

· 基础研究 ·

鹿茸多肽对大鼠软骨细胞复制性老化的作用

陈晓东¹, 林建华²

(1.深圳平乐骨伤科医院, 广东 深圳 518010; 2.福建医科大学附属第一医院)

【摘要】 目的: 对体外传代培养出现复制性老化的大鼠软骨细胞进行鹿茸多肽干预对照实验, 观察鹿茸多肽对软骨细胞复制性老化的影响。方法: 将第 3 代软骨细胞分为空白对照组(未加药物)、鹿茸多肽 5、10、15 $\mu\text{g/ml}$ 组传代使之进入第 4 代, 同时以第 2 代软骨细胞为青年对照组, 进行组化检测老化相关 β -半乳糖苷酶, 流式细胞仪分析细胞周期和增殖指数, 阿力新蓝染色检测胞外基质硫酸 GAG (glycosaminoglycan) 含量和结构, RT-PCR (reverse transcript-polymerase chain reaction) 检测 II 型胶原、Aggrecan 蛋白, 对鹿茸多肽抗软骨细胞老化进行分子生物学研究。结果: 鹿茸多肽显著抑制老化相关 β -半乳糖苷酶的表达 ($P < 0.01$)、促进鼠软骨细胞增殖、减少 G1 期细胞含量、促进软骨细胞胞外基质 GAG、II 型胶原、Aggrecan 蛋白表达 ($P < 0.01$)。结论: 鹿茸多肽具有显著的抗软骨细胞复制性老化作用。

【关键词】 鹿茸多肽; 软骨细胞; 细胞衰老

Role of pilose antler polypeptides on replicative senescence of rat chondrocyte CHEN Xiao-dong*, LIN Jian-hua.* Shenzhen Pingle Hospital of Orthopedics and Traumatology, Shenzhen 518010, Guangdong, China

ABSTRACT Objective: To observe the function of pilose antler polypeptides (PAP) on replicative senescence of rat chondrocyte subcultivated in vitro by means of PAP intervention and controlled experiment. **Methods:** The 3rd generation chondrocytes were divided into blank group, and PAP groups with three different concentration of PAP which were passaged to the 4th generation. Meanwhile, the 2nd generation of chondrocytes were used as control group. The chondrocytes in different groups were detected with the method of histochemistry for S-A- β -gal, flow cytometry for cell life cycle and proliferation index, alcian blue test for the content and structure of GAG of ECM, and RT-PCR for type II collagen and Aggrecan. Then PAP's function was observed regarding the appearance and functional status in the process of chondrocyte's senescence. **Results:** PAP significantly inhibited chondrocyte's express of S-A- β -gal ($P < 0.01$), promoted chondrocyte's proliferation ($P < 0.01$), reduced cell content on G1 phase, enhanced the content of GAG, type II collagen and Aggrecan of ECM ($P < 0.01$). **Conclusion:** PAP can significantly resist rat chondrocyte senescence occurred in subcultivation.

Key words Pilose antler polypeptide; Chondrocyte; Cell senescence

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2008, 21(7): 515-518 www.zggszz.com

软骨细胞属于终末分化细胞, 其在体外的传代培养过程中出现生长停滞, 细胞停滞于细胞周期的 G1 期, 增殖能力减弱, 表型丧失, 呈老化状态, 此为复制性老化(replicative senescence)。有实验研究^[1-2]显示, 软骨细胞体外传代培养出现复制性老化发生在 P4 代(the 4 th passage), 本研究的细胞传代实验中发现大鼠软骨细胞在 P4 代出现老化改变^[3]。前期实验表明鹿茸多肽(pilose antler polypeptides, PAP)具有明显促进骨髓间质干细胞的增殖、分化和抑制凋亡的作用^[4-5]。本实验进一步观察其对软骨细胞复制性老化的影响, 进而为优化组织工程软骨细胞、为鹿茸多肽用于防治骨性关节炎提供实验支持。

1 材料与方

1.1 主要材料 清洁级 SD 大鼠(福建医科大学实验动物中

心提供, 闽验证字 20050001, 合格证号 2005C03, 4 周龄, 体重 180~200 g, 雄性)。 α MEM 培养基(Gibco 公司)、胎牛血清 FBS (HyClone 公司); 胰蛋白酶 Trypsin 1:250(Amersco 公司)、II 型胶原酶(Sigma 公司)、PBS(Gibco 公司); 二甲基亚砜 DMSO (Amersco 公司); 盐酸胍 (GnCl)、Alcian blue 和 TritonX-100 (上海生物工程有限公司); β -半乳糖苷 (X-Gal)(厦门泰京公司); TRIZOL、RT-PCR 试剂盒 (Invitrogen 公司); PCR 引物 [type II collagen 上游 5'-T GGTGCTGCTGACGCTGCTCATCGCCACG GTCCTA-3', 下游 5'-GCCTTCTGATCAAATCCTCCAGCCATC TGGGCCGC-3' (340 bp); Aggrecan 上游 5'-CTGCTACACAGG TGAAGACTTTGTAGACATCC-3', 下游 5'-TGCTGTGCCTCCT CAAATGTCAGAGAGTATCT-3' (475 bp); 内参照 β -actin: 上游 5'-GAGGCATCCTGACCCTGAAG-3', 下游: 5'-CATCACA ATGCCA GTGGTACG-3' (274 bp)](上海生物工程有限公司); Taq DNA 聚合酶、dNTPs(上海申能博采有限公司); DNA 分子量标准: pUC Mix Marker (Fermentas 公

基金项目: 福建省科技计划重大资助项目(编号: 2004Y018)

通讯作者: 陈晓东 Tel: 0755-81192880 E-mail: cxd22@163.com

司)。鹿茸多肽粉针(长春中医学院附院新药研究中心)。

1.2 大鼠软骨细胞的取材、培养、分组 取 4 周龄体重 180~200 gSD 大鼠 8 只,断颈处死,参考 Hu 等^[6]软骨细胞分离培养方法进行实验,获取软骨细胞置于 5%CO₂ 混和气体环境中,37℃恒温箱内单层培养,隔 3 d 首次换液,8~10 d 达 85% 融合后进行传代培养,具体方法见文献^[7]。分组:前期实验^[3]表明从 P4 代软骨细胞开始出现老化,因此,进行药物干预的时机为对 P3 代(the 3 rd passage)软骨细胞进行传代时(传代后即进入 P4 代)。P2 组:青年对照组,培养基中不加任何药物;P4 组:老化对照组,培养基中不加任何药物;PAP 5 μg/ml 组:加 5 μg/ml 鹿茸多肽培养基;PAP 10 μg/ml 组:加 10 μg/ml 鹿茸多肽培养基;PAP 15 μg/ml 组:加 15 μg/ml 鹿茸多肽培养基。

1.3 检测项目与方法

1.3.1 软骨细胞 β-半乳糖苷酶表达组化法检测 采用 Dimri 等^[8]方法配制缓冲液,调 PH 值为 6.0。于 6 孔培养板先置入多聚赖氨酸处理过的玻片,按 700 个/cm² 密度接种各组细胞,温箱培养 24 h,取出玻片,在 37℃预温 D-Hank 氏液或其他平衡液中漂洗玻片 2 次,4℃预冷的 PBS 冲洗玻片 2 次,2%甲醛室温下固定 3~5 min,PBS 冲洗,用新鲜配制的 β-gal 染色液反应,37℃孵育 4 h,用 dd H₂O 冲洗片子完全,后固定液(70%乙醇:甲醛:冰醋酸按 20:2:1)固定 4 min,自来水冲洗,核快红复染 8 min,自来水冲洗,烤箱 60℃脱水 1 h,二甲苯透明,阿拉伯树脂胶封片,细胞周围蓝绿色染色为阳性染色。结果分析:光镜下每个标本随机选 5 个高倍视野记数细胞,求出阳性表达率(%)。

1.3.2 软骨细胞细胞周期及增殖指数检测 将培养的待测软骨细胞置 5 ml 试管中,PBS 或生理盐水洗 2 次,制成单细胞悬液,无水乙醇固定细胞,加入 PBS 调整细胞浓度为 5×10⁵~5×10⁶ 个细胞加入 1 ml DNA 荧光染料(PI),室温下避光染色 15 min,用流式细胞仪分析软骨细胞周期及检测增殖指数。

1.3.3 软骨细胞 GAG 含量及分子链结构检测 配制阿力新蓝贮液,将各组软骨细胞用 0.25%胰酶消化、收集、裂解,按照 Sven^[9]方法进行反应,以溶解液重溶阿力新蓝,将蛋白聚糖沉淀复合物,移 96 孔板,酶标仪 600 nm 波长处测定吸光度 A 值。检测过程中以 dd H₂O 作为空白对照,裂解液作为阴性对照,进行 GAG 分子结构的检测,将各组软骨细胞取样裂解,各组均分 2 子组,通过调节不同的盐酸胍(GnCl)浓度,分阶段对链长及硫酸化程度不同的 GAG 进行定量检测。

1.3.4 软骨细胞 II 型胶原 mRNA 表达检测 采用 TRIZOL 提取各代软骨细胞总 RNA,紫外分光光度计测定总 RNA 的浓度和纯度,-80℃冻存备用。取 100 ng 总 RNA,按一步法 RT-PCR 试剂盒说明操作,扩增条件:94℃变性 40 s,退火 40s,72℃延伸 1 min,25 次循环,72℃延伸 2 min,扩增产物片段长度为 340 bp;β-actin:94℃ 30 s,50℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,扩增产物片段长度为 274 bp。取 5 ul PCR 产物在含有 1%琼脂糖的 0.5×TBE 缓冲液中电泳,电压 100 v,时间 30~40 min。Gel Doc 2000 型凝胶图像分析系统拍照,Gelworks 1D Intermediate 软件定量分析。

1.3.5 软骨细胞 Aggrecan mRNA 表达检测 对各组软骨细

胞用 RT-PCR 法检测 Aggrecan mRNA 表达,方法同 II 型胶原 mRNA 检测,其中退火温度为 56℃。

1.4 统计学方法 应用 SPSS 11.0 统计软件进行分析。定量资料以均数±标准差表示,进行 One way ANOVA 检验,组间比较采用 t 检验,P<0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 各组软骨细胞 β-半乳糖苷酶检测结果 结果见图 1。

组化法检测各组软骨细胞 β-半乳糖苷酶阳性表达结果显示:PAP 各组(14.8%,13.9%,14.8%)显著低于 P4 组(25.8%)(P<0.01),PAP 各组间比较,10 μg/ml 组显著低于 5 μg/ml 组(P<0.01)和 15 μg/ml 组(P<0.05),说明 PAP 各组均能抑制软骨细胞 β-半乳糖苷酶阳性表达,最佳浓度剂量 10 μg/ml,但是 PAP 各组仍显著高于 P2 组(3.9%)(P<0.01),说明 PAP 可以抑制软骨细胞 β-半乳糖苷酶表达,但不能完全逆转软骨细胞老化。

2.2 各组软骨细胞 G0/G1 百分含量和增殖指数 结果见表 1。

表 1 各组软骨细胞细胞周期 G0/G1 含量及 PI 值
Tab.1 Cell life cycle G0/G1 content and PI of chondrocytes in different groups(%)

组别	G0/G1 含量	增殖指数(PI)
P2	79.1	20.9
P4	84.4	12.6
PAP 5 μg/ml	80.3	19.7
PAP 10 μg/ml	78.6	21.4
PAP 15 μg/ml	80.6	19.4

流式细胞仪检测结果表明:PAP 各组软骨细胞 G0/G1 百分含量(80.3%、78.6%、80.6%)均低于 P4 组(84.4%),其中含量最低的是 10 μg/ml 组(78.6%),甚至低于 P2 组(79.1%);PAP 各组软骨细胞增殖指数(19.7%、21.4%、19.4%)均高于 P4 组(12.6%),其中最高的是 10 μg/ml 组(21.4%),甚至高于 P2 组(20.9%),说明 PAP 可有效减少软骨细胞停留于 G0/G1 期的百分含量,提高软骨细胞增殖指数,在一定范围内可抑软骨细胞老化。

2.3 各组软骨细胞 GAG 含量、分子结构 结果见表 2。

表 2 各组软骨细胞 GAG 含量、分子结构(OD 值)
(n=8, x±s)

Tab.2 Glycosaminoglycan content(OD ratio) of chondrocytes in different groups(n=8, x±s)

组别	总糖胺多糖	长链糖胺多糖	长链比(%)
PAP 5 μg/ml	0.251±0.012*	0.197±0.012*	78.50±1.22*
PAP10 μg/ml	0.311±0.014*▲	0.240±0.008*▲	79.70±1.28*▲
PAP15 μg/ml	0.298±0.014*	0.235±0.017*	78.90±1.06*
P4	0.117±0.011	0.045±0.013	38.50±1.43
P2	0.245±0.006	0.193±0.014	78.80±1.27

注:与 P4 组比较:*P<0.01;与 P2 组比较:*P<0.01;与 PAP 5、15 μg/ml 组比较:▲P<0.01

Note:As compared with P4: *P<0.01;As compared with P2: *P<0.01;As compared with PAP 5 μg/ml and 15 μg/ml: ▲P<0.01

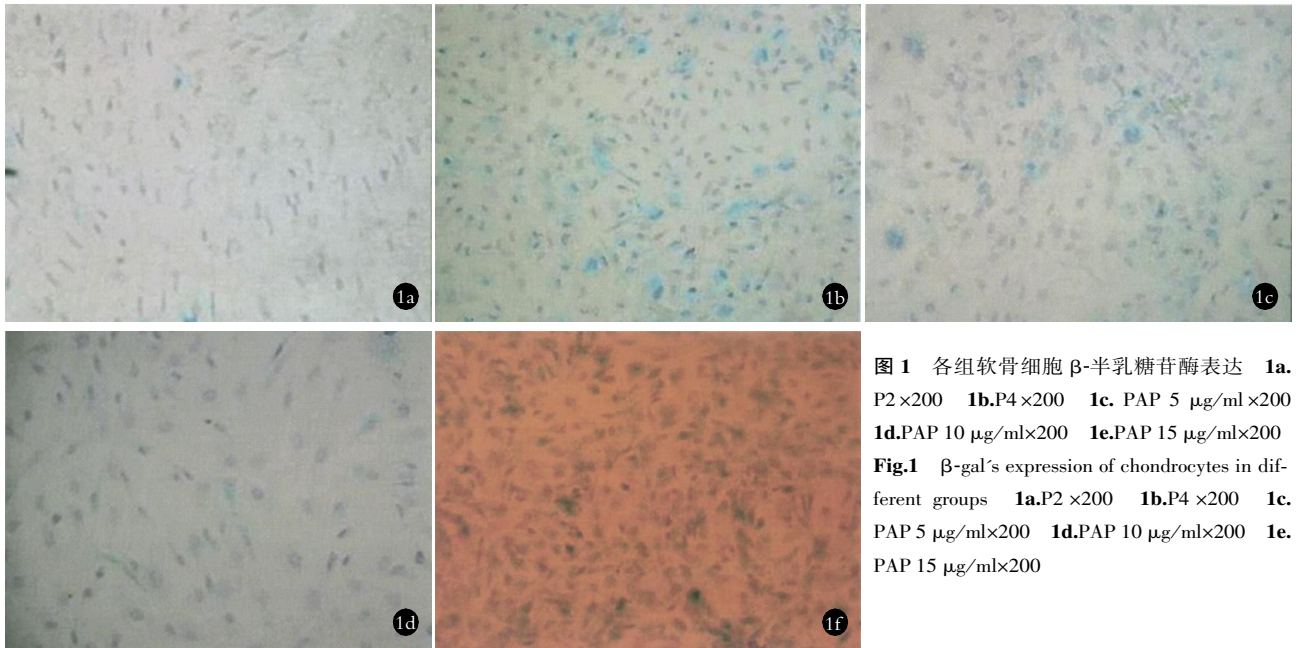


图 1 各组软骨细胞 β-半乳糖苷酶表达 1a. P2×200 1b.P4×200 1c. PAP 5 μg/ml×200 1d.PAP 10 μg/ml×200 1e.PAP 15 μg/ml×200
Fig.1 β-gal's expression of chondrocytes in different groups 1a.P2×200 1b.P4×200 1c. PAP 5 μg/ml×200 1d.PAP 10 μg/ml×200 1e. PAP 15 μg/ml×200

阿立新蓝法检测结果表明 PAP 各组对软骨细胞分泌 GAG 均有促进作用, 与 P4 组相比, PAP 各组 GAG 含量及长链量显著增加 ($P < 0.01$), 尤以 10 μg/ml 浓度剂量促进 GAG 表达作用最显著 ($P < 0.05$), 甚至明显超过 P2 组 ($P < 0.01$)。

2.4 各组软骨细胞 II 型胶原 mRNA 检测结果 结果见图 2。

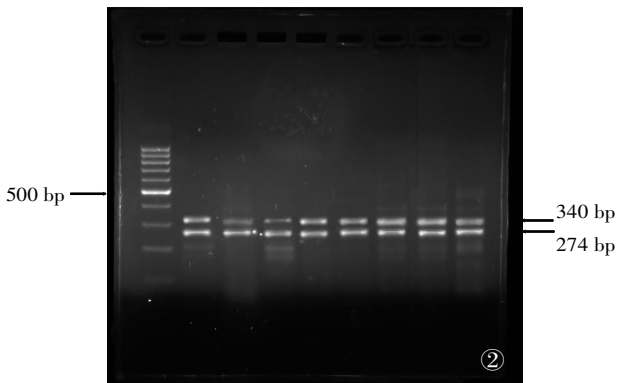


图 2 各组软骨细胞 II 型胶原 mRNA 产物 RT-PCR 电泳图: II 型胶原 mRNA (340 bp) 的表达水平; β-actin (274 bp) 作为内参照; M: 1 000 bp DNA ladder 1: P2, 2: P4, 3: PAP 5 μg/ml, 4: PAP 10 μg/ml, 5: PAP 15 μg/ml

Fig.2 Type II collagen mRNA product electrophoretogram of chondrocytes in different groups; expression of type II collagen mRNA (340 bp); β-actin (274 bp) was used as intra-reference; M: 1 000 bp DNA ladder 1: P2 2: P4 3: PAP 5 μg/ml 4: PAP 10 μg/ml 5: PAP 15 μg/ml

RT-PCR 条带显示 PAP 10 μg/ml 组 (A 值 0.328) 亮度与 P2 组 (A 值 0.334) 较接近, 而 P4 组 (A 值 0.004) 亮度显著弱于 PAP 各组和 P2 组, 在 PAP 各组中 5 μg/ml 组 (A 值 0.315) 与 15 μg/ml 组 (A 值 0.319) 亮度明显弱于 10 μg/ml 组, 说明软骨细胞 P4 代 II 型胶原含量显著减少, 而 PAP 各组对软骨细胞 II 型胶原 mRNA 的表达均有促进作用, 与 P4 组相比, 各组 II 型胶原 mRNA 表达显著增加 ($P < 0.01$), 尤以 10 μg/ml 浓

度剂量促进 II 型胶原 mRNA 表达的作用最显著 ($P < 0.01$), 但其 A 值仍明显低于 P2 组 ($P < 0.01$), 说明 PAP 可以促进 II 型胶原表达, 但不能完全阻止细胞老化退变。

2.5 各组软骨细胞 Aggreacan mRNA 检测结果 结果见图 3。

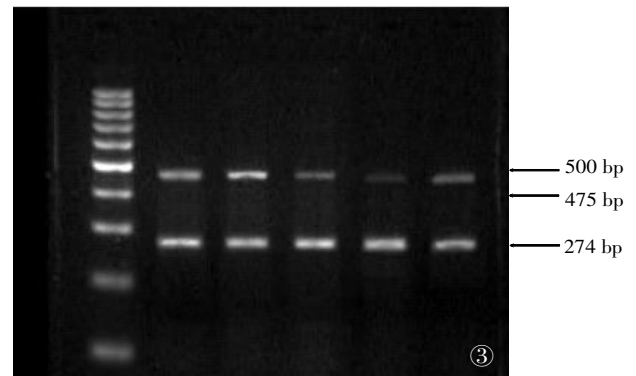


图 3 各组软骨细胞 Aggreacan mRNA 产物 RT-PCR 电泳图: Aggreacan mRNA (475 bp) 的表达水平; β-actin (274 bp) 作为内参照; M: 1 000 bp DNA ladder 1: PAP 5 μg/ml, 2: PAP 10 μg/ml, 3: PAP 15 μg/ml, 4: P4, 5: P2

Fig.3 Aggreacan mRNA product electrophoretogram of chondrocytes in different groups; expression level of Aggreacan mRNA (475 bp); β-actin (274 bp) was used as intra-reference; M: 1 000 bp DNA ladder 1: PAP 5 μg/ml, 2: PAP 10 μg/ml, 3: PAP 15 μg/ml, 4: P4, 5: P2

RT-PCR 条带显示 PAP 10 μg/ml 组 (A 值 0.487) 亮度与 P2 组 (A 值 0.468) 较接近, 而 P4 组 (A 值 0.159) 显著弱于 PAP 各组和 P2 组, 在 PAP 各组中 5 μg/ml 组 (A 值 0.450) 与 15 μg/ml 组 (A 值 0.458) 明显弱于 10 μg/ml 组, 说明软骨细胞 P4 代 Aggreacan mRNA 含量显著减少, 而 PAP 各组对软骨细胞 Aggreacan mRNA 的表达均有促进作用, 与 P4 组相比, 各组 II 型胶原 mRNA 表达量显著增加 ($P < 0.01$), 尤以 10 μg/ml 浓度剂量促进 Aggreacan mRNA 表达的作用最显著 ($P < 0.01$),

而且其 A 值明显高于 P2 组 ($P>0.01$), 说明 PAP 可以促进 Aggrecan 表达, 而且其抑制软骨细胞退变老化的可能途径与其促进 Aggrecan 有关。

3 讨论

祖国医学中, 关节软骨属筋的范畴, 对于关节软骨退变老化常辨证为肝肾虚损, 国内学者从补肝肾养气血角度运用中药及其提取物, 对关节软骨退变老化进行了大量的研究, 郭礼跃等^[10]使用古方稀莪丸对家兔关节软骨退变进行研究显示该方可以保护关节软骨防治退变, 张宇明等^[11]运用黄芪干预软骨细胞发现其可促进软骨细胞 II 型胶原表达。鹿茸具有很强的壮肾阳、益精血、强筋骨的作用, 是重要的滋补强壮中药。鹿茸多肽是从梅花鹿茸中分离纯化出的一种多肽, 经高效液相色谱和 N-末端氨基酸分析鉴定为单一多肽, PAP 由 68 个氨基酸残基组成, 分子量为 7200。实验证明鹿茸多肽具有很强的促进骨髓间质干细胞、软骨细胞增殖的作用^[4-5, 12]。

组化法检测 β -半乳糖苷酶是由 Dimri 等^[5]于 1995 年发现的细胞老化的一个特征, 本实验按照经典的方法对软骨细胞 SA- β -Gal 的表达进行组化检测, 前期实验结果显示^[3], β -半乳糖苷酶染色随着传代培养其阳性表达增多, P4 软骨细胞出现大量阳性染色, 说明, 软骨细胞传代培养与其复制性老化的发生直接相关。本实验证明, 不同浓度的鹿茸多肽既抑制软骨细胞 β -半乳糖苷酶的表达, 组中又以 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组抑制 β -半乳糖苷酶表达的作用最强 ($P<0.05$), 但是增加 PAP 浓度后其抑制 β -半乳糖苷酶表达作用未见明显增加, 说明在一定 PAP 剂量范围内, 鹿茸多肽有抑制软骨细胞老化的作用, 但不能完全阻止软骨细胞老化的进程。

流式细胞仪实验结果表明, 鹿茸多肽不同浓度剂量对软骨细胞的细胞周期均有影响, 其降低了软骨细胞 G0/G1 期的百分含量, 增加了增殖指数, 其中 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度剂量甚至可以使软骨细胞 G0/G1 期的百分含量和增殖指数优于 P2 软骨细胞, 这说明鹿茸多肽能显著提高软骨细胞增殖能力, 同时减少了处于 G1 期的老化细胞比例, 从而间接证明了其抗老化的作用。

GAG、II 型胶原、Aggrecan 是软骨细胞表型的重要标志, 阿立新蓝法检测 GAG 结果显示: 鹿茸多肽对软骨细胞分泌 GAG 的功能有显著促进作用, 其最佳浓度剂量为 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 对于分子结构也具有显著改善。说明, 在一定浓度剂量鹿茸多肽作用下, 软骨细胞分泌 GAG 的能力有所提高, 其分子组成更加优化。RT-PCR 实验发现: 鹿茸多肽具有明显促进软骨细胞合成 II 型胶原和 Aggrecan 功能的作用, 其最佳浓度剂量为 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, II 型胶原和 Aggrecan mRNA 相对表达量均高于 P4

软骨细胞, 组间差异有统计学意义 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 实验证实, 鹿茸多肽对软骨细胞合成 II 型胶原和 Aggrecan 蛋白能力具有明显的促进作用, 鹿茸多肽不能使软骨细胞 II 型胶原的表达超过 P2, 但可以使 Aggrecan 的表达量超过 P2 软骨细胞 ($P>0.05$), 说明药物的干预只能在一定范围内上调 II 型胶原和 Aggrecan 蛋白表达, 并不能完全阻止其传代过程中的去分化表现。

综上所述, 鹿茸多肽可以抑制软骨细胞老化相关 β -半乳糖苷酶的表达, 促进软骨细胞增殖、减少软骨细胞 G1 期细胞含量、促进软骨细胞表型等, 可以抑制软骨细胞复制性老化, 其抗软骨细胞老化作用的强弱尚需作进一步对照实验研究, 其抗老化的机制也需进一步探讨。

参考文献

- Loeser RF, Shanker C. Autocrine stimulation by insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor 2 mediates chondrocytes survival in vitro. *Arthritis Rheum*, 2000, 43(7): 1552-1559.
- Vincenti MP, Brinckerhoff CE. Early response genes induced in chondrocytes stimulated with the inflammatory cytokine interleukin-1 beta. *Arthritis Res*, 2001, 3(6): 381-388.
- 林建华, 陈晓东, 邓凌霄, 等. 大鼠软骨细胞复制性老化的体外观察. *中国修复重建外科杂志*, 2007, 21(11): 1155-1160.
- 林建华, 修忠标, 王日雄. 鹿茸多肽对软骨表型化骨间充质干细胞凋亡的影响. *中国修复重建外科杂志*, 2006, 20(4): 427-430.
- 林建华, 修忠标. 鹿茸多肽对骨髓基质干细胞体外增殖的影响. *中华实验外科杂志*, 2005, 22(7): 821-828.
- Hu DN, Yang PY, Ku MC, et al. Isolation and cultivation of human articular chondrocytes. *Kaohsiung J Med Sci*, 2002, 18(3): 113-120.
- 陈晓东, 林建华. 大鼠软骨细胞分离培养与鉴定. *福建中医学院学报*, 2006, 16(6): 27-29.
- Dimri GP, Lee X, Basile G, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(20): 9363-9367.
- Sven B. Simultaneous preparation and quantitation of proteoglycans by precipitation with alcian blue. *Anal Biochem*, 1993, 210: 282-291.
- 郭礼跃, 胡慧华, 米健国. 古方稀莪丸对膝骨性关节炎模型家兔关节液中 IL-1、TNF- α 含量及关节软骨细胞形态学的影响. *中国骨伤*, 2006, 19(6): 377-378.
- 张宇明, 卫小春. 兔关节软骨细胞体外培养的生物学特性及中药黄芪对其的影响. *中国骨伤*, 2005, 18(5): 275-277.
- 翁梁, 周秋丽, 池岛桥, 等. 马鹿茸促进表皮细胞和软骨细胞分裂的新多肽. *药理学报*, 2001, 36(12): 916.

(收稿日期: 2008-01-27 本文编辑: 王玉蔓)

本刊关于一稿两投和一稿两用等现象的处理声明

文稿的一稿两投、一稿两用、抄袭、假署名、弄虚作假等现象属于科技领域的不正之风, 我刊历来对此加以谴责和制止。为防止类似现象的发生, 我刊一直严把投稿时的审核关, 要求每篇文章必须经作者单位主管学术的机构审核, 附单位推荐信(并注明资料属实、无一稿两投等事项)。希望引起广大作者的重视。为维护我刊的声誉和广大读者的利益, 凡核实属于一稿两投和一稿两用等现象者, 我刊将择期在杂志上提出批评, 刊出其作者姓名和单位, 并对该文的第一作者所撰写的一切文稿 2 年内拒绝在本刊发表, 同时通知相关杂志。欢迎广大读者监督。

《中国骨伤》杂志社