

The Effects of C-Terminal Fragments of Amyloid Precursor Protein on Cytoskeletal State in Rat Primary Cortical Neurons

Ganfeng Xu¹, Fang Liu², Hui Chen², Yanji Xu^{2*}

¹Department of Endocrine, Yanbian Second People's Hospital, Yanji Jilin

²Department of Preventive Medicine, Medical College, Yanbian University, Yanji Jilin

Email: xgfsky5@126.com, 77156211@qq.com, *xuyanji@ybu.edu.cn

Received: Jul. 14th, 2016; accepted: Jul. 31st, 2016; published: Aug. 3rd, 2016

Copyright © 2016 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Objective: To study the effects of C-Terminal Fragments of amyloid precursor protein on cytoskeletal state in rat primary cortical neurons. **Methods:** Transfection of APP/APLP2-CTFs-pEGFP to rat primary cortical neurons investigates the morphology of actin, ph-cofilin, tubulin and MAP2 using immunocytochemistry test method *in vitro*. We take Western Blotting method for determining the Ph-cofilin transfected with APP-C/APLP2 C-Terminal fragment. **Results:** In the APP/APLP2- CTFs transfected group, the extracellular direction F-actin polymerization was increased; the extended synapses of Cells around were shranked. And the structure of tubulin was disordered compared with control group. And the axons of the expression of MAP2 protein significantly reduced, and the APP-C99 group's MAP2 protein expression level was lower. Immunocytochemistry and Western Blotting test showed that Ph-cofilin expression was increased in the APP/APLP2- CTFs transfection group compared with control group. **Conclusion:** Transfection of APP/LP-CTFs can induce the change of cytoskeletal protein and state.

Keywords

APP-C-Terminals Fragment, Actin, Tubulin, MAP2

*通讯作者。

淀粉样前体蛋白C端片段对细胞骨架状态的影响

许敢峰¹, 刘 芳², 陈 慧², 许妍姬^{2*}

¹延边第二人民医院内分泌科, 吉林 延吉

²延边大学医学院, 预防医学教研室, 吉林 延吉

Email: xgfsky5@126.com, 77156211@qq.com, xuyanji@ybu.edu.cn

收稿日期: 2016年7月14日; 录用日期: 2016年7月31日; 发布日期: 2016年8月3日

摘要

【目的】探讨大鼠胚胎神经元内转染淀粉样前体蛋白C端片段对细胞骨架状态的影响。【方法】大鼠胚胎大脑皮层获得原代神经元进行培养, 利用APP-C端片段、APLP2-C端片段基因重组质粒转染到神经元当中, 用免疫染色的实验方法, 观察肌动蛋白(actin)、微管蛋白(tubulin)、微管相关蛋白(MAP2), 磷酸化丝切蛋白(Ph-cofilin)的形态, 并用Western Blotting方法测定了Ph-cofilin水平, 每组实验重复测量十次。【结果】APP/APLP2-CTFs转染组与对照组相比有明显的向细胞外伸展的F-actin的重新聚合, 细胞四周伸出的突触有所收缩; tubulin的结构发生紊乱; 轴突当中的MAP2蛋白表达显著减弱, 而且APP-C99组的MAP2蛋白的表达水平最低。蛋白印迹和免疫组化结果均显示APP/APLP2-CTFs转染组与对照组相比Ph-cofilin水平有所增高($P < 0.05$)。【结论】转染淀粉样前体蛋白C端片段可以诱导细胞骨架蛋白和状态的改变。

关键词

APP-C端片段, 肌动蛋白, 微管蛋白, 微管相关蛋白

1. 引言

作为一个患病人数逐年递增的神经退行性疾病, 阿尔茨海默病(AD), 其患病机理被认为是受到错综复杂的多基因控制引发。在被提出的许多假说当中, 老年斑(Senile Plaque)和神经元纤维缠结(Neuron Filamentary Tangle)已经被广泛接受和研究[1]。淀粉样前体蛋白(APP)是产生老年斑的组成元素淀粉样 β -蛋白($A\beta$)的上游前体蛋白。

APP 依次经 α -、 β -、 γ -、 δ -分泌酶和 caspase 酶水解后形成不同长度 C 端片段 APP-CTFs, APLP2-CTFs 是 APP 的同源蛋白 APLP2 水解后的产物, APP-CTFs 和 APLP2-CTFs 亦贡献于 AD 的病理机制, 其毒性机制是被各种酶切之后形成的 AICD 与 Fe65 结合进行核转移, 后与 CP2/LSF/LBP1 转录因子结合刺激 GSK-3 β 基因, 增强 Tau 磷酸化[2] [3]。

APP 被 β -、 γ -分泌酶剪切之后产生 $A\beta$, $A\beta$ 的神经毒性可以引起形态学上异常神经炎和崩溃的神经元萎缩从而导致细胞骨架各方面的营养缺陷[4]。神经元纤维缠结中的过度磷酸化的 tau 蛋白不仅抑制促微管组装的活性, 而且还对参与微管装配的正常 tau 蛋白、微管相关蛋白 MAP1 和 MAP2 进行阻隔, 对微管组装造成进一步破坏, 导致神经元功能紊乱, 这很可能是调节神经元凋亡过程的始动因素[5]。

神经元的细胞骨架主要由细胞内的三种蛋白纤维丝的网状结构构成，主要是微管、微丝、中间纤维，微管蛋白 tubulin 则是微管的主要成分，肌动蛋白 actin 则是微丝的主要成分[6]。Cofilin 属于肌动蛋白解聚因子家系，其作用可以与骨架肌动蛋白直接接触，对肌动蛋白解聚并重构，并可增强神经元的迁移能力。微管相关蛋白 MAPs 是一种主要分为两型(I型和II型)的高分子蛋白，可以起到维持细胞的微管稳定和装配的作用[7]。这其中 tau 蛋白已经被大多数人研究，MAP2 现阶段成了关注的焦点。本实验大鼠胚胎神经元培养细胞中表达蛋白样前体蛋白 C 端，观察了 APP-C/APLP2-C 端对神经元细胞结构骨架营养状态的影响。

2. 材料与方法

2.1. 试剂与药品

APP-C 端片段由韩国首尔医科大学药理学教室徐维宪教授馈赠；QIAGEN Plasmid Maxi Kit 购于 QIAGEN；Ph-cofilin, MAP2 和 tubulin 免疫染色抗体、NDiff Neuro-2 (N2) 培养基补充剂购于德国默克密理博公司；罗丹明鬼笔环肽染色购自 sigma 公司；Lipofectamine 2000 从 Invitrogen 公司购买；多聚赖氨酸，免疫组化固定液，免疫组化封闭液，免疫组化洗涤液，免疫荧光染色试剂盒-抗兔 Alexa Flour 555、抗鼠 Alexa Flour 555，抗荧光淬灭封片液均从碧云天生物科技公司购买；10% DF 培养液由本实验室自配；DMEM 培养液(Grand Island, NY, 14072, USA)；胎牛血清、马血清(Corning, NY, 14831, USA)；SPF 级 SD 大鼠由延边大学动物科学实验中心饲养提供。

2.2. 实验仪器

BIO-RAD 蛋白印迹电泳装置(碧云天生物科技公司)、恒温水浴锅(金坛市杰瑞尔电器有限公司)、分析天平(上海精科天平仪器)、CO₂ 培养箱(美墨尔特贸易有限公司 MEMMERT)、低速容量离心机(艾测科技)、生物显微镜(上海精密仪器仪表公司)、制冰机(上海雪豹制冷设备有限公司)、立式压力蒸汽灭菌器(上海博迅)、移液器(上海巴玖实业有限公司)等。

2.3. 质粒扩增提取 DNA

分别将含有重组质粒 pEGFP-N1-APP-CTFs (C99, C57)、pEGFP-N1-APLP2-CT57 和空载体 pEGFP-N1 的 DH5 α 感受态甘油菌均匀涂抹在固体培养基(含有 1/1000 的庆大霉素)过夜培养。24 h 后，用接种环挑菌与液体培养基中(含有 1/1000 的庆大霉素)，在 37℃ 气浴恒温培养箱中以 230 r/min 的转速扩增培养[8]。然后按照质粒大量抽提试剂盒说明书步骤，把扩增后的菌体内的目标 DNA 抽提出来用 pH 8.5 的 Tris•Cl 溶解，用紫外分光光度计测定浓度及纯度。

2.4. 胚胎神经元培养

选择怀孕 16~18 天的大鼠将其用乙醚麻醉，解剖腹部取出胚胎放入预冷的 D-hank's 液中。转移至超净台，剪开胚胎，取出仔鼠，用剪刀轻轻剪开颅骨，剥离掉最上层的脑膜后，直接取大脑皮层组织；将组织剪成约 1 mm × 1 mm 块状并放置于新的 D-hank's 液中离心；去上清液后的组织再加入 0.25% 的胰酶消化分解，于 37℃ 水浴 20 min。最后把消化过的组织放于 200 目筛网将其进一步碾碎过筛得到神经元细胞。

预先用双蒸水配置含量为 0.1% 的多聚赖氨酸溶液，将该溶液包埋在盖玻片上风干以促使神经元细胞贴壁生长[6]。刚获得的神经元细胞用含 5% 的马血清，10% 胎牛血清的 DMEM 培养液，在环境为 5% 浓度的 CO₂，37℃ 恒温培养箱中培养；第二天换成含有 1% 的 N2 的 DMEM 培养液培养，第四天再更换含

有 5%的马血清, 10%胎牛血清的 DMEM 培养液; 在 5~7 天进行细胞处理。

2.5. 质粒的转染及表达

按照 Lipofectamine 2000 说明书步骤将各 APP-CTFs 和 APLP2-CTFs 片段分别转染到六孔板各孔当中。实验分为四组:① 对照 Vector 空载体;② 转染 APP-CT99;③ 转染 APP-CT57;④ 转染 APLP2-CT57;转染质粒 24 h 后在荧光显微镜下观察细胞形态, 并可通过绿色荧光发光强度检验是否成功转染。

2.6. 免疫组化

Ph-cofilin、MAP2 和 tubulin 染色: 抽离孵育的六孔板中培养液(六孔板中预先用多聚赖氨酸包埋, 促使细胞贴壁), 加 1 mL 固定液固定 10 min 后用洗涤液清洗 3 次, 每次 5 min。用封闭液封闭 60 min, 在摇床上轻轻摇动。去封闭液后同样将各孔清洗 3 次, 之后用稀释的一抗 Ph-cofilin、MAP2 和 tubulin (1:200) 室温孵育 60 min, 摆床上轻轻摇动。用洗涤液洗 3 次, 每次 5 min。真空泵吸尽洗涤液后, 加入 1 mL 稀释好的荧光二抗 Alexa Flour 555 (1:300) 室温避光条件下, 在摇床上轻轻摇动孵育 60 min。孵育后用洗涤液洗 3 次, 每次 5 min, 期间避光操作。把盖玻片取出, 倒置盖在滴有淬灭剂封片液的载玻片上, 操作谨慎尽量避免气泡。荧光显微镜下观察效果。

罗丹明鬼笔环肽染色: 将罗丹明用 PBS 配制成 100 nM 的液体, 常温下可避光保存。真空泵抽去六孔板各孔中细胞上清, 用 37°C 的 PBS 轻轻的清洗。加混合固定剂(4%甲醛)室温放置 10 min, 之后用室温的 PBS 液体清洗 30 s。弃各孔内 PBS 后加入 200 mL Triton x-100 室温放置 5 min, 再用常温的 PBS 液体清洗 30 s, 在盖玻片上加 200 μ L 罗丹明配置液, 用封口膜将封住避免蒸发, 暗处孵育 30 min。孵育后同样用 PBS 清洗三次。取出盖玻片, 轻轻倒置于载玻片上避免产生气泡, 最后用淬灭剂封片。采用 Olympus 荧光正置显微镜下察染色效果。

2.7. Western 蛋白印迹

Western 印迹方法检测 Ph-cofilin 蛋白水平: 用预冷的 PBS 清洗细胞后用 RIPA 裂解液, 在冰上用细胞刮裂解细胞, 将裂解液吸入离心管在 4°C, 8000 g rpm 离心 5 分钟得到细胞沉淀液。定量蛋白之后, 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳跑胶, 2 h 后将胶上蛋白电转移至 PVDF 膜上。此后, 用碧云天 Western Blotting 封闭液封闭 1 h, 用活化的 Ph-cofilin 单克隆抗体(1:1000)4°C 孵育过夜, 洗涤液漂洗三次后加二抗辣根氧化酶(HRP)-IgG (1:1000), 室温孵育 1 h, 洗膜三次后化学发光法显色。用紫外分光光度计扫描条带灰度值, β -actin 作为内参照, 计算相对的蛋白质表达水平变化。

2.8. 统计学分析

采用 SPSS 11.0 统计软件进行统计处理, 计量资料数据以表示, 采用多个样本均数比较的单因素方差分析。

3. 结果

3.1. APP-C 端片段对肌动蛋白结构的影响

如图 1, 分别转染了 APP-CT99、APP-CT57 和 APLP2-CT57 三组与对照组相比, 细胞的四周延伸了许多发芽的触角, actin 结构不够光滑, 说明了增加了向细胞外方向的 F-actin 的聚合。为了探讨机制, 我们研究了 Ph-cofilin 水平, 蛋白印迹和免疫组化结果均显示 APP/APLP2-CTFs 转染组与对照组相比 Ph-cofilin 水平有所增高($P < 0.05$) (图 2, 图 3)。

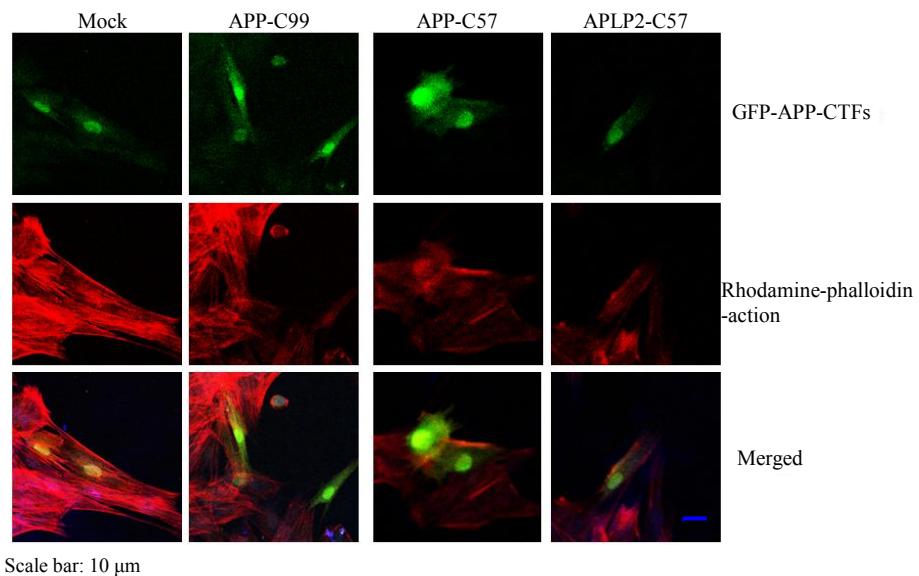


Figure 1. The effect of APP-C/APLP2-C on actin

图 1. APP-C/APLP2-C 端对 actin 的影响

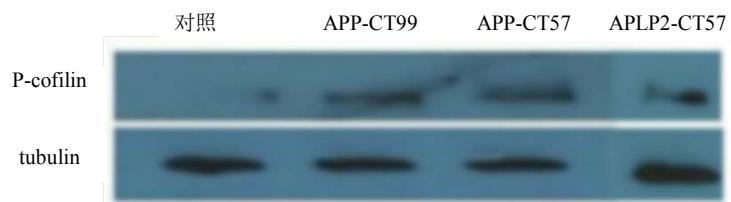


Figure 2. The effect of APP-C/APLP2-C on cofilin

图 2. APP-C/APLP2-C 端对磷酸化 cofilin 的影响

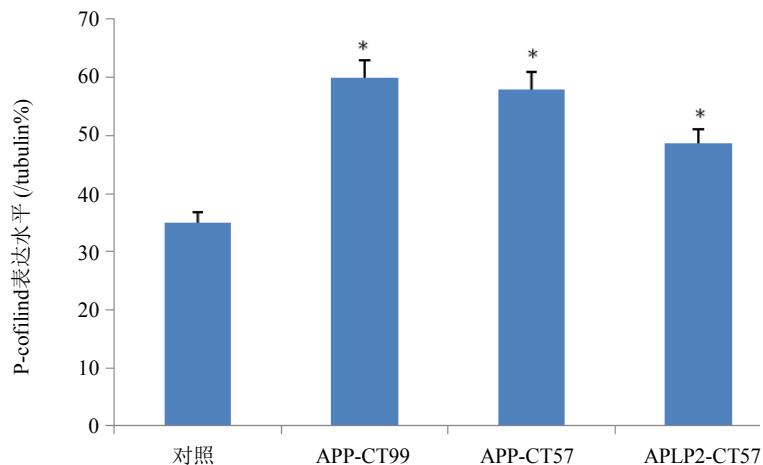


Figure 3. The effect of transfected APP-CTFs on Ph-cofilin Protein level

图 3. APP-CTFs 转染后 Ph-cofilin 蛋白表达的影响 ($^*P < 0.05$)

3.2. APP-C 端片段对微管蛋白的影响

转染 APP-CT99、转染 APP-CT57 和 APLP2-CT57 三组与转染空质粒的对照组相比，细胞内的 tubulin 都有不同程度的结构紊乱，表达程度加深（图 4）。

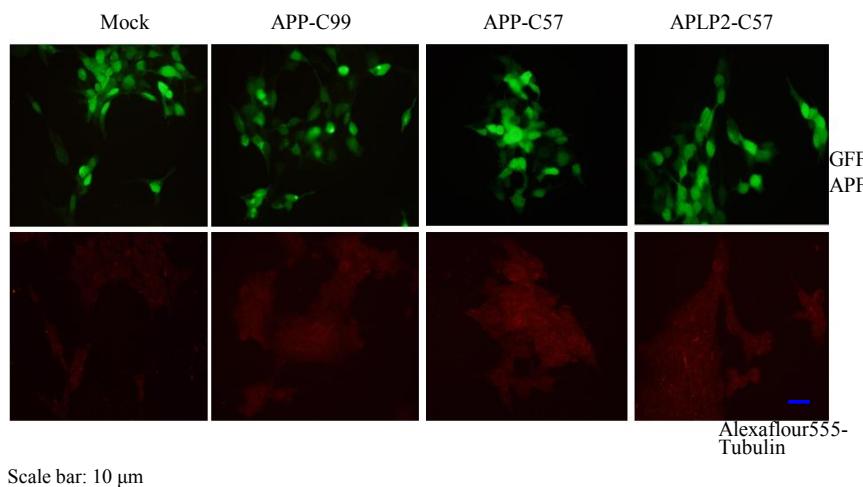


Figure 4. The effect of APP-C/APLP2-C on tubulin

图 4. APP-C/APLP2-C 端对 tubulin 的影响

3.3. APP-C 端片段对微管相关蛋白的影响

转染 APP-CT99、转染 APP-CT57 和 APLP2-CT57 三组与转染空质粒的对照组相比, 轴突当中的 MAP2 蛋白的表达显著减弱, 细胞与细胞之间的联络缩短。尤其 APP-C99 和 APP-C57 组 MAP2 蛋白的表达水平较低 (图 5)。

4. 结论

转染淀粉样前体蛋白 C 端片段可以诱导细胞骨架蛋白和状态的改变。

5. 讨论

阿尔茨海默病(AD)患者大脑的神经元会不同程度地出现神经突的营养不良, 如轴突或者树突的扭曲, 进而神经元丢失, 直接导致病人的认知功能损伤。因此解密形成轴突营养不良的机制为改善或治疗 AD 病可以提供一条新的思路。

$\text{A}\beta$ 的神经毒性可以引起形态学上异常神经炎和崩溃的神经元萎缩, 从而导致细胞骨架各方面的营养缺陷[2]。 $\text{A}\beta$ 诱导的退行性变化, 通过 LIM-激酶对 ADF/cofilin-脱磷酸化来实行[2]。

在本实验中转染 APP-CTFs 后, 在神经元的四周 F-actin 重排参差不齐类似伸展发芽, 神经元细胞内磷酸化 cofilin 聚集。蛋白印迹实验结果也显示 Ph-cofilin 的蛋白水平比对照组明显增高($P < 0.05$), 这与上述 $\text{A}\beta$ 诱导的退行性变化的结论一致。此次试验我们选用了三个 CDNA, APP-CT99, APP-CT57, APLP2-CT57, APP 与 APLP2 结构相似都遵循由一大部分细胞外区域和一小部分细胞质区域, 且 APP-CTFs 和 APLP2-CTFs 贡献 AD 病的发病机理相似, 在细胞核内被 γ 内切酶所切的胞内 C 末端结构域 (Intracellular C-terminal Domains, ICDs), 刺激了 Fe65 转录的激活, 导致 ICDs 与 CP2 结合引起 GSK-3 β 的表达, 从而导致 tau 蛋白的磷酸化[2][3]。

Actin 是细胞骨架蛋白其中一种, 有人提出假设 cofilin 是在细胞核内参与了完成 actin 蛋白的聚合作用。cofilin 分子大小在 18 kDa 左右, 它通过 LIM 激酶调控其 Ser3 位点的磷酸化与去磷酸化来解聚和重构 actin, 此外 TES 激酶也可以对其专一性磷酸化从而影响细胞结构[5]。尽管大部分的 cofilin 在应激条件下定位在细胞核内, 但是它可以被动地扩散到细胞核内外[9]。此次试验中转染 APP/LP-CTFs 引起 actin 的解聚和重构, 可能的机制是诱导了 cofilin 的磷酸化。

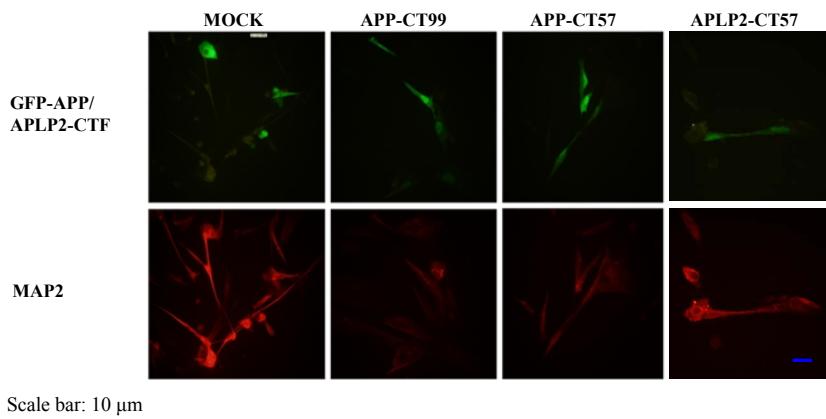


Figure 5. The effect of APP-C/APLP2-C on MAP2

图 5. APP-C/APLP2-C 端对 MAP2 的影响

Tubulin 为球形蛋白, 其分别与由 450 个氨基酸和 455 个氨基酸分子构成的 α 和 β 亚基结合形成分子量各约为 55 kDa 的 α -和 β -tubulin。 α -和 β -tubulin 结合形成的异二聚体稳定结构基本单元构成了微管[10]。神经元中中空的微管结构是运输大分子物质的重要通道, 在神经元细胞的轴突结构中, 微管具有保证双向快速轴浆运输、维持神经元电生理功能等特殊作用。AD 神经元内微管结构破坏可能与调控微管聚合与解聚多种因素有关, 包括 tau 蛋白, MAP1, MAP2 以及 Ca^{2+} 变化有关[11]。本研究中转染 APP/LP-CTFs 导致 tubulin 结构紊乱, 可能与 MAP2 等蛋白表达发生变化有关。

MAPs 是神经元内的高分子蛋白(MAP1b, MAP2), 还是神经元胞体和树突受伤的早期标志物, MAP2 的功能由蛋白激酶和蛋白磷酸酶对其磷酸化的高度动态平衡来调节[12]。哺乳动物大脑的海马区域神经元中贯穿颗粒细胞层有高含量的 MAP2, 大脑中调节 MAP2 的蛋白磷酸酶有蛋白磷酸酶 2A 和蛋白磷酸酶 2B 两种, 还有证据表明在 AD 病中 MAP2 的减少和 tau 蛋白的高度磷酸化有着必不可少的联系[13]。在我们的结果中, 荧光显色的区域集中在树突当中, 表现为 MAP2 的表达减少, 神经元突起或断裂不完整, 粗细不一, 这可能是转染 APP-C 端基因片段后神经元受损, MAP2 磷酸化障碍, 导致微管的聚合能力下降, 微管的不稳定又引发了细胞骨架完整性缺失, 树突发育受到抑制和可塑性崩溃[14]。神经元 MAP-2 的丢失涉及到神经元结构破坏, 造成生神经元形态和功能改变, 甚至导致神经功能障碍的神经元凋亡[15]。因此, APP-C 端片段对神经元的树突的伸展有一定的影响, 然而更详细的机制有待于进一步研究。

淀粉样前体蛋白作为阿尔茨海默病发病的一个标志物, APP-C 端片段在 AD 的发病机制亦起重要的作用, 本研究在细胞骨架方面进行了初步的研究, 其更多的机制有待于进一步研究。

基金项目

国家自然科学基金(81160159)。

参考文献 (References)

- [1] 贾艳滨, 何红波, 肖计划, 等. 阿尔茨海默病与血管性痴呆患者血浆微管蛋白和 APP 的变化[J]. 暨南大学学报(医学版), 2008, 29(2): 180-183.
- [2] Kim, H.S., Kim, E.M., Lee, J.P., Park, C.H., Kim, S.H., Seo, J.H., Chang, K.A., Yu, E.A., Jeong, S.J., Chong, Y.H. and Suh, Y.H. (2003) C-Terminal Fragments of Amyloid Precursor Protein Exert Neurotoxicity by Inducing Glycogen Synthase Kinase-3Beta Expression. *The FASEB Journal*, **17**, 1951-1953.
- [3] Xu, Y., Kim, H.S., Joo, Y., Choi, Y., Chang, K.A., Park, C.H., Shin, K.Y., Kim, S., Cheon, Y.H., Baik, T.K., Kim, J.H. and Suh, Y.H. (2007) Intracellular Domains of Amyloid Precursor-Like Protein2 Interact with CP2 Transcription Factor in the Nucleus and Induce Glycogen Synthase Kinase-3 β Expression. *Cell Death and Differentiation*, **14**, 79-91.

<http://dx.doi.org/10.1038/sj.cdd.4401928>

- [4] Munsie, L.N., Desmond, C.R. and Truant, R. (2012) Cofilin Nuclear-Cytoplasmic Shuttling Affects Cofilin-Actin Rod Formation During Stress. *Journal of Cell Science*, **125**, 3977-3988. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.097667>
- [5] Heredia, L., Helguera, P., de Olmos, S., et al. (2006) Phosphorylation of Actin-Depolymerizing Factor/Cofilin by LIM-Kinase Mediates Amyloid- β -Induced Degeneration: A Potential Mechanism of Neuronal Dystrophy in Alzheimer's Disease. *The Journal of Neuroscience*, **26**, 6533-6542. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5567-05.2006>
- [6] 田磊, 廖明芳, 李冀洲, 等. 细胞骨架蛋白中 ADF/cofilin 蛋白家系的作用: 如何与肌动蛋白结合及发挥解聚作用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(50): 9941-9945.
- [7] 郭林林, 李学宝. 肌动蛋白解聚因子/丝切蛋白: 肌动蛋白重塑蛋白质家系[J]. 生命的化学, 2005, 25(3): 216-218.
- [8] 陈显久, 胥显民, 等. 菌体中大量抽提质粒 DNA 方法的改进[J]. 中国药物与临床, 2003, 3(2): 103-105.
- [9] Dopie, J., Skarp, K.P., Rajakyla, E.K., et al. (2012) Active Maintenance of Nuclear Actin by Importin 9 Supports Transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**, 544-552. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1118880109>
- [10] Nogales, E. (2001) Structural Insights into Microtubule Function. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, **30**, 397-420. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biophys.30.1.397>
- [11] Ferrer, I., Blanco, R., Carmona, M., et al. (2002) Phosphorylated Mitogen-Activated Protein Kinase(MAPK/ERK) and Calcium/Calmodulin-Dependent Kinase II(CaM Kinase II) Are Differentially Expressed in Tau Deposits in Neurons and Galial in Tau Opathies. *Journal of Neural Transmission*, **108**, 1397-1415. <http://dx.doi.org/10.1007/s007020100016>
- [12] 金善, 曹秉振, 张秀花, 等. 静脉注射同种异体骨髓间充质干细胞对血管性痴呆大鼠海马区脑组织形态及微管相关蛋白 2 表达的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(33): 6637-6640.
- [13] Gong, C.-X., Wegiel, J., Lidsky, T., et al. (2000) Regulation of Phosphorylation of Neuronal Microtubule-Associated Proteins MAP1b and MAP2 by Protein Phosphatase-2A and -2B in Rat Brain. *Brain Research*, **853**, 299-309. [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)02294-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-8993(99)02294-5)
- [14] 马志健, 牛海艳, 易西南. 血管性痴呆模型大鼠海马 CA3 区微管相关蛋白-2 的表达及其意义[J]. 现代生物医学进展, 2009, 9(12): 2231-2233.
- [15] 安改红, 陈学伟, 王静, 等. 慢性不可预知性心理应激对大鼠认知功能和海马微管相关蛋白-2 表达的影响[J]. 解放军预防医学杂志, 2012, 30(4): 239-242.

Hans 汉斯

期刊投稿者将享受如下服务:

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>