

# 构建组织工程瓣膜支架中3种去垢剂的比较\*

李正卿, 马捷

## Construction of tissue-engineering heart valve scaffold with three cell detergents

Li Zheng-qing, Ma Jie

### Abstract

**BACKGROUND:** The method and effect of construction of tissue-engineering heart valve scaffold with cell detergents are different, and the method of detergent combining with the trypsinase and nuclease is more suitable than others.

**OBJECTIVE:** To investigate the effect of different detergents (sodium deoxycholate, sodium dodecylsulfate, and triton) combined with trypsinase on decellularized porcine heart valve and the influence on the acellular scaffold.

**METHODS:** Porcine aortic valve leaflets were sterilized by antibiotics for 12 hours, maintained in the solution of the trypsin and the EDTA for 12 hours, and treated with sodium deoxycholate, sodium dodecylsulfate, and triton. Finally, the sample was dip in nuclease solution for 12 hours to remove endothelial cells and interstitial cells. HE staining was used to detect whether the endothelial cells were removed completely, Masson staining was used to evaluate damage level of collagen fiber and elastic fiber, and electronic scanning was used to observe the microstructure.

**RESULTS AND CONCLUSION:** All the three detergents completely removed the endothelial cells; however, the effect of sodium deoxycholate on collagen fiber and elastic fiber was light, and then sodium dodecylsulfate and triton. This suggested that the method of DOA combining with the enzyme digestion was a suitable technique to construct tissue-engineering heart valve scaffold.

Li ZQ, Ma J. Construction of tissue-engineering heart valve scaffold with three cell detergents. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(8):1349-1352. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

### 摘要

**背景:** 目前, 组织工程瓣膜去细胞支架的制备方法和效果各不相同, 但总的来说, 酶结合去垢剂法显示出一定的优势作用。  
**目的:** 探讨脱氧胆酸钠、十二烷基硫酸钠、曲拉通 3 种去垢剂结合酶消化法对于猪主动脉瓣膜脱细胞的效果以及去细胞后对支架的影响。

**方法:** 将新鲜猪主动脉瓣膜用抗生素溶液浸泡 12 h 后, 置于胰蛋白酶和 EDTA 溶液中 12 h, 再分别用脱氧胆酸钠、十二烷基硫酸钠、曲拉通进行处理, 最后转入核酸酶溶液中浸泡 12 h, 以达到去除内皮细胞和间质细胞的目的, 常规苏木精-伊红染色观察内皮细胞是否除完全, Masson 染色观察胶原纤维和弹力纤维损害程度, 电子扫描显微镜观察纤维结构以评价效果。

**结果与结论:** 3 种去垢剂结合酶消化法均能彻底去细胞, 但脱氧胆酸钠对支架胶原纤维和弹力纤维的损害较轻微, 十二烷基硫酸钠次之, 曲拉通对支架的损害作用最大。提示脱氧胆酸钠结合酶消化法是一种较合理的组织工程瓣膜支架构建方法。

**关键词:** 脱氧胆酸钠; 十二烷基硫酸钠; 曲拉通; 去垢剂; 酶消化法; 组织工程; 支架材料; 心脏瓣膜

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.08.005

李正卿, 马捷. 构建组织工程瓣膜支架中 3 种去垢剂的比较[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(8):1349-1352. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

## 0 引言

各种原因引起的心脏瓣膜结构破坏和功能失调, 是心脏瓣膜病患者发病和死亡的主要原因<sup>[1]</sup>。瓣膜置换是治疗瓣膜衰竭主要且有效的办法<sup>[2]</sup>, 但是其置换物机械瓣和生物瓣存在需要终身抗凝、瓣膜衰败、不能生长等缺点, 在临床应用上受到一定的限制<sup>[3]</sup>。组织工程瓣膜是一种能够克服上述缺点的理想瓣膜, 其基本点可以概括为以下3点: ①细胞支架材料的研究。②种子和细胞支架之间的黏附、增殖。③种子细胞的研究<sup>[4-5]</sup>, 其中瓣膜支架具备低抗原、高亲水、可生长等性能<sup>[6]</sup>, 所以支架的选取是构建组织工程瓣膜成功与否的关

键<sup>[7-9]</sup>。猪主动脉瓣膜与人心脏瓣膜在解剖结构和组织形态类似, 在去除内皮细胞后是一种比较理想的组织工程瓣膜支架<sup>[10]</sup>。目前, 去垢剂结合酶消化法与单纯酶消化法和单纯去垢剂相比显示出一定的优势作用。本实验采用3种常用的去垢剂—脱氧胆酸钠(DOA)、十二烷基硫酸钠(SDS)、曲拉通(Triton-X100)分别结合胰蛋白酶和核酸酶对猪主动脉瓣膜进行处理, 以期获得一种较好的组织工程瓣膜支架的构建方法。

## 1 材料和方法

**设计:** 体外对比观察实验。

**时间及地点:** 实验于2009-04/07在山西医

Department of Cardiothoracic Surgery, Second Affiliated Hospital, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Li Zheng-qing★, Studying for master's degree, Department of Cardiothoracic Surgery, Second Affiliated Hospital, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China 371128013@qq.com

Correspondence to: Ma Jie, Professor, Doctor, Department of Cardiothoracic Surgery, Second Affiliated Hospital, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Received: 2009-11-09  
Accepted: 2010-01-01

山西医科大学第二附属医院心胸外科, 山西省太原市 030001

李正卿★, 男, 1983年生, 陕西省神木县人, 汉族, 山西医科大学第二附属医院心胸外科在读硕士, 主要从事心血管外科与心肌保护方面的研究。371128013@qq.com

通讯作者: 马捷, 教授, 博士, 山西医科大学第二附属医院心胸外科, 山西省太原市 030001

中图分类号: R318  
文献标识码: B  
文章编号: 1673-8225 (2010)08-01349-04

收稿日期: 2009-11-09  
修回日期: 2010-01-01  
(20091109026/M-H)

科大学第二医院心胸外科实验室完成。

**材料:**

主要试剂	来源
DOA, SDS, Triton-X100, 胰蛋白酶, 乙二胺四乙酸二钠(EDTA)	上海生物工程有限公司
核糖核酸酶(RNase I), 脱氧核糖核酸酶(DNase I)	美国 Sigma 公司
UNIQU-10 柱式动物基因组 DNA 抽提试剂盒	上海生物工程有限公司

**实验方法:**

**猪主动脉瓣膜的获取:** 在猪宰杀后1 h内清洁条件下取出心脏, 生理盐水冲洗, 将主动脉瓣连同瓣上2 cm升主动脉一并取出。置入4 °C PBS液中带回实验室, 无菌条件下剪取主动脉瓣膜, 仔细修剪去除附瓣肌肉组织。后置于4 °C含抗生素DMEM(头孢唑林100 g/L, 庆大霉素0.4 g/L, 二性霉素B 0.5 g/L)溶液浸泡12 h。

**猪主动脉瓣膜的处理:**

**DOA组(n=20):** ①瓣叶置入37 °C含0.05%胰蛋白酶和0.02%EDTA的PBS溶液中持续振荡12 h, 磷酸盐缓冲液清洗3次, 15 min/次。②转入37 °C 1%DOA持续振荡24 h, 再用PBS液清洗3次, 15 min/次。③转入 37 °C 20 mg/L RNase I 和200 mg/L DNase I 振荡1 h。

**SDS组(n=20):** ①瓣叶置入37 °C含0.05%胰蛋白酶和0.02%EDTA的PBS溶液中持续振荡12 h, 磷酸盐缓冲液清洗3次, 15 min/次。②转入37 °C 0.03% SDS持续振荡24 h, 再用PBS液清洗3次, 15 min/次。③转入 37 °C 20 mg/L RNase I 和200 mg/L DNase I 振荡1 h。

**TritonX-100组(n=20):** ①瓣叶置入37 °C含0.05%胰蛋白酶和0.02%EDTA的PBS溶液中持续振荡12 h, 磷酸盐缓冲液清洗3次, 15 min/次。②装入4 °C 1% TritonX-100溶液持续振荡48 h, 再用PBS液清洗3次, 15 min/次。③转入 37 °C 20 mg/L RNase I 和200 mg/L DNase I 振荡1 h。

**主要观察指标:**

**光镜观察:**

脱细胞完毕后, 标本用体积分数为10%中性甲醛固定, 石蜡包埋, 100 μm厚切片, 行苏木精-伊红染色和Masson染色。

**电镜观察:**

用于扫描电镜标本固定于2.5%戊二醛溶液, 4 °C储存送检。

**瓣叶DNA含量分析:**

将样本组织置液氮中研磨成粉, 分别加入digestion buffer、Proteinasek和BDbuffer充分裂解, 无水乙醇提取, 吸附柱吸取样品DNA, 洗脱液Elution buffer回收基因组DNA, 分光光度计按10A<sub>260</sub>=50 μg测定样本A值, 以A值表达组织基因组DNA含量。

**统计学分析:** 应用SPSS 13.0软件进行统计分析。

分析方法采用单因素方差分析, 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用Bonferroni法,  $P < 0.05$ 认为差异有显著意义。

**2 结果**

**2.1 大体观察** 3组去细胞瓣膜均白色透明, DOA组去细胞瓣膜表面伸展, 有光泽, 富有弹性; SDS组去细胞瓣膜变软, 表面皱缩, 弹性减退; Triton-X100组处理后瓣膜丧失其弹性, 变为柔软的一团。

**2.2 光镜观察结果** 3组处理后瓣膜支架苏木精-伊红染色均未见蓝染的内皮细胞核和间质细胞的残留。胶原纤维染色可见DOA组胶原纤维走向自然清晰, 纤维结构紧密, 波浪状结构保存完好; SDS组胶原纤维走向模糊, 纤维间隔变窄, 可见纤维肿胀, 结构模糊, 波浪状结构消失; Triton-X100组可见胶原纤维肿胀明显, 纤维有断裂, 结构松散。见图1。

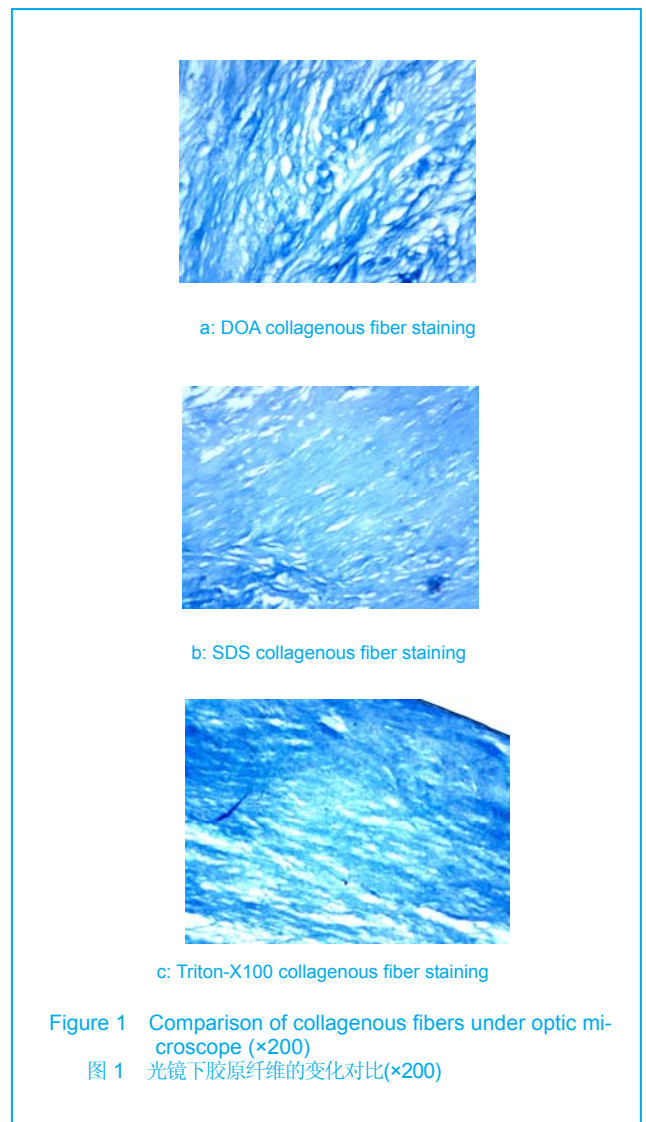


Figure 1 Comparison of collagenous fibers under optic microscope (x200)  
图1 光镜下胶原纤维的变化对比(x200)

**设计、实施、评估者:** 实验设计、资料收集、实施、评估均由作者完成, 评估时采用盲法。

**2.3 扫描电镜观察** 3组处理结果均未见内皮细胞和间质细胞的碎片残留。但DOA组纤维结构呈波浪状, 排列致密、有序, 未见明显断裂; SDS组见纤维结构较为松散、纤维间间隙增大且不规则, 纤维有轻度肿胀断裂; Triton-100组纤维结构紊乱, 有明显的肿胀, 断裂。

**2.4 瓣叶DNA含量测定** DOA组( $0.051\pm 0.007$ ) mg/g; SDS组( $0.055\pm 0.005$ ) mg/g; Triton-100组( $0.053\pm 0.0063$ ) mg/g。3组之间差异无显著性意义( $F=0.059$ ,  $P>0.05$ )。

### 3 讨论

组织工程瓣膜是20世纪80年代提出来的一个新概念, 到目前为止, 组织工程学已经在骨外科, 烧伤整形等领域有比较广泛而成功的应用<sup>[11-14]</sup>, 组织工程瓣膜在实践过程中曾经历过重大的挫折, 并且导致3例患者的死亡<sup>[15-17]</sup>, 有研究认为这是由于去细胞瓣膜上的细胞外基质与宿主之间的免疫反应导致了细胞外基质结构的削弱而引起瓣膜支架的撕裂造成的<sup>[18-20]</sup>。

组织工程瓣膜包括3个要素: 特定的组织细胞、细胞支架材料、促细胞生长因子<sup>[4,21]</sup>。其中细胞支架起中心作用, 为特定的细胞提供结构支撑作用、引导组织再生和控制组织结构。瓣膜的内皮细胞是抗原性最强的成分, 如果去除内皮细胞不完全而残余细胞碎片(如磷酸盐结晶, 膜磷脂)可诱发钙盐沉积, 致植入的生物源性瓣膜变性、钙化及衰败<sup>[22-23]</sup>。去除瓣膜细胞和细胞内可溶性蛋白后, 其免疫性降低, 而细胞外基质抗原性较弱, 其中含有多种促细胞黏附生长的因子及多肽片断, 对细胞的黏附、迁移、增殖、分化以及基因表达的调控具有重要作用。因此, 去细胞天然猪主动脉支架中应无细胞及细胞碎片留存, 而瓣叶细胞外基质, 胶原纤维与瓣膜的负荷承受有关, 弹性纤维与瓣膜的弹性回缩有关。因此保留完整的胶原纤维和弹性纤维, 对组织工程瓣膜的生物力学特性极为重要, 否则可导致瓣膜撕裂或脱垂, 引起植入瓣膜功能的衰败<sup>[24]</sup>。

组织工程瓣膜去细胞支架的制备方法主要有: 胰蛋白酶法、十二烷基硫酸钠法和去氧胆酸钠法等, 虽然几种脱细胞方法的效果各不相同<sup>[25-29]</sup>。但总的来说, 酶结合去垢剂法显示出一定的优势作用。

Booth等<sup>[24]</sup>发现, 0.03%SDS和0.5%~2%的DOA能完全去除内皮细胞, 而瓣叶基质的主要成分保存了下来。Courtman等<sup>[30]</sup>用去垢剂和核酸酶的方法得到去细胞猪主动脉瓣, 结果显示在去除了细胞和部分可溶性蛋白成分的同时, 瓣膜的基本结构和力学特性如热收缩温度和抗张强度均得以保存。董念国等<sup>[31]</sup>比较了数种去细胞方法后, 认为联合应用胰蛋白酶与Triton-X100优于反复冻融和单纯胰蛋白酶法, 细胞外基质保存完整, 所得去

细胞支架与新鲜瓣膜组织形态学特征接近, 是一种良好的去细胞方法。

本实验采用DOA、SDS、Triton-X100分别结合胰蛋白酶和核酸酶对猪主动脉瓣膜进行去细胞处理。先用0.05%胰蛋白酶对血管壁中的某些基质进行溶解使细胞间隙疏松和对细胞的完整性加以破坏, 再分别利用离子型去污剂1%DOA、0.03%SDS、1%Triton-X100, 溶解细胞的脂质双分子层, 使细胞溶解, 后加入核酸酶以破坏细胞核碎片的核酸, 防止残留细胞核碎片引起炎症反应。实验发现3种方法都完全去除了瓣叶内皮细胞。但0.03%SDS和1%Triton-X100均使去细胞支架胶原纤维产生不同程度的肿胀, 断裂。而1%DOA对支架的影响轻微。

**结论:** 脱氧胆酸钠法处理的瓣叶较为理想, 去除细胞彻底, 又不改变瓣叶支架结构, 是一种良好的组织工程瓣膜支架制作方法。

### 4 参考文献

- [1] Zhou K, Zhou XM. Guoji Shengwu Yixue Gongcheng Zazhi. 2006; 29(2): 110-113.  
周康, 周新民. 组织工程心脏瓣膜及干细胞应用前景[J]. 国际生物医学工程杂志, 2006, 29(2): 110-113.
- [2] Carabello BA, Crawford FA Jr. Valvular heart disease. N Engl J Med. 1997; 337(1): 32-41.
- [3] Shinoka T, Breuer CK, Tanel RE, et al. Tissue engineering heart valves: valve leaflet replacement study in a lamb model. Ann Thorac Surg. 1995; 60(6 Suppl): S513-516.
- [4] Qiu XF, Dong NG. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2008; 12(29): 5719-5722.  
邱雪峰, 董念国. 组织工程心脏瓣膜的种子细胞[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(29): 5719-5722.
- [5] Nemeth NL, Butler CE. Complex torso reconstruction with human acellular dermal matrix: long-term clinical follow-up. Plast Reconstr Surg. 2009; 123(1): 192-196.
- [6] Freed LE, Vunjak-Novakovic G, Biron RJ, et al. Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. Biotechnology (N Y). 1994; 12(7): 689-693.
- [7] Mirensky TL, Breuer CK. The development of tissue-engineered grafts for reconstructive cardiothoracic surgical applications. Pediatr Res. 2008; 63(5): 559-568.
- [8] Migneco F, Hollister SJ, Birla RK. Tissue-engineered heart valve prostheses: 'state of the heart'. Regen Med. 2008; 3(3): 399-419.
- [9] Lichtenberg A, Cebotari S, Tudorache I, et al. Biological scaffolds for heart valve tissue engineering. Methods Mol Med. 2007; 140: 309-317.
- [10] Liu Y, Liu WY. Zhongguo Xiongxin Xueguan Waike Zazhi. 2005; 12(1): 38-41.  
刘洋, 刘维永. 去细胞组织工程心脏瓣膜[J]. 中国胸心血管外科杂志, 2005, 12(1): 38-41.
- [11] Vacanti CA, Bonassar LJ, Vacanti MP, et al. Replacement of an avulsed phalanx with tissue-engineered bone. N Engl J Med. 2001; 344(20): 1511-1514.
- [12] Swieszkowski W, Tuan BH, Kurzydowski KJ, et al. Repair and regeneration of osteochondral defects in the articular joints. Biomol Eng. 2007; 24(5): 489-495.
- [13] Singh MK, Rocca JP, Rochon C, et al. Open abdomen management with human acellular dermal matrix in liver transplant recipients. Transplant Proc. 2008; 40(10): 3541-3544.
- [14] Becker S, Saint-Cyr M, Wong C, et al. AlloDerm versus DermaMatrix in immediate expander-based breast reconstruction: a preliminary comparison of complication profiles and material compliance. Plast Reconstr Surg. 2009; 123(1): 1-6.
- [15] Simon P, Kasimir MT, Seebacher G, et al. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients. Eur J Cardiothorac Surg. 2003; 23(6): 1002-1006.
- [16] Mendelson K, Schoen FJ. Heart valve tissue engineering: concepts, approaches, progress, and challenges. Ann Biomed Eng. 2006; 34(12): 1799-1819.
- [17] Schmidt D, Stock UA, Hoerstrup SP. Tissue engineering of heart valves using decellularized xenogeneic or polymeric starter matrices. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2007; 362(1484): 1505-1512.

- [18] Bechtel JF, Stierle U, Sievers HH. Fifty-two months' mean follow up of decellularized SynerGraft-treated pulmonary valve allografts. *J Heart Valve Dis.* 2008;17(1):98-104.
- [19] Miller DV, Edwards WD, Zehr KJ. Endothelial and smooth muscle cell populations in a decellularized cryopreserved aortic homograft (SynerGraft) 2 years after implantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2006;132(1):175-176.
- [20] Lichtenberg A, Tudorache I, Cebotari S, et al. Preclinical testing of tissue-engineered heart valves re-endothelialized under simulated physiological conditions. *Circulation.* 2006;114(1 Suppl):1559-565.
- [21] Kim BS, Mooney DJ. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *Trends Biotechnol.* 1998;16(5):224-230.
- [22] Badylak SF. The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Semin Cell Dev Biol.* 2002;13(5):377-383.
- [23] Oei FB, Stegmann AP, van der Ham F, et al. The presence of immune stimulatory cells in fresh and cryopreserved donor aortic and pulmonary valve allografts. *J Heart Valve Dis.* 2002;11(3):315-324.
- [24] Booth C, Korossis SA, Wilcox HE, et al. Tissue engineering of cardiac valve prostheses I: development and histological characterization of an acellular porcine scaffold. *J Heart Valve Dis.* 2002;11(4):457-462.
- [25] Van Lieshout M, Peters G, Rutten M, et al. A knitted, fibrin-covered polycaprolactone scaffold for tissue engineering of the aortic valve. *Tissue Eng.* 2006;12(3):481-487.
- [26] Kasimir MT, Rieder E, Seebacher G, et al. Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves. *Int J Artif Organs.* 2003;26(5):421-427.
- [27] Mirsadraee S, Wilcox HE, Korossis SA, et al. Development and characterization of an acellular human pericardial matrix for tissue engineering. *Tissue Eng.* 2006;12(4):763-773.
- [28] Yang M, Chen CZ, Cheng SF, et al. Zhonghua Xiongxin Xueguan Waike Zazhi. 2005;21(6):349-351.  
杨岷, 陈长志, 成少飞, 等. 牛细胞组织工程支架脱细胞方法的比较[J]. 中华胸心血管外科杂志, 2005, 21(6):349-351.
- [29] Wang KX, Zhang JF, Zhan QP, et al. Diyi Junyi Daxue Xuebao. 2005; 25(1):22-25.  
王克学, 张镜方, 詹秋鹏, 等. 胰蛋白酶法和 Triton-X 法去除瓣膜细胞的效果比较[J]. 第一军医大学学报, 2005, 25(1):22-25.
- [30] Courtman DW, Pereira CA, Kashef V, et al. Development of a pericardial acellular matrix biomaterial: biochemical and mechanical effects of cell extraction. *J Biomed Mater Res.* 1994; 28(6):655-666.
- [31] Dong NG, Ye XF, Shi JW, et al. Zhonghua Shiyian Waike Zazhi. 2005;22(3): 377.  
董念国, 叶晓峰, 史嘉玮, 等. 组织工程瓣膜天然支架去细胞方法的比较[J]. 中华实验外科杂志, 2005, 22(3): 377.

来自本文课题的更多信息——

**致谢:** 感谢在实验中给予帮助的 2007 级师兄梁艳盆同学和 2008 级师弟成尚林同学。以及在指标测定过程中给予指导的山西医科大学寄生虫教研室赵老师。

**利益冲突:** 无利益冲突。

**课题意义:** 组织工程瓣膜去细胞支架的制备方法和效果各不相同, 目前各种探索研究方法均显示出酶结合去垢剂法的优势作用, 本文选取不同去垢剂分别结合酶消化法进行对比研究, 求取一种最佳技术方法, 减少未来一些不必要的实验浪费。

**课题评估的“金标准”:** 对组织工程瓣膜支架各项评价指标有: 内皮细胞是否去除完全, 胶原纤维和弹力纤维是否有损伤, 细胞 DNA 碎片残留量的多少。实验在评价时均以此为标准。

**设计或课题的偏倚与不足:** 课题选取传统的组织工程瓣膜支架制备方法中认为最佳的制备方式以进行组间对比, 以确立一种最佳的制备方法, 但在制备过程中各项步骤用时较长, 是否对瓣膜支架有不良影响, 是否在时间缩短后能制备出更佳的瓣膜支架, 尚需进一步的实验研究。

**提供临床借鉴的价值:** 本实验以对比观察的方式证实脱氧胆酸钠结合酶消化法对组织工程瓣膜支架的损伤最轻, 为临床制备组织工程瓣膜提供必要的实验意见。

向 SCI 收录的国际优秀杂志投稿: 谁会助你一臂之力?

**背景:** 学术交流日益国际化的今天, 在医学界从事学术研究的您经历了艰辛的努力与劳动观察和得到很多首发或验证性的有意义的实验结果, 如果这些能够抢先在国际相关的学科杂志上发表, 不仅能使学科界认可, 且有利于扩大和提升您科研成果的价值, 确定您进一步深入开展此项实验的意义。

**面临的问题:** 鉴于语言习惯问题, 文章语言表述的准确性及母语化无法得到保证。致使大多数稿件都会因语言问题而被退回。

**解决的途径:**

- 找代译公司翻译? 可能存在的弊端是学科专业语言的使用受到限制, 降低文章的学科专业性。
- 与长期从事生物医学中文及英文稿件的编辑工作, 又与国际英文编辑机构有良好的合作与沟通的本刊进行合作会使您登上国际杂志发表文章的直通车。

**承诺的依据:**

**专业性:** 具有 14 年生物医学中文英文文章的编辑和出版经验, 时刻站在学术的前沿, 洞悉国际上的学术研究热点。

**言语保障:** 与国际英文编辑机构进行良性的无障碍沟通, 可实现文章语言的精确表达与母语化。信心更源于本社《中国神经再生研究(英文版)》已被 SCI 收录, 使我们积累了这方面的诸多经验。

**实施的步骤:**

- 中文稿件: 为避免在投稿后因稿件体例不符而被国际期刊退回, 可提前选择好准备投稿的国际杂志, 并按该杂志体例要求整理稿件后再委托本刊译文服务。也可提供国际期刊体例的投稿体例要求和样稿一篇, 在本刊委托专业人员翻译完成译文时进行参考。
- 英文稿件: 自行按国际杂志的投稿

体例要求整理好的稿件会直接送交专业医学英语高级编辑进行英语语言润色。只提供该杂志的投稿体例要求和样稿一篇的文章, 本刊会在送交专业医学英语高级编辑英语语言润色修改前根据投稿杂志要求对稿件进行编辑。

○ 作者投稿后, 国际期刊对稿件英语表述提出问题, 本刊可负责沟通国外编辑机构修改至符合要求。如系作者本人对文章语言进行修改所出现的语言问题, 本刊将不再负责。

**服务程序:**

- 作者如同意本刊代为服务, 请先将稿件用 E-mail 投来, 经国际编委评估后方能决定本刊是否接受为其做相应服务工作。
- 本刊同意为其服务后, 将与作者签订一份协议, 双方签定协议后, 本刊通知作者相关费用。
- 作者认可相关费用并寄至本刊, 本刊可开展相关服务。
- 如果作者能及时配合相关工作的前提下, 从服务开始至作者收到英文润色后稿件需 30~60 天, 如有特殊时间要求, 可双方沟通解决。