

电针水沟穴对大鼠中动脉闭塞大鼠脑缺血后微小 RNA-126 及靶基因的影响

李莎莎 刘津溪 钱小路 靳兰洁 袁影 周爽

(第二军医大学长海医院中医系, 上海 200433)

【摘要】 目的 观察电针水沟穴对大鼠中动脉闭塞(MCAO)大鼠脑缺血后微小 RNA-126(miR-126)及其靶基因磷脂酰肌醇-3-激酶调节亚单位(PIK3R2)mRNA、出芽相关蛋白-1(SPRED1)mRNA 表达的影响,从血管新生角度探讨电针治疗脑缺血的可能机制。**方法** 将 20 只雄性 SD 大鼠按随机数字表法分为正常组、假手术组、模型组、治疗组,每组 5 只。参照改良 Longa 线栓法复制 MCAO 大鼠模型,假手术组不插入线栓。制模后治疗组于水沟穴(大鼠唇裂鼻尖下 1 mm 正中处,向上斜刺 1 mm)与右耳根部皮肤接 G6805-1A 型治疗仪进行电针治疗,1 mA 电流、2 Hz,持续留针 30 min,连续治疗 3 d;正常组、假手术组、模型组制模后不进行处理。采用 Berderson 评分评价大鼠神经功能缺损程度;用实时荧光定量聚合酶链反应(qPCR)检测 miR-126 及 PIK3R2、SPRED1 的 mRNA 表达。**结果** 与正常组比较,模型组大鼠有不同程度的神经功能缺损,Berderson 评分明显增高(分:11.20±1.64 比 0, $P<0.01$),治疗后 Berderson 评分较模型组明显降低(分:7.20±1.48 比 11.20±1.64, $P<0.01$)。模型组 miR-126、PIK3R2 及 SPRED1 的 mRNA 表达均较正常组明显升高[miR-126($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 1.13±0.48 比 0.16±0.12, PIK3R2 mRNA($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 12.03±6.09 比 0.42±0.33, SPRED1 mRNA($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 8.77±3.85 比 0.21±0.40, 均 $P<0.01$];治疗组 miR-126 表达较模型组明显升高($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 1.93±0.81 比 1.13±0.48), PIK3R2、SPRED1 的 mRNA 表达较模型组明显降低[PIK3R2 mRNA($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 5.78±3.61 比 12.03±6.09, SPRED1 mRNA($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 3.90±3.24 比 8.77±3.85, $P<0.05$ 或 $P<0.01$]。**结论** 电针水沟穴能促大鼠脑缺血后神经功能体征的恢复,其机制可能与其调控 miR-126 及其靶基因从而促进了脑血管新生有关。

【关键词】 脑缺血; 电针; 水沟穴; 微小 RNA-126; 磷脂酰肌醇-3-激酶调节亚单位 2; 出芽相关蛋白-1

Effect of electro-acupuncture at Shuigou acupoint on expressions of microRNA-126 and target genes after cerebral ischemia in rats with middle cerebral artery occlusion Li Shasha, Liu Jinxi, Qian Xiaolu, Jin Lanjie, Yuan Yin, Zhou Shuang. Department of Traditional Chinese Medicine, Changhai Hospital of Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Corresponding author: Zhou Shuang, Email: zhoushuang8008@163.com

【Abstract】 Objective To observe the influence of electro-acupuncture (EA) at Shuigou (GV26) on the expressions of microRNA-126 (miR-126) and its target genes-phosphoinositol-3 kinase regulatory subunit 2 (PIK3R2), sprouty-related protein-1 (SPRED1) mRNA after cerebral ischemia in rat models with middle cerebral artery occlusion (MCAO) and discuss the possible mechanism of EA treatment for cerebral ischemia from the perspective of angiogenesis. **Methods** Twenty male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into four groups: normal, sham operation, model and treatment groups (5 rats in each group). Modified Longa arterial thread embolism method was employed to establish the experimental rat models with intra-luminal MCAO, and in the sham operation group no thread embolism was inserted. In the treatment group, after model establishment EA was given at Shuigou (the acupoint is located at a point 1 mm below the nose tip in the median line between the nose and lip, and the direction of puncture is obliquely upward for 1 mm in depth), and the G6805-1A type EA treatment instrument was connected at the root part skin of right ear with 1 mA current, 2 Hz, retaining the needle continuously for 30 minutes once daily for consecutive 3 days. Normal group, sham operation group, model group were not intervened. The neurological deficits in rats were evaluated by Berderson score. The expressions of miR-126 and PIK3R2, SPRED1 mRNA in ischemic tissues were detected by fluorescent quantitative polymerase chain reaction (qPCR). **Results** Compared with normal group, there were different degrees of neurological deficits and Berderson score was significantly higher in model group (11.20±1.64 vs. 0, $P<0.01$); after treatment, the Berderson score in treatment group was markedly lower compared with that in model group (7.20±1.48 vs. 11.20±1.64, $P<0.01$). Compared with normal group, the expressions of miR-126 and PIK3R2, SPRED1 mRNA in ischemic tissues of model group were significantly higher [miR-126 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 1.13±0.48 vs. 0.16±0.12, PIK3R2 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 12.03±6.09 vs. 0.42±0.33, SPRED1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 8.77±3.85 vs. 0.21±0.40, all $P<0.01$]. Compared with model group, the expression of miR-126 in ischemic tissues of treatment

doi: 10.3969/j.issn.1008-9691.2016.03.003

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81173330, 81574059)

通讯作者: 周爽, Email: zhoushuang8008@163.com

group was obviously higher ($2^{-\Delta\Delta C_t}$: 1.93 ± 0.81 vs. 1.13 ± 0.48), and the expressions of PIK3R2 and SPRED1 mRNA in ischemic tissues of treatment group were remarkably lower [PIK3R2 mRNA ($2^{-\Delta\Delta C_t}$): 5.78 ± 3.61 vs. 12.03 ± 6.09 , SPRED1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta C_t}$): 3.90 ± 3.24 vs. 8.77 ± 3.85 , $P < 0.05$ or $P < 0.01$]. **Conclusions** EA at Shuigou can promote the recovery of nervous function in rats with cerebral ischemia, and its mechanism is possibly related to the regulation of mir-126 and PIK3R2/SPRED1 mRNA, resulting in improvement of angiogenesis in ischemic tissues.

【Key words】 Cerebral ischemia; Electro-acupuncture; Shuigou; microRNA-126; Phosphoinositol-3 kinase regulatory subunit 2; Sprouty-related protein-1

脑卒中是由于脑血管意外破裂或阻塞导致局部脑组织坏死,以偏身功能障碍为主要临床表现的急性脑血管疾病^[1-2]。血管新生为机体损伤后自我修复的生物过程^[3-4],可促进脑缺血后血管网络系统的重建及神经细胞修复、功能恢复^[5]。针刺治疗脑缺血促进血管新生的研究时有报道^[6-7],水沟穴则为临床上治疗中风病常用主穴^[8-9]。有研究显示,微小 RNAs(miRNAs)对血管新生发挥调控作用^[10-11]。miR-126 在内皮细胞高度表达,为内皮细胞特异性 miRNA^[12],在缺血诱导的血管新生过程中发挥重要调控作用^[13]。针刺对 miRNAs 的调控效应近年来偶见报道^[14]。电针水沟穴能否引起大脑中动脉闭塞(MCAO)大鼠脑缺血后 miR-126 及其靶基因 PIK3R2、SPRED1 改变是本实验观察的目的。

1 材料与方法

1.1 主要实验仪器和试剂: G6805-1A 型治疗仪,上海华谊医用仪器厂;5417R 冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司;ABI-7900 Real-time 检测仪,美国 Applied Biosystems 公司;ND2000 紫外分光光度计,美国 Gene company 公司。TRIzol RNA 抽提试剂,日本 Takara 公司;反转录试剂盒(MiScript Reverse Transcriptase Kit 德国 Qiagen 公司,PrimeScript RT Kit 日本 Takara 公司);荧光定量聚合酶链反应(qPCR)试剂盒(QuantiTect SYBR Green PCR Kit)及实时 PCR 引物(has-miR-126),德国 Qiagen 公司。

1.2 动物分组及模型复制: 20 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量(250 ± 20)g,购自上海第二军医大学实验动物中心,动物合格证号:SYXK(沪)2012-0003。按随机数字表法分正常组、假手术组、模型组及治疗组,每组 5 只。除正常组外,其余各组参照改良 Longa 线栓法复制永久性大脑中动脉闭塞(MCAO)大鼠模型,假手术组不插入线栓。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.3 针刺方法: 水沟穴位于大鼠唇裂鼻尖下 1 mm 正中处,向上斜刺 1 mm(《实验动物穴位图谱》)。无菌针灸针选用 0.25 mm×0.25 mm 规格(无锡佳健牌)。于水沟穴与右耳根部皮肤接 G6805-1A 型治疗

仪,以 1 mA 电流、2 Hz,持续留针 30 min,连续治疗 3 d。正常组、假手术组、模型组制模后未进行处理。

1.4 标本采集与处理: 于 MCAO 模型成功 72 h 后处死大鼠;冰上剥离缺血脑组织,−80℃液氮速冻,随即转移至 −80℃冰箱冻存。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 Berderson 评分评价神经功能损伤程度: 用 Berderson 评分即姿势反射测验评价大鼠神经功能缺损程度,根据大鼠行为功能测定结果,统计各项分值,为 0~13 分。

1.5.2 miR-126 表达检测: TRIzol 法提取总 RNA。取 100 mg 脑组织液氮研磨后按说明书依次加入 TRIzol、氯仿、异丙醇等,4℃离心提取总 RNA,75%乙醇/焦碳酸二乙酯(DEPC)洗涤 RNA 沉淀,DEPC 处理水溶解 RNA,−80℃低温保存。参照说明书进行 miR-126 反转录反应,反转录产物进行实时 qPCR 反应,检测 miR-126 表达;引物为 has-miR-126,U6 为内参照。PCR 条件:95℃、15 min,94℃、15 s,55℃、30 s,70℃、30 s,循环 40 次。采用相对定量法($\Delta\Delta C_t$ 法)进行半定量分析,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值表示目的基因相对正常组的表达量。

1.5.3 磷脂酰肌醇-3-激酶调节亚单位 2(PIK3R2)、出芽相关蛋白-1(SPRED1)的 mRNA 表达检测: PIK3R2 和 SPRED1 的 mRNA 反转录后,实时 PCR 方法检测 PIK3R2 和 SPRED1 的 mRNA 表达。PIK3R2、SPRED1 的 mRNA 及内参照三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)引物序列如下: GAPDH 正义链为 5'-CCCATCACCATCTTCCAGGA-3',反义链为 5'-CATCGCCCCACTTGATTTTG-3'; PIK3R2 正义链为 5'-CTCATCTCCCACTACCGACA-3',反义链为 5'-GCACCCACAGCCTCTACACT-3'; SPRED1 正义链为 5'-GAGGAGGACACTTCCCGTTC-3',反义链为 5'-ATCTGGCTCACTTGGCTTTG-3'。PCR 条件为 95℃、30 s,95℃、15 s,60℃、30 s,循环 40 次。检测系统为 ABI 7900 实时 PCR 系统。采用相对定量法($\Delta\Delta C_t$ 法)进行半定量分析,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值表示目的基因相对正常组的表达量。

1.6 统计学方法:使用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,用单因素方差分析比较各组方差,组间多重比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组大鼠 Berderson 评分比较(表 1):正常组和假手术组大鼠无神经功能缺损体征, Berderson 评分为 0。与正常组和假手术组比较,模型组大鼠出现了明显的神经功能缺损体征, Berderson 评分 > 0 。而加用电针治疗后,大鼠 Berderson 评分显著低于模型组,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠神经功能缺损体征 Berderson 评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	Berderson 评分(分)
正常组	5	0.00 $\pm$ 0.00
假手术组	5	0.00 $\pm$ 0.00
模型组	5	11.20 $\pm$ 1.64 ^a
治疗组	5	7.20 $\pm$ 1.48 ^{ab}

注:与正常组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.01$

2.2 各组大鼠缺血脑组织 miR-126 和 PIK3R2、SPERED1 的 mRNA 表达水平比较(表 2):假手术组 miR-126 和 PIK3R2、SPERED1 的 mRNA 表达与正常组比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$);而模型组大鼠上述 3 个指标的表达水平均较正常组显著升高;与模型组比较,治疗组 miR-126 表达显著升高, PIK3R2、SPERED1 的 mRNA 表达显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 2 各组大鼠制模后 72 h 缺血脑组织 miR-126 和 PIK3R2、SPERED1 的 mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	miR-126 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	PIK3R2 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	SPERED1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
正常组	5	0.16 $\pm$ 0.12	0.42 $\pm$ 0.33	0.21 $\pm$ 0.40
假手术组	5	0.22 $\pm$ 0.05	0.47 $\pm$ 0.35	0.15 $\pm$ 0.16
模型组	5	1.13 $\pm$ 0.48 ^a	12.03 $\pm$ 6.09 ^a	8.77 $\pm$ 3.85 ^a
治疗组	5	1.93 $\pm$ 0.81 ^{ac}	5.78 $\pm$ 3.61 ^{bd}	3.90 $\pm$ 3.24 ^{bd}

注:与正常组比较,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$;与模型组比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$

3 讨 论

miRNAs 是一种高度保守的内源性非编码小分子单链 RNA,通过非特异性识别靶基因 mRNA 调节生物体生理病理过程^[15]。miR-126 在内皮细胞高表达,为内皮细胞特异性 miRNA^[12],其基因位于表皮生长因子样结构域蛋白 7(EGFL7)的内含子区域,通常在 EGFL7 转录时一起被转录^[13]。miR-126

在缺血诱导下血管新生中发挥重要调控作用^[16]。miR-126 通过负调节靶基因 SPRED1 和 PIK3R2 抑制血管内皮生长因子对血管新生和细胞生存信号的应答,从而促进血管新生^[17]。miR-126 通过抑制 Sprouty 家族相关蛋白 SPRED1 来调节血管新生。Sprouty 相关蛋白家族是一种多功能蛋白,它通过抑制血管内皮生长因子(VEGF)所诱导的细胞膜外调节蛋白激酶(ERK)对血管新生发挥抑制作用。PIK3R2/丝氨酸-苏氨酸激酶(Akt)通路是真核细胞关键的信号转导通路。miR-126 还可以通过下调 PIK3R2,激活 PIK3R2,介导 Akt/蛋白激酶 B(PKB)磷酸化,从而调节血管新生^[18]。

肢体功能障碍是脑卒中后的主要临床表现之一^[1-2],国际上针对脑卒中的治疗有组织型纤溶酶原激活物(t-PA)、乙酰水杨酸、神经保护药等^[19-20];中医治疗对卒中后偏瘫的恢复亦有明显的促进作用^[21-22]。针灸治疗在脑卒中的急、缓期均有利于患者神经功能的恢复^[23-24]。

电针调节缺血脑组织 miRNAs 变化的研究目前开展较少。研究者通过对自发性高血压大鼠基因微芯片分析发现,有 222 种 miRNAs 在针灸治疗时发生变化,提示特异性 miRNAs 表达变化对大鼠神经修复起促进作用^[14]。但针刺调节 miRNAs 变化是否与脑缺血后的血管新生相关,目前还尚未见报道。

本研究显示,模型组大鼠缺血组织中 miR-126、PIK3R2、SPRED1 的 mRNA 表达明显高于正常组,提示 miR-126、PIK3R2、SPRED1 的 mRNA 表达参与了脑缺血发生。治疗组 miR-126 mRNA 表达明显高于模型组;PIK3R2、SPRED1 的 mRNA 表达低于模型组,提示电针对 miR-126、PIK3R2、SPRED1 的 mRNA 表达具有一定调节作用,可能是通过正调节血管新生促进因子 miR-126 的表达,降低抑制血管新生靶基因 PIK3R2、SPRED1 的 mRNA 表达,从而达到促进缺血组织血管新生的目的。

综上所述,电针水沟穴能促进大鼠脑缺血后神经功能的恢复,其机制可能与其调控 miR-126 及其靶基因从而促进了脑血管新生相关。

参考文献

- [1] 黄如训,郭玉璞. 2000 年广州全国脑血管病专题研讨会脑卒中的分型分期治疗(建议草案)[J]. 现代实用医学, 2003, 15(9): 592-594.
- [2] 黄如训. 脑卒中[M]. 北京:人民卫生出版社, 2012.
- [3] 张晔,曾炳芳. 组织工程与血管形成[J]. 国外医学骨科学分册, 2003, 24(6): 363-367.
- [4] Beck H, Plate H. Angiogenesis after cerebral ischemia[J]. Acta Neuropathol, 2009, 117(5): 481-496.

- [5] 郭建文,李俊雅,黄燕.调节“脑中血海”法联合骨髓间充质干细胞移植对大鼠缺血性脑组织血管再生的影响[J]. 中西医结合学报, 2009, 7(8): 763-768.
- [6] Du Y, Shi L, Li J, et al. Angiogenesis and improved cerebral blood flow in the ischemic boundary area were detected after electroacupuncture treatment to rats with ischemic stroke [J]. Neurol Res, 2011, 33(1): 101-107.
- [7] Ma J, Luo Y. Effects of electroacupuncture on expressions of angiogenesis factors and anti-angiogenesis factors in brain of experimental cerebral ischemic rats after reperfusion [J]. J Tradit Chin Med, 2008, 28(3): 217-222.
- [8] 杜元灏,冀健民.醒脑开窍针法中水沟穴作用探讨[J]. 中国针灸, 2001, 21(9): 535-536.
- [9] 姚文平,王舒,韩林,等.电针水沟穴对脑梗死大鼠运动诱发电位的影响[J]. 中西医结合学报, 2010, 8(10): 979-984.
- [10] Wang Y, Wang Y, Yang GY. MicroRNAs in Cerebral Ischemia [J]. Stroke Res Treat, 2013, 2013: 276540.
- [11] Jeyaseelan K, Lim KY, Armugam A. MicroRNA expression in the blood and brain of rats subjected to transient focal ischemia by middle cerebral artery occlusion [J]. Stroke, 2008, 39(3): 959-966.
- [12] van Solingen C, Seghers L, Bijkerk R, et al. Antagomir-mediated silencing of endothelial cell specific microRNA-126 impairs ischemia-induced angiogenesis [J]. J Cell Mol Med, 2009, 13(8A): 1577-1585.
- [13] Takeuchi K, Yanai R, Kumase F, et al. EGF-like-domain-7 is required for VEGF-induced Akt/ERK activation and vascular tube formation in an ex vivo angiogenesis assay [J]. PLoS One, 2014, 9(3): e91849.
- [14] Wang JY, Li H, Ma CM, et al. MicroRNA Profiling Response to Acupuncture Therapy in Spontaneously Hypertensive Rats [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2015, 2015: 204367.
- [15] Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data [J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39(Database issue): D152-157.
- [16] Fish JE, Santoro MM, Morton SU, et al. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity [J]. Dev Cell, 2008, 15(2): 272-284.
- [17] Ishizaki T, Tamiya T, Taniguchi K, et al. miR126 positively regulates mast cell proliferation and cytokine production through suppressing Spred1 [J]. Genes Cells, 2011, 16(7): 803-814.
- [18] Hu J, Zeng L, Huang J, et al. miR-126 promotes angiogenesis and attenuates inflammation after contusion spinal cord injury in rats [J]. Brain Res, 2015, 1608: 191-202.
- [19] 王水利,祝兆林.急性缺血性卒中的治疗进展[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2003, 10(4): 255-256.
- [20] 陈宗美,常虹,郝新宇,等.纤溶酶治疗急性脑梗死的临床疗效观察[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2014, 21(6): 467-468.
- [21] 王沈燕,王雪里红,曾红,等.艾通立早期静脉溶栓治疗急性脑梗死——附 100 例病例分析[J]. 中华危重病急救医学, 2003, 15(9): 542-545.
- [22] 耿昌,梅晓明,闫政谋,等.中医药综合治疗急性缺血性脑梗死的临床研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2009, 16(6): 356-358.
- [23] 张伯礼,王玉来,高颖,等.中风病急性期综合治疗方案研究与评价——附 522 例临床研究报告[J]. 中华危重病急救医学, 2005, 17(5): 259-263.
- [24] 龙维群.早期针刺治疗脑卒中偏瘫 84 例疗效观察[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2004, 11(4): 252.

(收稿日期: 2016-04-11)

(本文编辑: 邸美仙 李银平)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊对基金项目标注的有关要求

基金项目指论文产出的资助背景,例如国家自然科学基金资助项目、国家高技术研究发展计划(863)项目、国家科技攻关计划、国家重点基础研究发展规划(973项目);行业专项基金列出提供基金的单位,如国家卫生和计划生育委员会科研基金,临床重点专项资金建设项目可只列出国家临床重点学科建设项目或国家中医药管理局临床重点学科建设项目等。各省市基金也同上方法。

获得基金资助的论文应在文章首页左下方标注“基金项目”,基金项目名称应按国家有关部门规定的正式名称填写,并在圆括号内注明其项目编号,多项基金应依次列出,其间以分号隔开。例如:基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271269);广东省建设中医药强省科研项目(20121078)。作者投稿时应向编辑部提供基金证书的复印件。

本刊对来稿的一般要求

文稿应具有科学性、创新性、实用性和导向性。要求资料真实、可靠,数据准确,必要时进行统计学处理;文字精炼,层次清楚;论点明确,论据充分,结论清晰。应特别注意对研究过程和方法陈述的严谨性、逻辑关系的严密性、文字表述的流畅性。

来稿需经第一作者或通讯作者所在单位审核,并签署带有全体作者签字和盖有单位公章的论文投稿介绍信及授权书。推荐信(附带版权转让协议)可在本刊网站下载(<http://www.cccm-em120.com>)。推荐信应证明稿件内容和数据资料的真实性,注明对稿件的审评意见以及无一稿两投、不涉及保密、署名无争议等项,并加盖单位公章。如涉及保密问题,需附有关部门审查同意发表的证明。需要特别说明的是,科研论文一般具有职务作品的属性。为了保护知识产权,对于原创性研究论文,本刊要求稿件推荐信须由享有该研究知识产权的单位(即科研立项单位、病例资料所在单位)出具;多中心研究的推荐信可由作为该项研究主持者的第一作者或通信作者的所在单位出具。述评、综述、论坛类稿件不受上述规定限制。

欢迎作者通过 Email 投稿,《中国中西医结合急救杂志》的投稿信箱: cccm@em120.com。Email 投稿后,作者还需邮寄纸质版稿件 1 份以及各类基金项目批件复印件,以及论文投稿介绍信及授权书。

《中国中西医结合急救杂志》一般不退还原稿,请作者自留底稿。投稿时请自留论文的原始图片。为了便于必要时编辑部与作者及时取得联系,请在文稿后注明第一作者或通讯作者的联系方式(移动电话及 Email),所有处理稿件的相关问题均通过 Email 完成。