

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00762

前列腺癌组织中谷胱甘肽 S-转移酶 P1 基因启动子区域甲基化序列分析

杜稳斌¹, 侯建国^{1*}, 武 旗¹, 常文军², 翟羽佳², 林丽萍², 曹廷虎¹, 孙浚雯², 张宏伟^{2*}, 曹广文²

1. 第二军医大学长海医院泌尿外科, 上海 200433

2. 第二军医大学卫生勤务学系流行病学教研室, 上海 200433

[摘要] 目的: 研究前列腺癌(prostate carcinoma, PCa)组织中谷胱甘肽 S-转移酶 P1 (glutathione S-transferase P1, GSTP1)基因启动子区域 CpG 岛甲基化状态, 探索前列腺癌早期诊断的检测方法。方法: 采用巢式甲基化特异性聚合酶链反应(nest methylation-specific PCR, NMSP)和基因克隆测序的方法检测 31 例前列腺癌组织、18 例前列腺增生(benign prostatic hyperplasia, BPH)组织和 3 例正常前列腺(normal prostate, NP)组织中 GSTP1 基因启动子区域 CpG 岛的甲基化状态。结果: NMSP 结果显示在 PCa、BPH 以及 NP 组中甲基化阳性率分别为 83%、0% 和 0%; 测序结果中 PCa 与 BPH、NP 组 CG 位点甲基化发生率分别为 96%、34% 和 37% ($P < 0.01$), BPH 和 NP 组无统计学差异 ($P > 0.05$)。联合 NMSP 筛查前列腺癌明显优于单纯前列腺特异性抗原(prostate-specific antigen, PSA)检测。结论: 在前列腺癌组织中 GSTP1 基因启动子区域 CpG 岛呈现超甲基化的状态, 应用 NMSP 方法对 GSTP1 基因进行甲基化检测具有高灵敏度和高特异性的特点, 这有望成为新的前列腺癌早期筛选和诊断的检测方法。

[关键词] 前列腺癌; 谷胱甘肽转移酶; 启动区; 甲基化

[中图分类号] R 737.25

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2008)07-0762-06

Promoter region methylation analysis of glutathione S-transferase p1 gene in prostate carcinoma

DU Wen-bin¹, HOU Jian-guo^{1*}, WU Qi¹, CHANG Wen-jun², ZHAI Yu-jia², LIN Li-ping², CAO Ting-hu¹, SUN Jun-wen², ZHANG Hong-wei^{2*}, CAO Guang-wen²

1. Department of Urology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Epidemiology, Faculty of Medical Services, Second Military Medical University, Shanghai 200433

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the promoter region CpG island methylation status of glutathione S-transferase p1 (GSTP1) gene in prostate carcinoma (PCa) tissues and to search for new molecular markers for the early diagnosis of PCa. **Methods:** The promoter region CpG island methylation status of 31 PCa, 18 benign prostatic hyperplasia tissues (BPH) and 3 normal prostate tissues (NP) were examined by nest methylation-specific PCR (NMSP) technique, cloning and sequencing. **Results:** NMSP showed that the methylation rates of PCa, BPH and NP tissues were 83%, 0% and 0%, respectively. The CG sites methylation rates of PCa, BPH and NP tissues were 96%, 34% and 37%, respectively as determined by cloning and sequencing ($P < 0.01$), with no significant difference found between those of BPH and NP tissues ($P > 0.05$). A combination of NMSP and prostate-specific antigen (PSA) was better than PSA alone in screen of PCa. **Conclusion:** CpG islands of promoter region of GSTP1 gene is hypermethylated in PCa tissues. NMSP is sensitive and specific in detection of GSTP1 methylation, which may serve as a new method for early screen of prostate carcinoma.

[KEY WORDS] prostatic neoplasms; glutathione transferase; promoter regions; methylation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(7): 762-767]

前列腺癌(prostate carcinoma, PCa)是美国男性最常见的癌症和第二位的癌症死亡原因^[1]。近几年来,随着人口老龄化和人群生活习惯的改变,前列腺癌在我国的发病率也呈现明显的上升趋势。谷胱甘肽 S-转移酶(glutathione S-transferases, GSTs)能够通过谷胱甘肽结合大量的外源性化学物质、致癌

物质,从而催化细胞内的解毒作用发挥抑制肿瘤发生的作用^[2],其中谷胱甘肽 S-转移酶 P1 (GSTP1)是整个酶系家族分布最为广泛和肿瘤关系最为密切的一种。国外研究表明,在前列腺癌组织中 GSTP1 基因的 CpG 岛处于广泛的甲基化状态,启动子区 CpG 岛的甲基化直接导致 GSTP1 基因呈现低表达

[收稿日期] 2008-02-27

[接受日期] 2008-03-10

[基金项目] 国家自然科学基金(30671793), Supported by National Natural Science Foundation of China(30671793).

[作者简介] 杜稳斌, 硕士. E-mail: duwenbin208@163.com

* 通讯作者(Corresponding authors). Tel : 021-25070421, E-mail: smmuhongwei@yahoo.com.cn; Tel : 021-25072077, E-mail: smmuhoujianguo@yahoo.com.cn

或缺失表达状态,从而大大降低了甚至失去了其对前列腺细胞的保护作用,成为前列腺癌发生发展的一个重要因素^[3]。目前国内关于此方面的研究较少,结论也不尽相同。

本研究采用巢式甲基化特异性聚合酶链反应(nest methylation-specific PCR, NMSP)^[4]及基因克隆测序的方法分析前列腺癌组织、前列腺增生组织和正常前列腺组织中 GSTP1 基因启动子区 CpG 岛的甲基化状态,探索前列腺癌早期筛查和诊断的新的检测方法。

1 材料和方法

1.1 临床资料 选择2007年7月至2008年1月间在第二军医大学长海、长征医院泌尿外科手术的前列腺癌患者(PCa组)31例,年龄50~88岁,平均

年龄(68.87±6.84)岁;前列腺增生患者(BPH组)18例,年龄62~84岁,平均年龄(74.5±5.38)岁;捐献的正常前列腺组织3例(NP组)。所有标本均经病理切片证实。

1.2 亚硫酸氢钠转换基因组 DNA 材料 亚硫酸氢钠、氢醌购于 Sigma 公司, Wizard DNAClean-up system 购于天根公司。亚硫酸氢钠转换溶液配置方法参考文献^[4]。

1.3 甲基化特异性聚合酶链反应(MSP)材料 Taq Plus DNA 聚合酶、脱氧核糖核苷酸、甜菜碱购于天根公司。引物 GSTP1-1 应用 MethyPrimer Express Software V 1.0 软件进行设计, GSTP1-CX(测序引物)、GSTP1-M(甲基化引物)、GSTP1-UN(非甲基化引物)参考文献^[3],所有引物由上海生物工程公司合成(表1)。

表1 亚硫酸氢盐处理后 DNA PCR 引物
Tab 1 PCR primers for bisulphite-treated DNA

Primer	Primer type	Sequence(5'-3')	Product size(bp)	Anneal t/°C
GSTP1-1	Forword primer	TTT GTT GTT TGT TTA TTT TTT AGG TTT	66	428
	Downstream primer	TCC TAA ATC CCC TAA ACC CC	428	66
GSTP1-CX	Forword primer	GGG ATT TGG GAA AGA GGG AAA GGT TT	306	66
	Downstream primer	ACT AAA AAC TCT AAA CCC CAT CCC	306	66
GSTP1-M	Forword primer	TTC GGG GTG TAG CGC TCG TC	93	65
	Downstream primer	GCC CCA ATA CTA AAT CAC GAC G	93	65
GSTP1-UN	Forword primer	TGT TTG GGG TGT AGT GGT TGT T	97	65
	Downstream primer	CCA CCC CAA TAC TAA ATC ACA ACA	97	65

1.4 组织 DNA 提取方法 取黄豆大小的组织置入 Eppendorf 管中剪碎,加入 700 μ l DNA 提取液和 30 μ l 蛋白酶 K 50 $^{\circ}$ C 过夜。样品加入 700 μ l 饱和酚萃取 2 次。取上清液,加入 200 μ l 10 mol/L 醋酸铵和 2 ml 无水乙醇析出白色絮状 DNA。玻棒挑出后,加入 1.5 ml 75%乙醇 7 800 \times g 离心 2 min。弃上清,室温挥发乙醇至干燥,加入去离子水 100 μ l,待 DNA 溶解后,分光光度仪测量光密度值后直接进行亚硫酸盐转换或-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.5 亚硫酸盐转换 DNA 将 10 μ l DNA(约 2 μ g)置于 Eppendorf 管中,加 30 μ l 新鲜配制的 3 mol/L NaOH 和 220 μ l 双蒸水 55 $^{\circ}$ C 水浴 20 min,加入 900 μ l 亚硫酸氢盐转换液轻柔颠倒混匀,石蜡油封口,50 $^{\circ}$ C 避光水浴 16 h^[5]。转换后的 DNA 用 Wizard DNAClean-up system 试剂盒纯化回收。

1.6 MSP 方法 巢式 MSP 第一轮 PCR 反应体系:模板 DNA 1 μ l, 2.5 mmol/L dNTP 1 μ l, 2.5 U/ μ l Taq Plus DNA 聚合酶 1 μ l, 5 μ mol/L 引物 6

μ l, 10 \times Buffer 5 μ l, 去离子水 26 μ l 充分混合。反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min,进入 40 个循环(94 $^{\circ}$ C 1 min, 66 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min), 72 $^{\circ}$ C 10 min。第二轮 PCR 以第一轮 PCR 产物为模板,反应体系为:模板 DNA 1 μ l, 2.5 mmol/L dNTP 1 μ l, 2.5 U/ μ l Taq Plus DNA 聚合酶 1 μ l, 5 μ mol/L 引物 3 μ l, 10 \times Buffer 5 μ l, 5 mol/L 甜菜碱 10 μ l, 去离子水 19 μ l。反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min,进入 25 个循环(94 $^{\circ}$ C 1 min, 65 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min), 72 $^{\circ}$ C 10 min。2% 琼脂糖凝胶水平电泳 40 min,在紫外光下拍片。为避免污染造成假阳性,所有反应皆用去离子水作为对照。

GSTP1 基因全长 5 166 bp,包含 7 个外显子,其中在 1 330~1 817 bp 是 CG 分布最为密集同时也是启动子所在的区域。本研究以启动子为中心,根据序列 CG 分布情况,选择 CG 位点密集的 306 bp 为研究序列,其中包含 38 个 CG 位点,按照顺序分别编号为 S1~S38(图 1)。

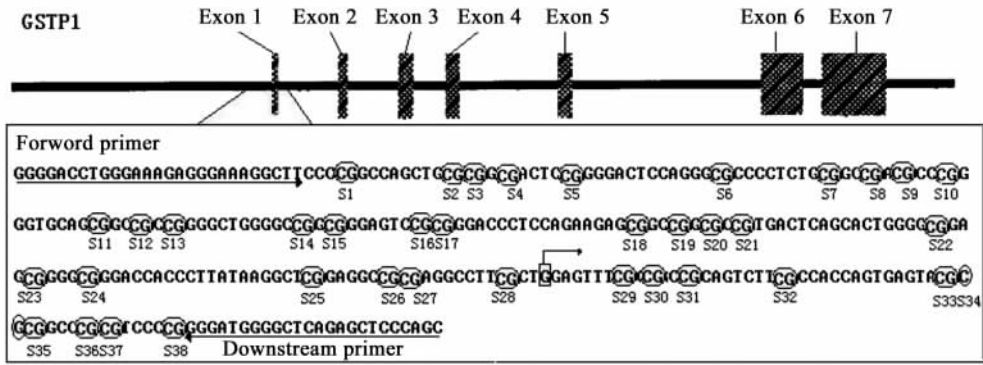


图1 GSTP1 基因启动子区域 CG 位点分布

Fig 1 CG sites position of GSTP1 gene promoter region

Map of the GSTP1 gene. Exon 1-7; The relative position and sizes of the 7 exons of the GSTP1 gene are shown. Pane indicate the region amplified from bisulphite-treated DNA. S1-38; The CG sites in ellipses are shown. Within the pane the primer sequences are on the lines. The transcription start site is shown by an arrow

1.7 目的基因克隆测序 将 GSTP1-CX 引物扩增的 PCR 产物,进行切胶纯化回收。分别从 PCa 组、BPH 组和 NP 组随机选取 3 个 DNA 样本进行同组混合。混合后 DNA 用于基因克隆测序,实验步骤为:PCR 管中加入 T-easy 1 μl, DNA 连接酶 1 μl, 10×buffer 1 μl, DNA 1 μl, 补充去离子水至 10 μl 体系,混匀后 4℃ 过夜。过夜后 10 μl 连接产物和大肠杆菌感受态细胞进行目的片段的转化和克隆。从克隆后菌落中各挑选 30 个白色孤立克隆,置入 LB 液体培养基中摇菌 6 h 后测序。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 12.0 统计软件进行统计分析。采用 χ^2 检验比较 3 组中 GSTP1 基因启动子区域 38 个 CG 位点的甲基化阳性率之间的差异。

2 结果

2.1 MSP 和 NMSP 法检测基因甲基化情况 MSP 方法直接对目的基因进行扩增,电泳显示无条带(图 2A)。应用 NMSP 方法在目的片段扩增引物的外围另外设计引物,并以此引物进行第一轮扩增,然后以第一轮 PCR 产物作为模板,进行第二轮目的片段的扩增,琼脂糖电泳结果显示清晰的目的条带(图 2B)。甲基化和非甲基化条带大小分别为 93 和 97 bp,用去离子水作为空白对照,证明样本无污染。PCa 组 31 例标本中甲基化条带 26 例(83%)。BPH 组和 NP 组均未扩增出甲基化特异性条带。

2.2 PCa 组、BPH 组和 NP 组 CG 位点甲基化发生率的比较 对 19 条 PCa 序列的 722 个 CG 位点,28 条 BPH 序列的 1 064 个 CG 位点以及 29 条 NP 序列的 1 102 个 CG 位点的甲基化发生率进行 χ^2 检

验。结果显示 PCa 组 CG 位点的甲基化发生率明显高于 BPH 组和 NP 组(96%、34%、37%, $P < 0.01$), BPH 组和 NP 组无统计学差异($P > 0.05$)。

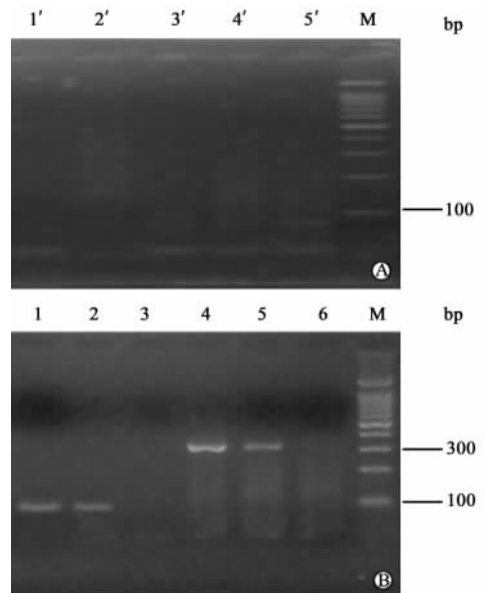


图2 MSP 和 NMSP 产物琼脂糖凝胶电泳

Fig 2 Agarose gel electrophoresis of MSP and NMSP products

A: The MSP products; B: The NMSP products; 1'-4': Prostate carcinoma samples; 5': Blank control; M: 1 kb ladder; 1: Unmethylated product(97 bp); 2: Methylated product(93 bp); 4, 5: Sequencing products(306 bp); 3, 6: Deionized water contrast product

2.3 目的基因序列 CG 位点甲基化的双向聚类分析 应用 Cluster 软件针对 PCa 组和 BPH 组的 CG 位点的甲基化测序结果进行双向聚类分析。结果显示在甲基化密集的灰色聚集区包括了 19 条前列腺癌序列和 10 条甲基化严重的前列腺增生序列。在

非甲基化的白色区域中,包括了 18 条前列腺增生序 列,无 1 条前列腺癌序列(图 3)。

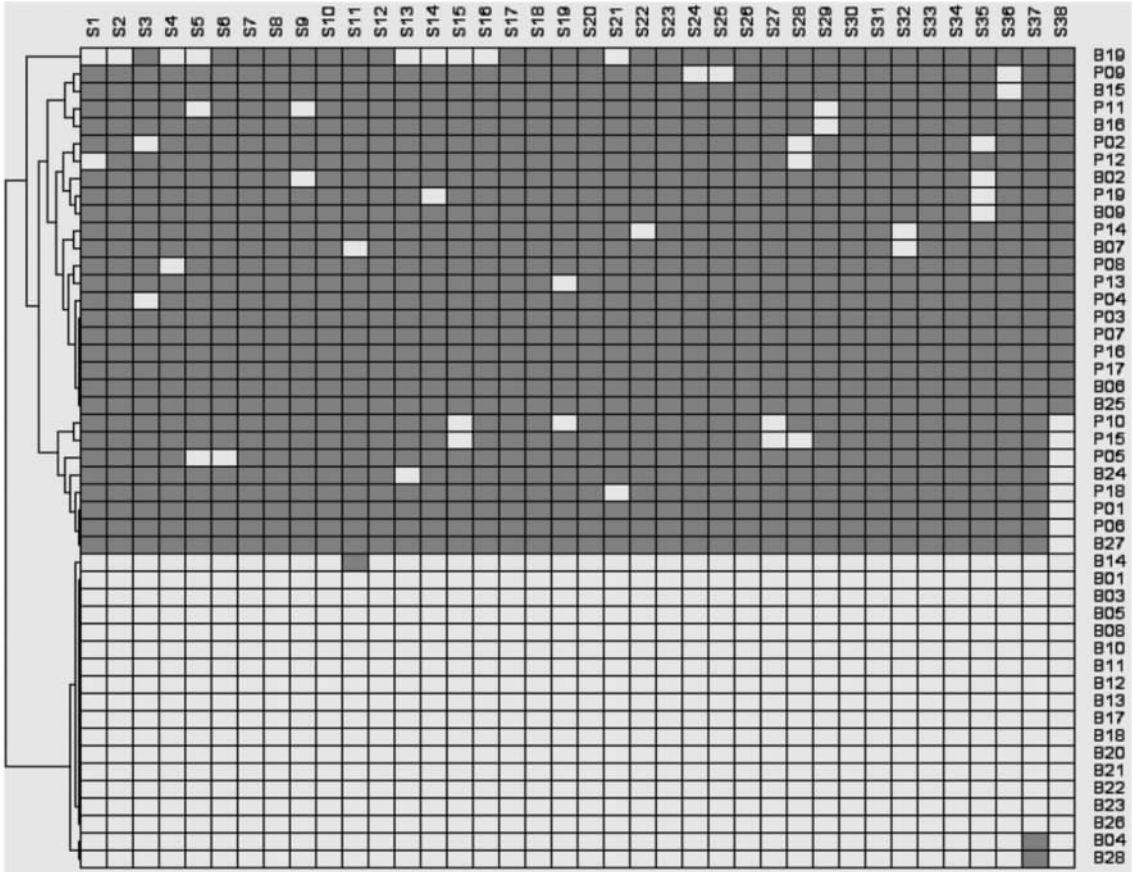


图 3 前列腺癌组和前列腺增生组 CG 位点甲基化双向聚类分析

Fig 3 Two-way cluster analysis of 38 CG sites methylation incidences in PCa and BPH groups

S1-S38;1-38 CG sites;Black block;Methylated CG sites; Blank block;Unmethylated CG sites;P;PCa;B;BPH

2.4 PCa 组、BPH 组和 NP 组 CpG 岛甲基化发生率的比较 PCa 组各个位点的甲基化发生率明显高于 BPH 和 NP 组,后两组之间没有明显的区别。在前列腺癌的 38 个位点中,S2、S7、S8、S10、S11、S12、S13、S16、S17、S18、S20、S23、S26、S30、

S31、S33、S34 甲基化率为 100%,且除 S38 甲基化率为 68%略低以外,其余位点的甲基化发生率都在 80%以上。BPH 和 NP 组各个位点的甲基化发生率和 PCa 组比较显著降低($P < 0.01$,图 4)。

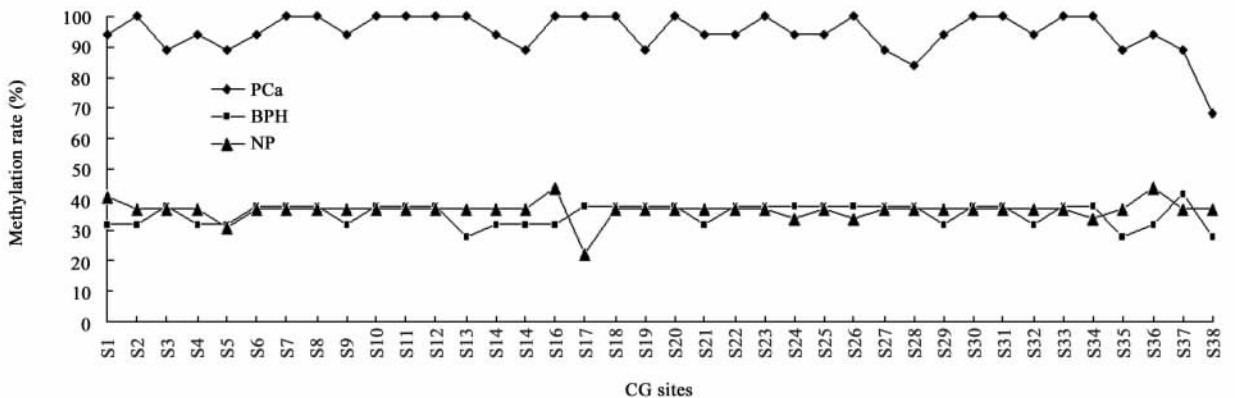


图 4 PCa 组、BPH 组和 NP 组 38 个 CG 位点甲基化发生率的比较

Fig 4 Comparison of 38 CG site methylation incidences among PCa,BPH and NP groups

2.5 NMSP 和 PSA 联合筛查前列腺癌 本研究收集 PCa 31 例,其中血清 PSA < 4 ng/ml 8 例, PSA > 4 ng/ml 23 例。BPH 18 例, PSA < 4 ng/ml 8 例, > 4 ng/ml 10 例。我们以病理诊断为金标准,

定义 PSA < 4 ng/ml 为阴性(-), PSA > 4 ng/ml 为阳性(+)。结果联合 NMSP 和 PSA 筛查前列腺癌明显优于单纯 PSA 检测,大大地降低了 PSA 的假阳性结果(表 2)。

表 2 NMSP 和 PSA 联合筛查前列腺癌
Tab 2 NMSP and PSA for prostate cancer screening

Screening test	Result	PCa	BPH	Sensitivity (%)	Specificity (%)	False negative rate (%)	False positive rate (%)																												
PSA	+	23	10	74.19	44.44	25.81	55.56																												
	-	8	8					NMSP	+	26	0	83.87	100	16.13	0	-	5	18	In-series test	+	19	0	61.29	100	38.71	0	-	13	18	Parallel test	+	30	10	96.77	44.44
NMSP	+	26	0	83.87	100	16.13	0																												
	-	5	18					In-series test	+	19	0	61.29	100	38.71	0	-	13	18	Parallel test	+	30	10	96.77	44.44	3.23	55.56	-	1	8						
In-series test	+	19	0	61.29	100	38.71	0																												
	-	13	18					Parallel test	+	30	10	96.77	44.44	3.23	55.56	-	1	8																	
Parallel test	+	30	10	96.77	44.44	3.23	55.56																												
	-	1	8																																

PSA:Prostate-specific antigen; PCa:Prostate carcinoma; BPH:Benign prostatic hyperplasia; NMSP:Nest methylation-specific PCR

3 讨论

目前,前列腺癌的诊治中一个突出问题就是疾病的早期筛查和早期诊断^[6]。仅仅依赖 PSA 和直肠指诊已经不能适应前列腺癌临床早期诊断的需要,因此寻求新的标志物就显得十分重要。1994 年 Lee 等首次报道 PCa 中 GSTP1 基因启动子区域甲基化,他们的发现对于研究 PCa 的早期诊断、肿瘤的侵袭、转移等具有重要的意义^[7]。越来越多的研究发现,GSTP1 基因启动子区域的甲基化和前列腺癌的发生有着密切的关系。文献^[3]曾对前列腺细胞中 GSTP1 基因的全长进行了甲基化分析,发现 GSTP1 基因不仅在启动子区域出现甲基化甚至在基因的全长都存在广泛的甲基化,认为启动子区域甲基化常常是导致 GSTP1 基因低表达或者缺失表达的直接原因。

国外研究表明,前列腺癌中 GSTP1 基因的甲基化发生率高达 95%^[8],在前列腺癌组织和细胞系中具有很高的特异性和敏感性。目前,国内的相关研究报道不多,而且结果和国外的研究也不尽相同。在国内的一项研究报道中描述 50 例前列腺癌组织中无一例出现甲基化特异性条带。我们的研究结果则表明,31 例前列腺癌组织中甲基化发生率为 83%,这和国内的相关研究报道^[9]不尽相同,笔者认为这种差异可能和实验的检测方法、样本数量及地域差别等因素相关,需要更大样本、更大范围的研究来进一步证实。对于 GSTP1 基因甲基化的检测,MSP 是通常采用的方法。在本实验中,直接应用

MSP 方法进行基因扩增无法检测基因的甲基化状态。分析原因倾向于组织 DNA 在进行亚硫酸盐转换等步骤中存在着大量的 DNA 丢失,导致 MSP 模板浓度过低,结果不理想,换用 NMSP 方法经过两轮 PCR 得到了清晰明亮的电泳条带。经过两种方法的比较,在进行 GSTP1 基因甲基化的检测时,NMSP 相对于常规 MSP 方法具有较大的优势,能够大大提高甲基化检测的效率。另外,PSA 作为目前前列腺癌早期筛查的唯一指标,其敏感度达到 94.7%,而特异性只有 18.4%^[10],甲基化和 PSA 联合筛查前列腺癌试验发现结合甲基化联合 PSA 水平,大大降低 PSA 诊断的假阳性率,提高前列腺癌的检出效率,具有重要的临床指导意义。

目前,以 GSTP1 基因甲基化作为一个生物标志物检测前列腺癌的研究越来越多。Goessl 等^[11]对前列腺按摩后尿液中的 GSTP1 基因的甲基化进行了检测,发现在 68%的早期前列腺癌患者和 78%的原位癌患者中检测到了阳性结果。国内报道,应用 MSP 法分析尿沉淀细胞 DNA 中肿瘤相关基因启动子的甲基化状态,可有效地检出膀胱癌,检出率达到 88%^[12]。目前,前列腺癌的早期筛选指标的生物学标志依靠血清中的 PSA 指标,该指标具有高灵敏度、低特异性的特点。急慢性前列腺炎、前列腺增生以及各种刺激都有可能引起 PSA 的升高,影响临床医生的判断,这就亟需一种新的高特异性生物学指标的出现来弥补 PSA 的不足。笔者认为,通过尿液检测 GSTP1 基因的甲基化状态来早期筛查前列腺癌有望成为一个理想的前列腺癌诊断指标。

[参考文献]

- [1] Jemal A, Ward E, Hao Y, Thun M. Trends in the leading causes of death in the United States, 1970-2002[J]. JAMA, 2005, 294:1255-1259.
- [2] Lecomte T, Landi B, Beaune P, Laurent-Puig P, Llorca M A. Glutathione S-transferase P1 polymorphism (Ile105Val) predicts cumulative neuropathy in patients receiving oxaliplatin-based chemotherapy[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12:3050-3056.
- [3] Millar D S, Kow K K, Paul C L, Russell P J, Molloy P L, Clark S J. Detailed methylation analysis of the glutathione S-transferase π (GSTP1) gene in prostate cancer[J]. Oncogene, 1999, 18:1313-1324.
- [4] Schamhart D, Swinnen J, Kurth K H, Westerhof A, Kusters R, Borchers H, et al. Numeric definition of the clinical performance of the nested reverse transcription-PCR for detection of hematogenous epithelial cells and correction for specific mRNA of non-target cell origin as evaluated for prostate cancer cells[J]. Clin Chem, 2003, 49:1458-1466.
- [5] Grunau C, Clark S J, Rosenthal A. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters[J]. Nucleic Acids Res, 2001, 29:E655.
- [6] Perry A S, Foley R, Woodson K, Lawler M. The emerging roles of DNA methylation in the clinical management of prostate cancer[J]. Endocr Relat Cancer, 13:357-377.
- [7] Lee W H, Morton R A, Epstein J I, Brooks J D, Campbell P A, Bova G S, et al. Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91:11733-11737.
- [8] Lin X, Tascilar M, Lee W H, Vles W J, Lee B H, Veeraswamy R, et al. GSTP1 CpG island hypermethylation is responsible for the absence of GSTP1 expression in human prostate cancer cells[J]. Am J Pathol, 2001, 159:1815-1826.
- [9] 张彦, 赵坡, 钟梅, 吕亚莉, 吕洋, 杨蕾. GSTP1基因在前列腺癌组织中的表达及甲基化状态研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2007, 14:280-283.
- [10] Rouprêt M, Hupertan V, Yates D R, Catto J W, Rehman I, Meuth M, et al. Molecular detection of localized prostate cancer using quantitative methylation-specific PCR on urinary cells obtained following prostate massage[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13:1720-1725.
- [11] Goessl C, Muller M, Heicappell R, Krause H, Miller K. DNA-based detection of prostate cancer in blood, urine, and ejaculates[J]. Ann N Y Acad Sci, 2001, 945:51-58.
- [12] 孟军, 余坚, 朱同玉, 张红宇, 徐慧莉, 王伟, 等. 用尿沉淀细胞DNA甲基化状态的分析检测膀胱癌[J]. 肿瘤, 2007, 27, 5:374-377.

[本文编辑] 尹茶

• 读者 作者 编者 •

《第二军医大学学报》对一稿两投问题处理的声明

为维护学术研究的纯洁性和严肃性,同时也为了维护《第二军医大学学报》的声誉和广大读者的利益,现将本刊对一稿两投(包括一稿多投)问题的处理原则声明如下:

(1)本声明中的“一稿两投”主要指所涉及到的两篇论文尽管在文字的表达或讨论的阐述上可能存在某些不同之处,但其涉及的理论、主要实验数据和图表是相同的,或文中核心内容相同。所指文稿不包括重要会议的纪要、疾病诊断标准和防治指南、有关组织达成的共识性文件、新闻报道类文稿以及在一种刊物上发表过摘要(简报)或初步报道而将进一步研究的全文投向另一种期刊的文稿。上述各类文稿如作者要重复投稿,应向有关期刊编辑部作出说明。

(2)凡来稿在接到编辑部回执后满3个月未接到退稿通知,则表明该稿件仍在处理过程中,作者如欲转投他刊,应事先与本刊编辑部联系并提出理由。

(3)编辑部认为文稿有一稿两投嫌疑时,将认真收集有关资料并仔细核对后再通知作者,在作出处理决定前请作者就相关问题作出解释。编辑部与作者双方意见发生分歧时应由上级主管部门或有关权威机构进行最后仲裁。

(4)一稿两投一经证实,将择期在本刊刊出其作者单位和姓名以及撤消该论文的通告;2年内,《第二军医大学学报》将拒绝发表该文第一作者所撰写的一切文稿;并将就此事件向作者所在单位和该领域内的其他科技期刊进行通报。

《第二军医大学学报》编辑部