

赵楠楠,王艳,郭艳娟,等. Oct4 和 Cdx2 对牛胚胎内细胞团和滋养外胚层分化的影响[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(6): 818-823.

Zhao NN, Wang Y, Guo YJ, et al. Effects of Oct4 and Cdx2 on differentiation of bovine embryonic inner cell mass and trophoctoderm [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(6): 818-823.

Doi:10. 3969/j.issn.1005-4847. 2020. 06. 012

Oct4 和 Cdx2 对牛胚胎内细胞团和滋养外胚层分化的影响

赵楠楠*,王艳,郭艳娟,高杰,袁金灵,陈燕

(华北理工大学附属医院,河北 唐山 063000)

【摘要】 目的 研究 Oct4 和 Cdx2 敲低对牛 ICM 和 TE 分化相关的基因表达的影响,解释 Oct4 和 Cdx2 在牛胚胎早期发育中的作用。**方法** RNA 干扰敲低牛胚胎 Oct4 或 Cdx2 基因。实时荧光定量 PCR 及免疫荧光染色检测敲低 Oct4 或 Cdx2 基因对牛胚胎早期发育及相关基因表达的影响。**结果** 针对 Oct4 或 Cdx2 基因的特异性 siRNA 能够抑制牛胚胎 Oct4 或 Cdx2 表达。Oct4 敲低对胚胎卵裂率和 8-细胞率无影响,但胚胎囊胚率显著降低, mRNA 水平显著下降($P < 0.05$)。Cdx2 敲低抑制 Oct4 mRNA 表达($P < 0.05$)。**结论** Oct4 通过调节 Cdx2、Sox2 及 Nanog 的表达控制牛胚胎的分化。

【关键词】 Oct4;Cdx2;牛;胚胎发育;细胞分化

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 06-0818-06

Effects of Oct4 and Cdx2 on differentiation of bovine embryonic inner cell mass and trophoctoderm

ZHAO Nannan*, WANG Yan, GUO Yanjuan, GAO Jie, YUAN Jinling, CHEN Yan

(Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China)

Corresponding author: ZHAO Nannan. E-mail: nn0814@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of Oct4 and Cdx2 knockdown on the expression of genes involved in ICM (Inner Cell Mass) and TE (Trophoctoderm) differentiation in cattle, and to elucidate the roles of Oct4 and Cdx2 in the early development of bovine embryos. **Methods** Oct4 and Cdx2 genes were knocked down in bovine embryos by RNA interference. Real-time quantitative PCR and immunofluorescence staining were used to observe the effects of knockdown on early embryo development and gene expression. **Results** Specific siRNAs against Oct4 and Cdx2 inhibited Oct4 and Cdx2 expression, respectively, in bovine embryos. Oct4 knockdown had no effect on embryonic cleavage and eight-cell proportions, although the blastocyst proportion was significantly reduced; moreover, the mRNA levels of Cdx2, Sox2, and Nanog were significantly reduced ($P < 0.05$). Cdx2 knockdown inhibited the expression of Oct4 mRNA ($P < 0.05$). **Conclusions** Oct4 controls the differentiation of bovine embryos by regulating the mRNA expression levels of Cdx2, Sox2, and Nanog.

【Keywords】 Oct4; Cdx2; bovine; embryonic development; cell differentiation

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

[基金项目] 河北省 2020 年度医学科学研究课题计划(20201249),河北省卫生健康委科研基金项目(20180776),河北省省属高等学校基本科研业务费研究项目(JYG2019004)。

Funded by Medical Science Research Project Plan of Hebei Province in 2020(20201249), Research Fund Project of Hebei Health Commission (20180776), Research Project of Fundamental Scientific Research Business Expenses of Provincial Colleges and Universities in Hebei Province (JYG2019004).

[通信作者] 赵楠楠(1985—),女,主治医师,硕士,研究方向:妇产科。Email:nn0814@163.com

哺乳动物胚胎发育过程中第一个可见的分化事件是内细胞团(inner cell mass, ICM)和滋养外胚层(trophoectoderm, TE)的分离。ICM 是一群多能细胞,附着在 TE 的内部,形成胎儿和胚胎外组织。相反,TE 是围绕囊胚腔发育成胎盘的单层极化细胞^[1]。ICM 和 TE 的分离由涉及多个基因相互作用的单独的发育程序调节。

Oct4 和 Cdx2 两种转录因子对 ICM 和 TE 谱系的分离和功能发挥是必需的。Oct4(Pou5f1)是 POU 转录因子家族的一员,在囊胚腔形成后仅在 ICM 中表达,对维持细胞多能性和正常分化为表皮细胞的过程不可或缺^[2]。Cdx2 是正确的细胞命运决定和 TE 分化所需的 TE 特异性转录因子^[3]。Cdx2、Sox2 和 Nanog 是 Oct4 的已知靶点,三者通常形成网络共同调控其他靶点基因。Oct4 基因与 Sox2、Nanog 共同形成和维持胚胎干细胞的多能性和自我更新。缺乏 Oct4 或 Cdx2 表达的小鼠胚胎仍分别形成 ICM 或 TE^[3-5]。这些结果表明,Oct4 和 Cdx2 在囊胚形成后 ICM 和 TE 的分化中都发挥了作用。然而,关于 Cdx2 调节 Oct4 在牛胚胎中的作用,还未有统一的说法。Schiffmacher 等^[6]指出 Cdx2 在牛胚胎中负调节 Oct4。而其他研究表明,牛胚胎 Cdx2 的下调并不影响 Oct4 的表达^[7-8]。目前对牛 ICM 和 TE 分化的分子机制研究有限。本研究希望通过 Oct4 和 Cdx2 敲低对牛 ICM 和 TE 分化相关基因表达的影响,解释 Oct4 和 Cdx2 在牛胚胎早期发育中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞

牛卵母细胞由本院研究室采集并培养。

1.1.2 主要试剂与仪器

QuantiTect 反转录试剂盒购自 Qiagen 公司; VECTASHIELD with DAPI 防荧光淬灭封片剂购自 Vector Labs; Oct4、Cdx2、 β -actin 抗体购自 Santa Cruz Biotechnology; 新生牛血清、RNA 提取试剂盒购自生工生物工程有限公司。

多管架自动平衡离心机 L530; 电热恒温水槽 SSW-420-2S 型; 二氧化碳培养箱 MCO-20AIC-SC; 显微操作仪 Nikon Eclipse Ti; 荧光显微镜; 博日 qPCR 仪。

1.2 方法

1.2.1 体外受精和胚胎培养

采集牛卵巢抽取卵母细胞,捡取卵丘-卵母细胞复合体(cumulus-oocyte complexes, COCs)。COCs 经洗卵液和成熟液分别洗涤 3~5 次,微滴成熟液培养 22 h,培养条件为 39℃、5% CO₂、饱和湿度,无菌矿物油覆盖微滴。成熟后转移至 IVF-100 培养液。解冻的精液在 IVF-100 培养基中 2000 r/min 离心 5 min,共两次。将精子加入 COCs,终浓度为每毫升 5×10^6 个,在 39℃、5% CO₂ 的湿润环境中孵育 6 h。受精后,去除卵丘细胞和多余的精子。显微注射 siRNA,使用含 1% BSA 的改良 TALP 培养基(mTALP),39℃、5% CO₂、5% O₂ 和 90% N₂ 的湿润环境下培养胚胎。第 2 天转移至含 3% 新生牛血清的 mTALP 培养基中,相同条件培养至第 7 天。培养期间统计胚胎发育情况。

1.2.2 siRNA 设计和显微注射

根据 Oct4 和 Cdx2 的基因序列分析和设计原则,确定 Oct4 siRNA 的 Sense Strand 和 Antisense Strand 分别为: 5'-GGAAAGGUGUUCAGCCAAATT-3', 5'-UUUGGCUGAACACCUUUCCTT-3'; Cdx2 siRNA 的 Sense Strand 和 Antisense Strand 分别为: 5'-ACGUGAGCAUGUAUCCCGAGTT-3', 5'-CUGGGGAUACAUGCUCACGUTT-3'。siRNA 序列由上海吉玛制药技术公司合成。受精后,根据说明将裸露的胚胎转移至含 1 mg/mL BSA 的 mTALP 培养基微滴液中进行显微注射。洗涤胚胎并按上述条件进行培养。

根据注射情况将实验对象分为:空白对照(Ctrl)组;阴性对照 siRNA(siCtrl)组;注射 Oct4 特异性 siRNA(siOct4)组和 Cdx2 特异性 siRNA(siCdx2)组。

1.2.3 实时定量荧光 PCR(qPCR)

收集桑椹胚和囊胚,蛋白酶去除囊胚透明带。根据说明进行 RNA 提取、反转录及实时荧光定量 PCR,所用引物为: Oct4 F: 5'-GGTCTCTTTGGAAGGTGTTTC-3', R: 5'-ACACTCGGACCACGTCTTTC-3'; Cdx2 F: 5'-GCCACCATGTACGTGAGCTACC-3', R: 5'-ACATGGTATCCGCCGTAGTCCGG-3'; Nanog F: 5'-AATTCCCAGCAGCAAATCAC-3', R: 5'-CCCTTCCCTCAAATTGACAC-3'。 β -actin 作为内参,SYBR Green 检测产物并计算相对表达量。

1.2.4 免疫荧光染色

4%多聚甲醛室温固定桑椹胚 20 min;含 0.1% Triton X-100 的 PBS(TXPBS)清洗 2 次,每次 10 min;清洗过的样品用含 0.2% Triton X-100 的 PBS 通透 30 min,再清洗 2 次;7%山羊血清封闭 1.5 h 用于 Oct4 染色,0.5% BSA + 1% 脱脂奶粉封闭 1.5 h 用于 Cdx2 染色;TXPBS 清洗 5 min,一抗 4℃ 孵育过夜;TXPBS 清洗一抗 4 次,每次 15 min;二抗室温孵育 1 h;TXPBS 清洗 4 次,每次 20 min;DAPI 染色,VECTASHIELD 封片。倒置荧光显微镜观察实验结果。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 20.0 软件对实验数据进行统计分析。所有数据均以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 LSD 检验。 $P < 0.05$,差异具有显著性。

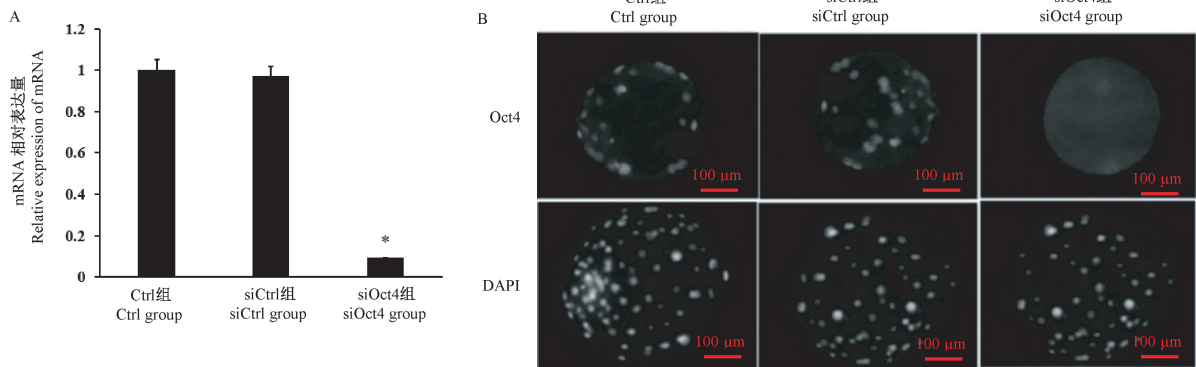
2 结果

2.1 Oct4 siRNA 干扰对 Oct4 mRNA 和蛋白表达的影响

qPCR 结果显示,siOct4 组胚胎 Oct4 mRNA 表达水平显著低于 Ctrl 组和 siCtrl 组 ($P < 0.05$)。免疫荧光染色结果显示,siOct4 组胚胎 Oct4 信号强度显著低于 Ctrl 组和 siCtrl 组。说明 RNA 干扰成功敲低牛胚胎 Oct4 基因(见图 1)。

2.2 Cdx2 siRNA 干扰对 Cdx2 mRNA 和蛋白表达的影响

与 Ctrl 组和 siCtrl 组比较,siOct4 组胚胎中 Cdx2 的 mRNA 和蛋白质表达水平均显著降低 ($P < 0.05$)。说明通过 RNA 干扰成功对牛胚胎的 Cdx2 基因进行了敲低(见图 2)。

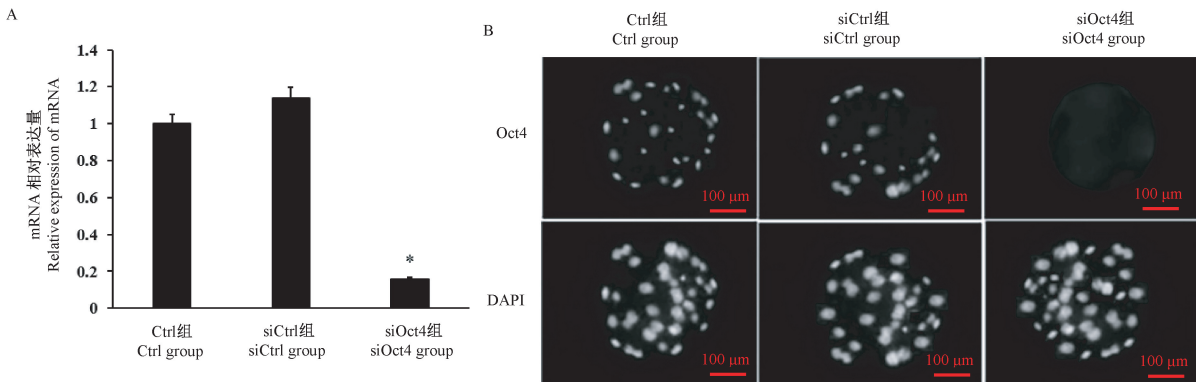


注:A;Oct4 mRNA 相对表达量;B:Oct4 免疫荧光结果。与 Ctrl 组和 siCtrl 组比较,* $P < 0.05$ 。(下图/表同)

图 1 Oct4 siRNA 干扰对 Oct4 mRNA 和蛋白表达的影响

Note. A. Relative expression of Oct4 mRNA. B. immunofluorescence results of Oct4. Compared with Ctrl group and siCtrl group, * $P < 0.05$. (The same in the following figures and tables)

Figure 1 Effect of Oct4 siRNA interference on the expression of Oct4 mRNA and protein



注:A;Cdx2 mRNA 相对表达量;B:Cdx2 免疫荧光结果。

图 2 Cdx2 siRNA 干扰对 Cdx2 mRNA 和蛋白表达的影响

Note. A. Relative expression of Cdx2 mRNA. B. immunofluorescence results of Cdx2.

Figure 2 Effect of Cdx2 siRNA interference on the expression of Cdx2 mRNA and protein

2.3 siRNA 干扰对牛胚胎早期发育的影响

与 Ctrl 组和 siCtrl 组比较,Oct4 敲低的胚胎卵裂率及 8-细胞期比例无差异 ($P>0.05$),囊胚率显著降低 ($P<0.05$) (表 1)。Cdx2 敲低的胚胎卵裂率、8-细胞率及囊胚率与 Ctrl 组和 siRNA 组均无差异 (表 2)。说明 Oct4 基因影响胚胎早期发育过程中的囊胚形成, Cdx2 对胚胎发育到囊胚阶段无影响。

2.4 Oct4 siRNA 干扰对 Cdx2、Sox2 和 Nanog mRNA 水平的影响

与 Ctrl 组和 siCtrl 组相比,siOct4 组的胚胎 Cdx2、

Sox2 和 Nanog mRNA 在囊胚阶段表达水平均显著下降 (图 3, $P<0.05$)。说明在牛胚胎早期发育中, Cdx2、Sox2 和 Nanog mRNA 表达水平与 Oct4 基因有关。

2.5 Cdx2 siRNA 干扰对 Oct4、Sox2 和 Nanog mRNA 水平的影响

与 Ctrl 组和 siCtrl 组相比,siCdx2 组胚胎在囊胚阶段 Oct4 mRNA 表达水平显著降低 (图 4, $P<0.05$), Sox2 mRNA 和 Nanog mRNA 无差异 (图 4B 和图 4C, $P>0.05$)。说明在牛胚胎早期发育中, Cdx2 基因主要影响 Oct4 基因的表达, 对 Sox2 和 Nanog 基因则无影响。

表 1 敲低 Oct4 后牛胚胎早期的发育

Table 1 Embryos early development after Oct4 knockdown

分组 Groups	胚胎总数 Embryo numbers	胚胎卵裂率 (%) Embryonic cleavage rate (%)	8-细胞期比例 (%) 8-cell stage rate (%)	囊胚率 (%) Blastocyst (%)
Ctrl	237	168 (70.89 ± 2.95)	114 (48.10 ± 3.80)	93 (39.24 ± 2.53)
siCtrl	232	160 (68.97 ± 3.45)	107 (46.12 ± 5.17)	83 (35.78 ± 4.74)
SiOct4	228	146 (64.04 ± 5.70)	112 (49.12 ± 7.02)	49 (21.49 ± 7.89)*

表 2 敲低 Cdx2 后牛胚胎早期的发育

Table 2 Embryos early development after Cdx2 knockdown

分组 Groups	胚胎总数 Embryo numbers	胚胎卵裂率 (%) Embryonic cleavage rate (%)	8-细胞期比例 (%) 8-cell stage rate (%)	囊胚率 (%) Blastocyst (%)
Ctrl	210	164 (78.10 ± 9.05)	109 (51.90 ± 10.95)	60 (28.57 ± 8.57)
siCtrl	205	157 (76.59 ± 5.85)	109 (53.17 ± 7.32)	54 (26.34 ± 6.83)
SiCdx2	192	142 (73.96 ± 11.98)	93 (48.44 ± 8.30)	44 (22.92 ± 7.29)

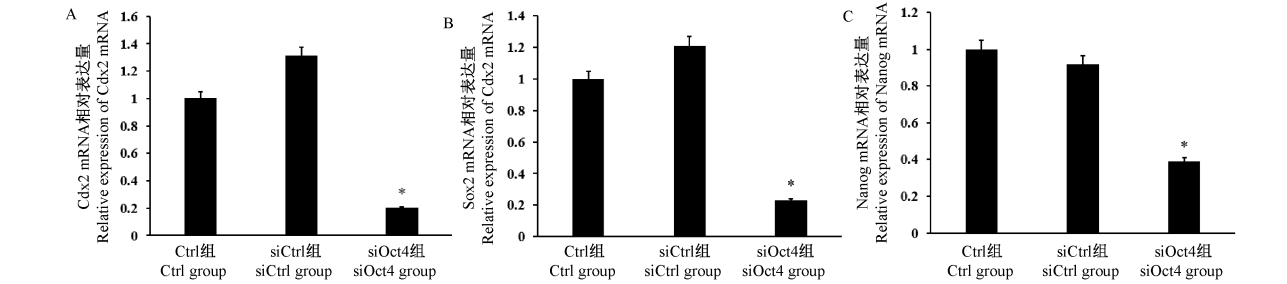


图 3 Oct4 siRNA 干扰对 Cdx2、Sox2 和 Nanog mRNA 水平的影响

Figure 3 Effect of Oct4 siRNA interference on levels of Cdx2, Sox2 and Nanog mRNA

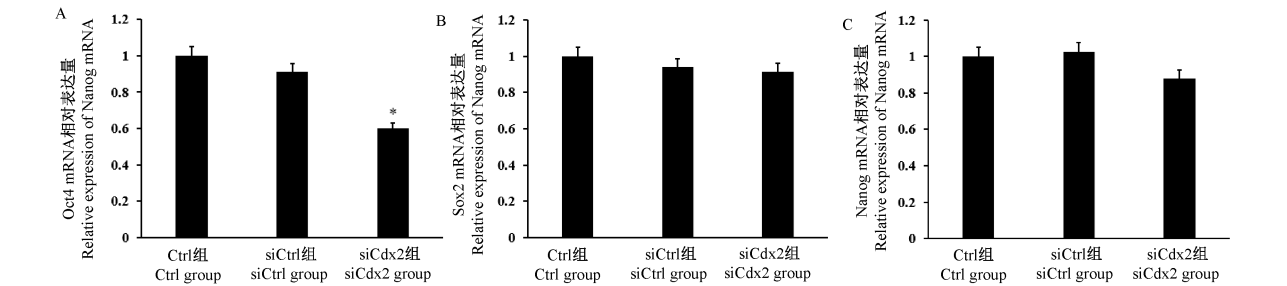


图 4 Cdx2 siRNA 干扰对 Oct4、Sox2 和 Nanog mRNA 水平的影响

Figure 4 Effect of Cdx2 siRNA interference on levels of Cdx2, Sox2 and Nanog mRNA

3 讨论

Oct4 和 Cdx2 是小鼠胚胎中 ICM 和 TE 分化的中心调节因子^[2-4]。Oct4 仅在囊胚的滋养层中表达, Oct4 主要高表达于内细胞团^[4]。Oct4 可调节 ICM 的分化, 指导胚胎干细胞的命运决定^[2,9], 且对于诱导分化细胞的多能性至关重要^[10]。Cdx2 能够通过上调各种 TE 特异性基因和下调 Oct4 与 Nanog 基因促进 TE 谱系的分化^[3]。Cdx2 基因缺失的囊胚不能维持囊胚腔, 无法形成完整的上皮, 且异常调节 ICM 特异性转录因子 Oct4 及 Nanog, 细胞死亡率升高。但 Cdx2 基因缺失的囊胚能够形成 ICM, 且能在体外培养得到胚胎干细胞^[11]。

本项研究中, 我们利用 RNA 干扰技术探究了 Oct4 和 Cdx2 在牛胚胎早期发育中的作用。结果表明, 二者对于牛 ICM 和 TE 的正常分化和健全的囊胚形成至关重要。与小鼠胚胎相比, Oct4 下调对牛胚胎发育的影响更为严重。不同于小鼠胚胎, Oct4 在牛 TE 中的表达不会消失, 即使在完全扩张的囊胚阶段也是如此^[12]。Oct4 可能在牛胚胎的囊胚阶段发挥不同的作用, 如将增殖的 TE 细胞保持在分化延迟状态^[13]。然而, Nganvongpanit 等^[14]表示注射 Oct4 dsRNA 与否对牛胚胎在囊胚阶段的发育率没有显著影响。在本研究中, Oct4 敲低对牛胚胎发育到桑椹胚阶段无影响, 但囊胚的形成显著低于对照组的胚胎。关于注射 Oct4 dsRNA 与 siRNA 的胚胎发育能力不同的原因尚未明确, 注射 Oct4 dsRNA 的胚胎需要相对更长的培养时间才能形成囊胚腔, ICM 细胞的数量也明显较低^[14]。这表明在囊胚形成过程中, Oct4 在不同物种间可能发挥了共同或独特的作用。与 Oct4 不同的是, 本研究发现 siRNA 敲低 Cdx2 后的胚胎, 卵裂率、8-细胞期比例及囊胚率均与对照组胚胎无差别。一方面, Oct4 基因可能影响了胚胎早期发育过程中的囊胚形成。另一方面, 也有可能由于 siRNA 敲低效果减弱或消失, 从而导致注射了特异性 siRNA 的胚胎形成囊胚。

虽然对胎盘早期发育无直接影响, 敲低 Oct4 或 Cdx2 基因对早期发育相关基因的影响却是显著的。Oct4 和 Cdx2 在小鼠胚胎干细胞中抑制彼此的表达^[4]。敲低或敲除 Cdx2 导致 Oct4 在小鼠胚胎中异位表达和过度表达^[3,5]。但本研究发现, 单独敲低牛胚胎中的 Oct4 或 Cdx2 基因, 另一种基因在 mRNA 水平上的表达受到抑制。因此, 在牛胚胎中

可能不存在 Cdx2 与 Oct4 相互抑制的机制。Nanog 基因是 Oct4 的另一个靶基因, 编码一种同源异型蛋白转录因子, 对于维持 ICM 和胚胎干细胞的多能性必不可少。与 Oct4 不同, Nanog 在形成外胚层和内胚层中起决定性作用。小鼠 Nanog mRNA 在致密桑椹胚阶段才表达, 在 ICM 中维持, 而在 TE 中迅速下降。发育中的胚胎多能性的维持还需要转录因子 Sox2 的活性, Sox2 在调控不同细胞系中具有多种功能。小鼠 Sox2 转录产物在桑椹胚阶段开始表达, 在 ICM 中维持, 直至外胚层阶段。多项研究证实了 Sox2 在限定 ICM 分化中的作用^[11]。本研究发现, Oct4 敲低导致 Sox2 和 Nanog mRNA 水平显著下降, Cdx2 敲低对 Sox2 和 Nanog mRNA 水平无影响。这说明 Oct4 通过调节各种基因控制牛胚胎的分化, 而 Cdx2 在牛胚胎的分化中可能是通过调控 Oct4 或其他基因发挥作用。

参 考 文 献 (References)

- [1] Nakhuda G, Jing C, Butler R, et al. Frequencies of chromosome-specific mosaicism in trophoctoderm biopsies detected by next-generation sequencing[J]. Ferti Ster, 2018, 109(5): 857-865.
- [2] Daigneault BW, Rajput S, Smith GW, et al. Embryonic POU5F1 is required for expanded bovine blastocyst formation[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 7753.
- [3] Huang D, Guo G, Yuan P, et al. The role of Cdx2 as a lineage specific transcriptional repressor for pluripotent network during the first developmental cell lineage segregation[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 17156.
- [4] Le Bin GC, Muñoz DS, Kurowski A, et al. Oct4 is required for lineage priming in the developing inner cell mass of the mouse blastocyst[J]. Development, 2014, 141(5): 1001-1010.
- [5] Das B, Pal B, Bhuyan R, et al. MYC regulates the HIF2 α stemness pathway via nanog and Sox2 to maintain self-renewal in cancer stem cells versus non-stem cancer cells[J]. Cancer Res, 2019, 79(16): 4015-4025.
- [6] Schiffmacher AT, Keefer CL. CDX2 regulates multiple trophoblast genes in bovine trophectoderm CT-1 cells[J]. Mol Reprod Dev, 2013, 80(10): 826-839.
- [7] Zhang Z, Zhai Y, Ma X, et al. Down-regulation of H3K4me3 by MM-102 facilitates epigenetic reprogramming of porcine somatic cell nuclear transfer embryos[J]. Cellular Physiol Biochem, 2018, 45(4): 1529-1540.
- [8] Zhou H, Ni Z, Li T, et al. Activation of FXR promotes intestinal metaplasia of gastric cells via SHP dependent up-regulation of the expression of CDX2[J]. Oncol Let, 2018, 15(5): 7617-7624.
- [9] Verner P, Echegaray CV, Oses C, et al. Dynamical reorganization of the pluripotency transcription factors Oct4 and Sox2 during early differentiation of embryonic stem cells[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 5195.

[10] Liu P, Chen M, Liu Y, et al. CRISPR-based chromatin remodeling of the endogenous Oct4 or Sox2 locus enables reprogramming to pluripotency [J]. Cell Stem Cell, 2018, 22 (2): 252-261.

[11] Simmet K, Zakhartchenko V, Philippou-Massier J, et al. OCT4/POU5F1 is required for NANOG expression in bovine blastocysts [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018, 115(11): 2770-2775.

[12] 刘瑞琪, 王玮玮, 屈鹏祥, 等. FGF4 在牛早期胚胎发育过程中的表达[J]. 动物医学进展, 2018, 39(1): 56-60.
Liu RQ, Wang WW, Qu PX, et al. The expression of FGF4 in the early embryonic development of cattle[J]. Prog Vet Med, 2018, 39(1): 56-60.

[13] 吴娜娜. 不同生长因子对牛体外受精胚胎的发育及胚胎干细胞系的建立的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学; 2017.
Wu NN. Effect of different growing factors on development of bovine preimplantation embryos and derivation of embryonic stem cells[D]. Huhhot: Inner Mongolian University; 2017.

[14] Nganvongpanit K, Muller H, Rings F, et al. Selective degradation of maternal and embryonic transcripts in in vitro produced bovine oocytes and embryos using sequence specific double-stranded RNA[J]. Reproduction, 2006, 131(5): 861-874.

[收稿日期] 2020-08-12

《中国实验动物学报》稿约

国内刊号 CN 11-2986/Q 国际刊号 ISSN 1005-4847 邮局代号 2-748

一、杂志介绍

本刊是由中国实验动物学会与中国医学科学院医学实验动物研究所主办的全国性高级学术刊物(双月刊),以理论与实践、普及与提高相结合为宗旨,征稿的范围是与实验动物与动物实验相关的生命科学各分支学科,栏目设置包括研究报告、研究快报和进展与综述。要求来稿材料翔实、数据可靠、文字简练、观点明确、论证合理,有创新、有突破、有新意。

本刊是中国科学引文数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)统计源期刊、《中国学术期刊文摘》来源期刊;被中国生物学文献数据库、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中国科技论文统计源期刊》(中国科技核心期刊)、《中文核心期刊要目总览》等数据库收录。

二、投稿要求及注意事项

文稿内容要具有创新性、科学性和实用性,论点明确,资料可靠,文字通顺精练,标点符号准确,用词规范,图表清晰。文章字数在 6000 字之内。

投稿网址: <http://zgswyd.cnjournals.com/>
期待您的来稿!