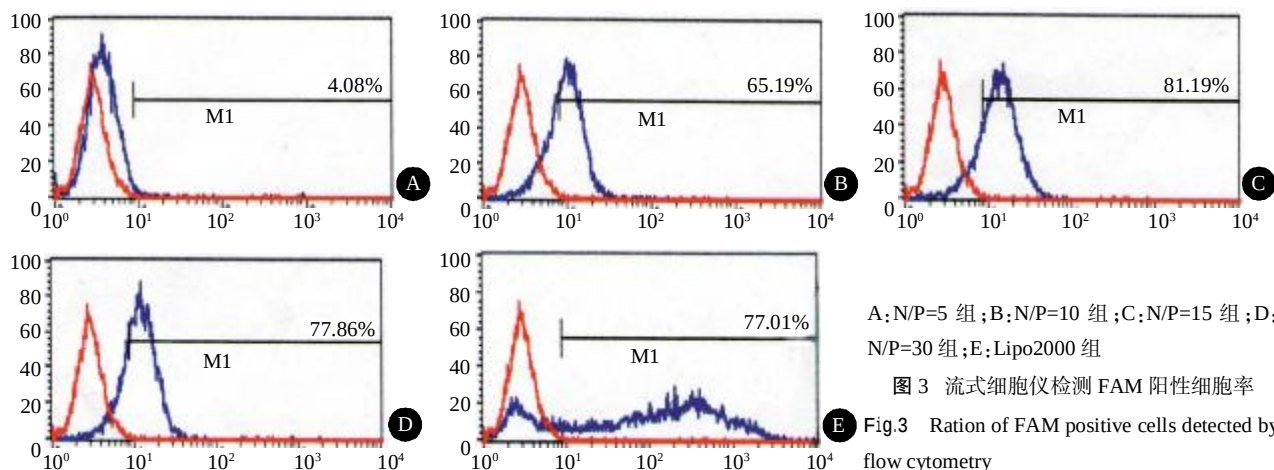
项目	N/P=5	N/P=10	N/P=15	N/P=30
粒径(nm)	392.1 $\pm$ 92.8	301.9 $\pm$ 6.1	219.9 $\pm$ 1.7	133.5 $\pm$ 1.7
电位(mV)	3.2 $\pm$ 2.5	9.7 $\pm$ 1.8	13.5 $\pm$ 1.6	25.6 $\pm$ 1.3



1: 裸 siRNA 组; 2: N/P=1 组; 3: N/P=5 组; 4: N/P=10 组; 5: N/P=15 组; 6: N/P=30 组; 7: N/P=50 组

图 2 琼脂糖凝胶阻滞实验测试不同 N/P 比的 PEG-PEI 与 siRNA 结合效率

Fig.2 Determination of siRNA condensation by PEG-PEI in gel retardation assay



有统计学意义($P<0.05$);但从 $N/P=15$ 开始,PEI-PEG 组平均转染效率与 Lipo2000 组的差异无统计学意义($P>0.05$)。

讨 论

NSCs 替代疗法是一种有望治愈老年痴呆、脊髓损伤等中枢神经系统退行性与损伤性疾病的重要治疗手段。将 NSCs 移植到病变部位后,可免受免疫排斥而存活,并可与宿主的神经细胞发生突触联系,替代退化或者已丧失的神经细胞^[5]。本研究使用的 C17.2 NSCs 是具有自我更新及多向分化潜能的永生化干细胞,在研究和治疗中枢神经系统疾病中可作为常用的工具细胞。在体外对其进行基因修饰,定向诱导其分化,可使其在中枢神经系统疾病的细胞替代治疗中发挥更大的作用。

RNAi 技术是在体外化学合成长度约 21~23 个碱基对的双链 RNA,通过诱导胞内基因沉默复合物的形成,高度特异地识别并协助降解与其有互补序列的靶标基因 mRNA,所以是一种在转录后水平负调控目的蛋白表达的有效手段。而设计及合成安全且高效的 siRNA 转载体是将 RNAi 技术运用于临床的关键。目前,siRNA 转载体主要分为病毒载体和非病毒载体两大类。其中,医用高分子纳米材料作为非病毒载体的一种,凭借着安全、高效、具有容易调整的结构和性能等众多优点,拥有良好的应用前景。

PEI 大分子链上含有大量胺基,可通过质子化带上正电荷,因而具有在胞外高效结合 DNA 或 siRNA 的能力。另外,复合物被内吞后,PEI 特殊的“质子海绵”效应能保护其负荷的外源基因免受核酸酶的降解以及协助其从内含体中逃逸到细胞质,所以 PEI 作为阳离子聚合物非病毒基因载体,被广泛应用于将 DNA 和 RNA 分子运输至靶细胞^[6-7]。

PEI 作为基因传递系统的转染效率和毒性取决于其分子量、分支度、阳离子电荷密度和它们的缓冲能力^[8-9]。相对分子量高的 PEI 容易与 siRNA 或 pDNA 复合,有利于基因传递体系,但同时 PEI 相对分子量太大会导致电荷密度太大而细胞毒性较大,本研究采用的相对分子质量为 25 000 的 PEI 是被认为能有效传输 siRNA 的载体,但其较高的阳离子毒性限制了该材料的应用^[10]。因此,利用 PEG 修饰 PEI 形成 PEG-PEI 共聚物,一方面通过屏蔽效应降低表面电荷,从而降低 PEI 的阳离子毒性;另一方面 PEG 的亲水特性可提高复合物在血液中的稳定性、延长其在血液中循环的时间,从而提高复合物的转染效果^[11]。

PEG-PEI 与 siRNA 通过静电作用结合后,可使用琼脂糖凝胶电泳法检测两者的结合效率。在上样时使用的胶体金,具有嵌入 siRNA 双螺旋碱基对在紫外光激发下发出荧光的特性,因此可用于标记游离的 siRNA 以及未完全复合好的纳米复合物的泳动情况。随着 N/P 比增大,PEG-PEI/siRNA 复合物产生 2 种变化:(1)相对分子量加大,故泳动速度减慢;(2)整体电荷改变,即负电荷逐渐减弱,正电荷逐渐加强。所以,凝胶电泳结果显示,当 $N/P=1$ 时,PEI-PEG 与 siRNA 开始复合,随着 N/P 增大,二者结合能力增强,越来越少的游离的 siRNA 能通过电泳分离出来,电泳条带亮度逐渐减弱;当 $N/P=15$ 时,向正极泳动的条带基本消失,阻滞在加样孔内,说明 siRNA 已经完全被 PEG-PEI 复合。

细胞转染率可以衡量不同 N/P 比 (5~30) 的 PEG-PEI 作为载体输送 siRNA 进入 C17.2 NSCs 的效率。细胞转染率与 PEG-PEI/siRNA 复合物多项理化性能有关^[12]。从转染率结果看出,从 $N/P=5$ 开始,随着 N/P 比增大,转染率逐渐升高。结合前面的粒径与电位实验结果分析,这主要是由于随着 N/P 比

增大,PEG-PEI 和 siRNA 的静电相互作用力增大,形成粒径更小、结构更稳定的纳米颗粒;同时,随着 PEG-PEI/siRNA 复合物表面电位增大,其静电排斥作用可防止纳米颗粒之间的聚合,也更利于其黏附带负电荷的细胞膜,从而被细胞摄取^[13]。但同时相应产生阳离子毒性也会随着 N/P 增大而增高,降低转染率,所以 N/P=30 时,转染率反而稍有下降,故要选择合适的 N/P 比从而获得更高的转染率。

总之,本研究成功合成了一种非病毒载体 PEG-PEI,可以与 siRNA 形成稳定的复合物,介导 siRNA 高效地转染 NSCs,实现靶向基因的沉默效应,在 NSCs 的基因调控及治疗应用方面具有重要的应用价值。

参 考 文 献

- [1] Lazarov O, Mattson MP, Peterson DA, et al. When neurogenesis encounters aging and disease[J]. Trends Neurosci, 2010, 3 (12): 569-579.
- [2] Sahni V, Kessler JA. Stem cell therapies for spinal cord injury [J]. Nat Rev Neurol, 2010, 6(7): 363-372.
- [3] Harel NY, Song KH, Tang X, et al. Nogo receptor deletion and multimodal exercise improve distinct aspects of recovery in cervical spinal cord injury [J]. Neurotrauma, 2010, 27 (11): 2055-2066.
- [4] 贺峰,刘中霖,叶剑虹,等. TrkA 基因修饰、诱导神经干细胞分化为胆碱能神经元[J]. 中华神经医学杂志, 2007, 6(1): 2-4.
- [5] 沈庆煜,肖颂华,李梅,等. 血管内皮生长因子基因修饰 C17.2 神经干细胞移植治疗脑梗死的实验研究 [J]. 中华神经医学杂志,

2007, 6(7): 667-670.

- [6] Creusat G, Rinaldi AS, Weiss E, et al. Proton sponge trick for pH-sensitive disassembly of polyethylenimine-based siRNA delivery systems[J]. Bioconjug Chem, 2010, 21(5): 994-1002.
- [7] Fattal E, Barratt G. Nanotechnologies and controlled release systems for the delivery of antisense oligonucleotides and small interfering RNA[J]. Br J Pharmacol, 2009, 157(2): 179-194.
- [8] Kwok A, Hart SL. Comparative structural and functional studies of nanoparticle formulations for DNA and siRNA delivery [J]. Nanomedicine, 2011, 7(2): 210-219.
- [9] Mao S, Neu M, Germershaus O, et al. Influence of polyethylene glycol chain length on the physicochemical and biological properties of poly (ethyleneimine)-graft-poly (ethylene glycol) block copolymer/siRNA polyplexes[J]. Bioconjug Chem, 2006, 17 (5): 1209-1218.
- [10] Beyerle A, IrmLer M, Beckers J, et al. Toxicity pathway focused gene expression profiling of PEI-based polymers for pulmonary applications[J]. Mol Pharm, 2010, 7(3): 727-737.
- [11] Neu M, Germershaus O, Behe M, et al. Bioreversibly crosslinked polyplexes of PEI and high molecular weight PEG show extended circulation times in vivo[J]. J Control Release, 2007, 124(1-2): 69-80.
- [12] Grayson AC, Doody AM, Putnam D. Biophysical and structural characterization of polyethylenimine-mediated siRNA delivery in vitro[J]. Pharm Res, 2006, 23(8): 1868-1876.
- [13] Aigner A. Delivery systems for the direct application of siRNAs to induce RNA interference (RNAi) in vivo[J]. J Biomed Biotechnol, 2006, 2006(4): 71659.

(收稿日期:2011-04-15)

(本文编辑:张玲)

《中华神经医学杂志》对一稿两投问题处理的声明

近期本刊作者出现一稿两投的问题,为维护《中华神经医学杂志》的声誉和广大读者的利益,根据中华医学会杂志社的统一要求,本刊编辑部就一稿两投问题的处理声明如下:

(1)本声明中所涉及的文稿均指原始研究的报告或尽管两篇文稿在文字的表达和讨论的叙述上可能存在某些不同之处,但这些文稿的主要数据和图表是相同的。所指文稿不包括重要会议的纪要、疾病的诊断标准和防治指南、有关组织达成的共识性文件、新闻报道类文稿以及在一种刊物发表过摘要或初步报道而将全文投向另一种期刊的文稿。上述各类文稿如作者要重复投稿,应向有关期刊编辑部做出说明。

(2)如 1 篇文稿已经以全文方式在某刊物发表,除非文种不同。否则不可再将该文投寄给他刊。

(3)请作者所在单位在来稿介绍信中注明该文稿有无一稿两投问题。

(4)凡来稿在接到编辑部回执后满 3 个月未接到退稿,则表明稿件仍在处理中,作者欲投他刊,应事先与该刊编辑部联系并申诉理由。

(5)编辑部认为文稿有一稿两投嫌疑时,应认真收集有关资料并仔细核对后再通知作者,在做出处理决定前请作者就此问题做出解释。期刊编辑部与作者双方意见发生分歧时,应由上级主管部门或有关权威机构进行最后仲裁。

(6)一稿两用一经证实,将择期在杂志中刊出其作者单位和姓名以及撤销该论文的通告;对该作者作为第一作者所撰写的一切文稿,2 年内将拒绝在中华医学会系列杂志发表,并就此事件向作者所在单位和该领域内的其他科技期刊通报。

· 读者·作者·编者 ·