

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.41.003 [http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]

刘永琦^{1,2}, 达瑞¹, 窦娟娟¹, 苏菊萍¹, 颜春鲁¹. 氯化镉对小鼠骨髓间充质干细胞微核率和染色体畸变率的影响[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(41):7612-7616.

氯化镉对小鼠骨髓间充质干细胞微核率和染色体畸变率的影响***

刘永琦^{1,2}, 达瑞¹, 窦娟娟¹, 苏菊萍¹, 颜春鲁¹

¹ 甘肃中医学院, 甘肃省兰州市 730030; ² 甘肃省中药药理与毒理学省级重点实验室, 甘肃省兰州市 730030

刘永琦★, 男, 1973年生, 汉族, 2002年成都中医药大学毕业, 硕士, 教授, 硕士生导师, 主要从事中医药免疫学及干细胞生物学与中医药科学研究。
liuyongqi73@163.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 2095-4344 (2012)41-07612-05

收稿日期: 2012-01-07
修回日期: 2012-02-20
(20110915014/G·S)

文章亮点: 采用氯化镉作为诱导物, 诱导小鼠骨髓间充质干细胞株产生遗传物质改变, 通过微核试验及染色体分析其畸变程度, 结果显示骨髓间充质干细胞在氯化镉诱导下产生了畸变。

关键词: 骨髓间充质干细胞; 氯化镉; 微核率; 染色体畸变率; 干细胞

缩略语: 骨髓间充质干细胞: bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs; 氯化镉: cadmium chloride, CdCl₂

摘要

背景: 氯化镉对骨髓间充质干细胞遗传方面影响的研究暂无报道。

目的: 观察化学毒性物质氯化镉对骨髓间充质干细胞微核率和染色体畸变率的影响。

方法: 贴壁培养小鼠骨髓间充质干细胞细胞株, 显微镜下观察空白对照组及氯化镉诱导组骨髓间充质干细胞的形态学变化, 微核实验检测两组微核率, 染色体分析检测两组染色体畸变率。

结果与结论: 显微镜下观察, 空白对照组细胞呈成纤维细胞样贴壁生长, 胞体透亮, 折光性强; 氯化镉诱导组细胞呈凸起回缩, 细胞变小、变圆, 贴壁不牢, 悬浮细胞增多。与空白对照组比较, 氯化镉诱导组骨髓间充质干细胞微核发生率和染色体畸变率均显著增加($P < 0.05$)。提示氯化镉可引起小鼠骨髓间充质干细胞遗传物质的损伤。

Effects of cadmium chloride on micronucleus rate and chromosome aberration rate in mouse bone marrow mesenchymal stem cells

Liu Yong-qi^{1,2}, Da Rui¹, Dou Juan-juan¹, Su Ju-ping¹, Yan Chun-lu¹

Abstract

BACKGROUND: There have been no reports describing the effects of cadmium chloride on heredity of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs)

OBJECTIVE: To investigate the effects of cadmium chloride on micronucleus rate and chromosome aberration rate in mouse BMSCs.

METHODS: Mouse BMSCs were cultured by adherence method. Morphology of BMSCs was observed in the blank control group and cadmium chloride-induced group. The micronucleus rate and chromosome aberration rate in mouse BMSCs were determined.

RESULTS AND CONCLUSION: Under the microscope, cells in the blank control group grew adherently like fibroblasts, with transparent soma and strong refraction; in the cadmium chloride-induced group, cells were retracted, somas became small and round, and were weakly adherent, and suspension cells increased. The micronucleus rate and chromosome aberration rate in mouse BMSCs were significantly increased in the cadmium chloride-induced group than in the blank control group ($P < 0.05$). These findings suggest that cadmium chloride can cause damage to BMSC genetic material.

Liu YQ, Da R, Dou JJ, Su JP, Yan CL. Effects of cadmium chloride on micronucleus rate and chromosome aberration rate in mouse bone marrow mesenchymal stem cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(41): 7612-7616.

0 引言

骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 是临床细胞与移植治疗的重要种子细胞, 其相关基础和临床的研究越来越受到关注^[1]。但在BMSCs自身分化增殖过程中, 其本身还参与了肿瘤的生长和发展, 因此研究BMSCs移植后的安全性及成瘤性十分必要^[2]。镉是被证实的毒性物质, 其对哺乳动物具有致畸、致癌、致突变的作用^[3]。本实验通过观察氯化镉 (cadmium chloride, CdCl_2) 对BMSCs形态学、细胞微核率及染色体畸变率的影响作用, 为BMSCs移植的安全性研究提供遗传毒理学参考依据。

1 材料和方法

设计: 细胞学与遗传学体外观察实验。

时间及地点: 于2011年4至8月在甘肃省中药药理与毒理学省级重点实验室中西医结合基础室完成。

材料: 小鼠BMSCs株, 由解放军兰州军区总医院骨科研究所赵红斌博士馈赠, 购自美国ATCC公司(细胞株编号: CRL-10925)。

主要试剂与仪器:

试剂与仪器	来源
CdCl_2 、秋水仙素	上海泰坦化学有限公司
L-DMEM 培养基	美国 GIBCO 公司
胰蛋白酶、噻唑蓝、二甲基亚砷	美国 SIGMA 公司
胎牛血清	杭州四季青公司
甲醇、冰乙酸	天津红岩试剂厂
吉姆萨染液	上海锐谷生物科技有限公司
CO_2 培养箱	日本 SANYO 公司
离心机	金坛市恒丰仪器厂
倒置相差显微镜	日本 NIKON 公司
酶联免疫仪	美国 BIO-RAD 公司

实验方法:

细胞培养及 CdCl_2 的诱导: 将小鼠BMSCs株分别接种至含体积分数10%胎牛血清的DMEM/F12培养液中, 分装至培养瓶中, 置于37℃培养箱静置培养^[4]。每24 h换液1次, 待细胞铺到瓶底80%–90%时, 用含EDTA的0.25%胰蛋白酶消化细胞, 收集后吹散细胞,

分装到培养瓶中。继续培养、传代^[5]。用800, 400, 200, 100, 50 $\mu\text{g/L}$ 5个质量浓度 CdCl_2 加入DMEM-F12中培养细胞, 根据MTT结果筛选明显抑制细胞生长的最小作用浓度为最佳作用浓度^[6]。分为2组: 实验组: 培养液中加入含有 CdCl_2 400 $\mu\text{g/L}$ 的DMEM/F12的培养液; 对照组: 培养液中不添加 CdCl_2 。

微核实验检测细胞微核率: 将实验组和对照组BMSCs分别在 CO_2 培养箱中培养24 h, 胰酶消化细胞后, 收集细胞, 1 000 r/min离心5 min, 去上清, 加入37℃水浴的KCl溶液, 水浴锅中静置30 min, 去上清加入甲醇和冰乙酸的固定液, 固定细胞, 制片。吉姆萨染液中染色, 显微镜下观察, 每个标本观察1 000个细胞, 记录有微核的细胞数^[7-9]。

染色体分析检测染色体畸变率: 将实验组和对照组BMSCs在 CO_2 培养箱中培养, 分别加入秋水仙素, 培养3 h后, 消化细胞, 离心收集细胞, 加入37℃水浴的KCl低渗, 再加甲醇和冰乙酸固定液反复固定细胞, 同时准备冰水浸泡玻片, 吸管抽吸细胞悬液滴在冰玻片上, 干燥后, 放入吉姆萨染液中染色10 min, 显微镜下观察染色体形态、数目、大小^[10-13]。

主要观察指标: ①镜下形态学观察结果。②微核率检测结果。③染色体核型结果。

统计学分析: 由第一、二作者应用SPSS 16.0软件进行统计处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用完全随机设计的方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 CdCl_2 的最佳作用浓度 本实验选择50–800 $\mu\text{g/L}$ 作为 CdCl_2 浓度筛选的基本范围。实验中发现当 CdCl_2 质量浓度在200 $\mu\text{g/L}$ 时BMSCs在细胞形态、贴壁能力、代谢水平等方面变化甚微, 培养48 h后可以见到少量的BMSCs出现细胞萎缩, 贴壁能力减弱, 但碎裂的细胞数仍然不多。当 CdCl_2 质量浓度达400 $\mu\text{g/L}$ 及800 $\mu\text{g/L}$ 时, 可见细胞很快出现萎缩, 细胞贴壁能力下降, 可见底部细胞之间连接松散, 当 CdCl_2 作用时间达24 h时, 400 $\mu\text{g/L}$ 、800 $\mu\text{g/L}$ 组细胞大部分出现碎裂, 漂浮在培养液中。 CdCl_2 作用24 h时,

¹Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, Gansu Province, China;
²Room of Integrated Chinese and Western Medicine, Gansu Province Laboratory of Pharmacology and Toxicology of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Liu Yong-qi★,
Master, Professor,
Master's supervisor,
Gansu University of
Traditional Chinese
Medicine, Lanzhou
730000, Gansu
Province, China
liuyongqi73@
163.com

Supported by: the
National Natural
Science Foundation
of China, No.
81060351/H2810*;
Scientific Research
Foundation Program
of Education
Department of Gansu
Province, No.
0906-03*

Received: 2012-01-07
Accepted: 2012-02-20

BMSCs即出现细胞萎缩, 细胞黏附能力下降, 一些细胞逐渐发生碎裂而死亡, 细胞数量明显变少; 作用48 h后细胞萎缩, 轮廓改变程度更深, 呈现部分细胞悬浮, 黏附能力丧失, 发生碎裂而死亡细胞增多, 贴壁存活的细胞数量更少。因此, CdCl_2 对小鼠BMSCs有较强的干预作用, 其药物干预的最适宜作用浓度为400 $\mu\text{g/L}$, 药物干预后形态学观察的最适宜时间为24 h, 本文基于此展开实验。

2.2 各组细胞显微镜下形态学变化 显微镜下观察, 对照组细胞贴壁生长, 细胞多呈长梭形, 排列均匀, 折光性好, 细胞大小形态基本一致; CdCl_2 诱导组贴壁细胞数明显减少, 24 h见细胞生长缓慢且贴壁不牢固, 培养48 h见少数贴壁细胞开始悬浮, 培养72 h可见大部分细胞开始悬浮并死亡, 见图1-6。

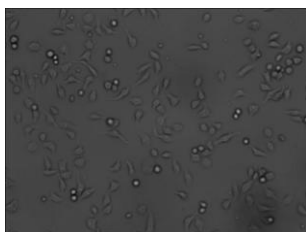


Figure 1 Morphology of bone marrow mesenchymal stem cells in the blank control group after culture for 24 h (×20)
图1 对照组骨髓间充质干细胞培养 24 h 形态(×20)

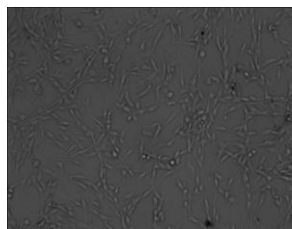


Figure 2 Morphology of bone marrow mesenchymal stem cells in the blank control group after culture for 48 h (×20)
图2 对照组骨髓间充质干细胞培养 48 h 形态(×20)

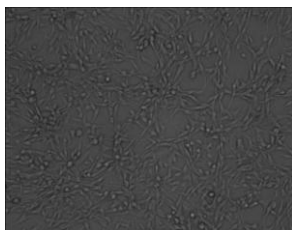


Figure 3 Morphology of bone marrow mesenchymal stem cells in the blank control group after culture for 72 h (×20)
图3 对照组骨髓间充质干细胞培养 72 h 形态(×20)

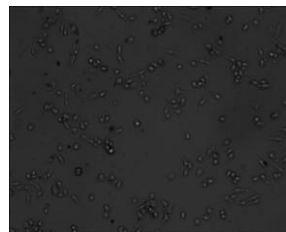


Figure 4 Morphology of bone marrow mesenchymal stem cells in the cadmium chloride-induced group after culture for 24 h (×20)
图4 实验组骨髓间充质干细胞培养 24 h 形态(×20)

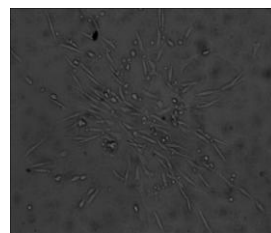


Figure 5 Morphology of bone marrow mesenchymal stem cells in the cadmium chloride-induced group after culture for 48 h (×20)
图5 实验组骨髓间充质干细胞培养 48 h 形态(×20)

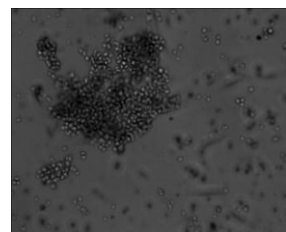


Figure 6 Morphology of bone marrow mesenchymal stem cells in the cadmium chloride-induced group after culture for 72 h (×20)
图6 实验组骨髓间充质干细胞培养 72 h 形态(×20)

2.3 微核率检测结果 与对照组相比, 实验组BMSCs出现1个或多个微核, 实验组微核发生率显著高于对照组($P < 0.05$), 见表1。

表1 两组骨髓间充质干细胞微核率比较
Table 1 Comparison of micronucleus rate of bone marrow mesenchymal stem cells between blank control group and cadmium chloride-induced group

Group	Cell number	Micronucleus cell number	Micronucleus rate ($\bar{x} \pm s, \%$)
Cadmium chloride-induced	3 000	275	7.93 ± 0.12^a
Blank control	3 000	14	0.44 ± 0.14

^a $P < 0.05$, vs. blank control group

2.4 染色体分析结果 与对照组相比, 实验组 BMSCs染色体畸变率明显升高($P < 0.05$), 染色体畸变主要表

现为断裂和部分易位为主, 见表 2。

表 2 两组骨髓间充质干细胞染色体畸变率比较
Table 2 Comparison of chromosome aberration rate of bone marrow mesenchymal stem cells between blank control group and cadmium chloride-induced group

Group	Cell number	Breakage number	Translocation number	Total aberration rate ($\bar{x} \pm s, \%$)
Cadmium chloride-induced	3 000	132	28	5.2 ± 0.3^a
Blank control	3 000	19	0	0.4 ± 0.1

^a $P < 0.05$, vs. blank control group

3 讨论

研究发现, BMSCs本身可参与肿瘤的发生和发展, 但国内外对干细胞移植后安全性和致瘤性的报道还比较少^[14-18]。镉是被国际公认的致癌物质之一, 镉是一种毒性很强的重金属, 已被美国毒性管理委员会(ATSDR)列为第6位危害人类健康的有毒物质^[19-21]。镉不仅可引起机体的急性和慢性中毒, 而且对哺乳动物具有较强的致畸、致癌、致突变作用。实验表明, 镉在细胞转化试验中对动物正常细胞的致畸变作用。Terracio等^[22]将发生转化的大鼠前列腺细胞接种于新生的大鼠体内, 结果发现接种后的大鼠有95%~100%都出现了肿瘤, 平均潜伏期为20 d左右。

在本实验中, CdCl₂作为具有遗传毒性的药物, 针对不同的动物及细胞, 其作用的有效浓度是又区别的, 文献中CdCl₂对哺乳动物细胞的作用浓度大不相同, 但基本都在100~1 000 μL/g的范围内, 鉴于这个基本药物作用浓度, 作者在本实验中选择50~800 μg/L作为CdCl₂浓度筛选的基本范围^[23]。实验中发现当CdCl₂质量浓度在200 μg/L时BMSCs在细胞形态、贴壁能力、代谢水平等方面变化甚微, 培养48 h后可以见到少量的BMSCs出现细胞萎缩, 贴壁能力减弱, 但碎裂的细胞数仍然不多。当CdCl₂质量浓度达400 μg/L及800 μg/L时, 可见细胞很快出现萎缩, 细胞贴壁能力下降, 可见底部细胞之间连接松散, 当CdCl₂作用时间达24 h时, 400 μg/L、800 μg/L组细胞大部分出现碎裂, 漂浮在培养液中。CdCl₂作用24 h时, BMSCs即出现细胞萎缩, 细胞黏附能力下降, 一些细胞逐渐发生碎裂而死亡, 细胞数量明显变少; 作用48 h后细胞萎缩, 轮廓改变程度更深, 呈现部分细胞悬浮, 黏附能力丧失, 发生碎裂而死亡细胞增多, 贴壁存活的细胞数量更少。因此, CdCl₂对小鼠BMSCs有较强的干预作用, 其药物干预的最适

宜作用浓度为400 μg/L, 药物干预后形态学观察的最适宜时间为24 h。

在CdCl₂对BMSCs的微核实验中, 与对照组相比, BMSCs细胞微核实验结果表现出细胞微核发生率的增加, 微核率达(7.93±0.12)%。通过CdCl₂的毒染的BMSCs出现微核的细胞数及频次增多, 在计数一定数量的细胞后, 可以看到含有微核的细胞数明显增多。同样, 在对CdCl₂毒染的BMSCs细胞染色体实验结果中, 与对照组相比, BMSCs染色体试验结果表现细胞染色体畸变发生率的增加, 总畸变率达(5.2±0.3)%。在计数一定数量的CdCl₂的毒染细胞BMSCs后, 可以明显发现BMSCs中出现断裂和易位的染色体数及频次增多, 可以看到染色体畸变细胞明显增多。

本实验证明, CdCl₂可引起BMSCs微核率和染色体畸变率增加, 说明镉可以引起遗传物质的损伤。其损伤机制可能为镉直接攻击核酸分子、抑制DNA损伤修复、干扰细胞分裂以及产生DNA甲基化等^[24-26]。实验已证实, 镉能引起DNA单链断裂。镉还能够干扰体内DNA甲基化代谢, 导致基因的不稳定性提高和基因表达的改变, 从而发挥其基因毒性^[27]。CdCl₂可引起小鼠BMSCs微核率和染色体畸变率增加的机制可能主要为镉直接干扰细胞正常有丝分裂、诱导原癌基因表达增强或改变细胞凋亡相关基因表达以及产生甲基化导致基因不稳定等机制有关。

目前, 研究遗传毒性的方法主要有GreenScreen试验和RadarScreen试验、酵母DNA缺失重组试验、彗星试验、体外微核试验、染色体畸变试验、流式细胞仪自动化检测系统等。微核实验是近年来发展起来的一种用于测试染色体损伤的方法, 是评价化学物或其他因素能否诱发染色体异常的方法之一。其最大的优点是经济、简单、快速。而染色体作为遗传物质的载体, 在每种生物细胞中都有固定的数目和结构, 染色体数目和结构改变就是染色体畸变。因此, 通过检测细胞的微核率和染色体畸变率可以比较直观地了解遗传损伤的程度, 可以直接用于评价毒物对细胞的遗传毒性。

综上所述, 本实验证实CdCl₂可以引起种子细胞BMSCs微核率及染色体畸变率的增加, 提示着工业重金属镉对BMSCs具有遗传毒性, 能够引起BMSCs遗传的不稳定, 增加了细胞成瘤的概率, 这为以后研究干细胞遗传稳定性在实验方法和理论方面提供了新的思路和方法, 为BMSCs更安全地应用于细胞移植奠定了实验基础。

致谢: 感谢解放军兰州军区总医院骨科研究所对本文的帮助。

4 参考文献

- [1] Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair-current views. *Stem Cells*. 2007;25: 2896-2902.
- [2] Le-Blanc K, Ringden O. Mesenchymal stem cells: properties and role in clinical bone marrow transplantation. *Curr Opin Immunol*. 2006;18:586-591.
- [3] Oh SH, Choi JE, Lim SC. Protection of betulin against cadmium-induced apoptosis in hepatoma cells. *Toxicology*. 2006;1(28):118-121.
- [4] David AP. Current science of regenerative medicine with stem cells. *J Invest Med*. 2006;54(1):33-37.
- [5] Strauer BE, Brehm M, Zeus T, et al. Regeneration of human infarcted heart muscle by intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in chronic coronary artery disease: the IACT study. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46(9): 1651-1658.
- [6] Jarup L, Alfvén T. Low level cadmium exposure, renal and bone effects-the OSCAR study. *Bio Metals*. 2004;32(5):286-289.
- [7] Okuwa K, Tanaka M, Fukano Y, et al. In vitro micronucleus assay for cigarette smoke using a whole smoke exposure system: a comparison of smoking regimens. *Exp Toxicol Pathol*. 2010;62(4):433-440.
- [8] Reus AA, Usta M, van Meeuwen RN, et al. Development and characterization of an in vivo skin photomicronucleus assay in rats. *Mutagenesis*. 2010;25(4):236-239.
- [9] Liu Q, Cao J, Liu Y, et al. Follow-up study by chromosome aberration analysis and micronucleus assays in victims accidentally exposed to ⁶⁰Co radiation. *Health Phys*. 2010; 98(6):1034-1038.
- [10] Homiski ML, Muehlbauer PA, Dobo KL, et al. Concordance analysis of an in vitro micronucleus screening assay and the regulatory chromosome aberration assay using pharmaceutical drug candidates. *Environ Mol Mutagen*. 2010; 51(1):39-47.
- [11] Serio G, Gentile M, Pennella A. Characterization of a complex chromosome aberration in two cases of peritoneal mesothelioma arising primarily in the hernial sac. *Pathol Int*. 2009;59(6):415-421.
- [12] Tanaka K, Kohda A, Toyokawa T, et al. Chromosome aberration frequencies and chromosome instability in mice after long-term exposure to low-dose-rate gamma-irradiation. *Mutat Res*. 2009;657:2304-2309.
- [13] Leme DM, Marin-Morales MA. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water--a case study. *Mutat Res*. 2008;650: 1403-1407.
- [14] Nagaya N, Kangawa K, Itoh T, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 2005;112(8): 1128-1135.
- [15] Laurent GJ, McNulty RJ, Hill M, et al. Escape from the matrix: multiple mechanisms for fibroblast activation in pulmonary fibrosis. *Proc Am Thorac Soc*. 2008;5(3): 311-315.
- [16] Chen J, Li Y, Wang L, et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke*. 2001;32(4): 1005-1011.
- [17] Kale S, Karihaloo A, Paul R, et al. Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule. *Clin Invest*. 2003;11(2):42-49.
- [18] Shao X, Goh JC, Huttmacher DW, et al. Repair of large articular osteochondral defects using hybrid scaffolds and bone marrow derived mesenchymal stem cells in a rabbit model. *Tissue Eng*. 2006;12(6):1539-1551.
- [19] Rodriguez-Celma J, Rellan Alvarez R, Abadia A, et al. Changes induced by two levels of cadmium toxicity in the 2-DE protein profile of tomato roots. *J Proteomics*. 2010; 73(9):1694-706.
- [20] Messaoudi I, Hammouda F, El Heni J, et al. Reversal of cadmium-induced oxidative stress in rat erythrocytes by selenium, zinc or their combination. *Exp Toxicol Pathol*. 2010;62(3):281-288.
- [21] Fernández-Pérez B, Caride A, Cabaleiro T, et al. Cadmium effects on 24h changes in glutamate, aspartate, glutamine, GABA and taurine content of rat striatum. *J Trace Elem Med Biol*. 2010;24(3):212-218.
- [22] Terracio L, Nachtigal M. Oncogenicity of rat prostate cells transformed in vitro with cadmium chloride. *Arch Toxicol*. 2008; 61(6):450-460.
- [23] Rennolds J, Butler S, Maloney K, et al. Cadmium regulates the expression of the CFTR chloride channel in human airway epithelial cells. *Toxicol Sci*. 2010;116(1):349-358.
- [24] Doi T, Puri P, Bannigan J, et al. Disruption of calreticulin-mediated cellular adhesion signaling in the cadmium-induced omphalocele in the chick model. *Pediatr Surg Int*. 2010;26(1):91-95.
- [25] Liu XM, Kim KE, Kim KC, et al. Cadmium activates Arabidopsis MPK3 and MPK6 via accumulation of reactive oxygen species. *Phytochemistry*. 2010;71(5-6):614-618.
- [26] Bork U, Lee WK, Kuchler A, et al. Cadmium-induced DNA damage triggers G(2)/M arrest via chk1/2 and cdc2 in p53-deficient kidney proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010;298(2):F255-265.
- [27] Joseph P. Mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009;238(3):272-279.

来自本文课题的更多信息--

基金声明: 国家自然科学基金项目 (81060351/H2810); 甘肃省教育厅科研基金项目 (0906-03)。

作者贡献: 实验设计与结果评价均为本文作者, 第一作者负责总体设计及指导, 第二作者及其他作者完成实验过程, 所有实验操作者均经过系统培训。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的资助。

伦理要求: 实验方案获得甘肃中医学院伦理委员会批准。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。