



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.10.008
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract4065.shtml

· 基础研究 ·

THBS2 表达与胃癌血管生成以及预后的关系

赵志杰, 李永翔, 孙若川

(安徽医科大学第一附属医院 普外胃肠外科, 安徽 合肥 230022)

摘要

目的: 探讨胃癌组织中血小板反应蛋白 2 (THBS2) 的表达及其与胃癌血管生成、预后的关系。

方法: 采用组织芯片和免疫组化技术检测 120 例胃癌和 36 例癌旁正常胃黏膜组织中 THBS2、VEGF、MMP-2、MMP-9 的表达以及 CD34 标记微血管密度 (MVD)。同法检测总生存期 ≥ 10 年的 40 例胃癌患者癌组织 (长生存期组) 和总生存期 ≤ 3 年的 30 例胃癌患者癌组织 (短生存期组) 的 THBS2 的表达, 比较两组患者的 THBS2 表达差异。

结果: THBS2 在胃癌组织中阳性表达率明显低于正常胃黏膜组织 ($P < 0.05$), 而 VEGF、MMP-2、MMP-9 的阳性表达率及 MVD 值明显高于正常胃黏膜组织 (均 $P < 0.05$); THBS2 阳性胃癌组织中 MVD 值明显低于 THBS2 阴性胃癌组织, 而 VEGF 阳性胃癌组织中 MVD 值明显高于 VEGF 阴性胃癌组织 (均 $P < 0.05$); 胃癌组织中 THBS2 的表达与 VEGF、MMP-2、MMP-9 呈明显负相关 ($r = -0.574$ 、 -0.447 、 -0.599 , 均 $P < 0.01$)。长生存期组患者胃癌组织 THBS2 的阳性表达率明显高于短生存期组 ($P < 0.05$)。

结论: THBS2 在胃癌中低表达, 从而可能通过促进 VEGF、MMP-2、MMP-9 的表达影响胃癌的血管生成和预后。 [中国普通外科杂志, 2014, 23(10):1343-1348]

关键词

胃肿瘤; 血小板反应蛋白 2; 血管内皮生长因子类; 基质金属蛋白酶类
中图分类号: R735.2

Relations of THBS2 expression with angiogenesis and prognosis of gastric cancer

ZHAO Zhijie, LI Yongxiang, SUN Ruochuan

(Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Anhui Medical University, Hefei 230022, China)

Corresponding author: LI Yongxiang. Email: yongxiangli_1@hotmail.com

ABSTRACT

Objective: To investigate thrombospondin 2 (THBS2) expression in gastric cancer tissue and its relations with the angiogenesis and prognosis of gastric cancer.

Methods: Using tissue microarray and immunohistochemical technology, the expressions of THBS2, VEGF, MMP-2 and MMP-9, and the CD34-labeled microvessel density (MVD) in 120 specimens of gastric cancer tissue and 36 specimens of tumor adjacent normal gastric mucosal tissue were detected. In addition, the THBS2 expression in the tumor tissues from 40 gastric cancer patients with the overall survival time ≥ 10 years (long survival group) and 30 gastric cancer patients with the overall survival time ≤ 3 years (short survival group) was

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30871207; 81270454); 安徽省年度重点科研资助项目 (12070403086)。

收稿日期: 2014-06-04; 修订日期: 2014-09-09。

作者简介: 赵志杰, 安徽医科大学第一附属医院硕士研究生, 主要从事胃肠临床与基础方面的研究。

通信作者: 李永翔, Email: yongxiangli_1@hotmail.com

determined by the same method, and the THBS2 expression difference between the two groups was compared.

Results: In gastric cancer tissue, the positive THBS2 expression rate was significantly lower while the positive expression rate of VEGF, MMP-2 and MMP-9 and the MVD value were significantly higher than those in normal mucosal tissue (all $P < 0.05$). The MVD value in gastric cancer tissues with positive THBS2 expression was significantly lower than those with negative THBS2 expression, which in gastric tissues with positive VEGF expression was significantly higher than in those with negative VEGF expression (both $P < 0.05$). THBS2 expression had negative correlation with the expressions of VEGF, MMP-2 and MMP-9 in gastric cancer tissues ($r = -0.574, -0.447, \text{ and } -0.599$, all $P < 0.01$). The positive THBS2 expression rate in gastric cancer tissues in long survival group was significantly higher than that in gastric cancer tissues in short survival group ($P < 0.05$).

Conclusion: THBS2 expression is down-regulated in gastric cancer tissue, which may affect the angiogenesis and prognosis of gastric cancer through promoting the expressions of VEGF, MMP-9 and MMP-2.

[Chinese Journal of General Surgery, 2014, 23(10):1343-1348]

KEYWORDS Stomach Neoplasms; Thrombospondin 2; Vascular Endothelial Growth Factors; Matrix Metalloproteinases

CLC number: R735.2

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一，是全球癌症死亡的第二大原因，侵袭和转移是胃癌的主要死因，与肿瘤性血管生成密切相关。研究^[1-3]显示，血小板反应蛋白 2 (THBS2) 参与恶性肿瘤的发生、发展，其表达下降与肿瘤新生血管的形成有关。近年来，在国外的动物实验和人类肿瘤研究中发现，它与血管内皮细胞生长因子 (VEGF)、基质金属蛋白酶 2 (MMP-2)、基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 等血管生成相关因子的关系密切，可以抑制它们的表达^[4-8]，从而调节肿瘤血管的生成，但 THBS2 在胃癌中的表达及其与胃癌血管生成相关因子相互关系，目前国内外尚未见报道。本研究应用组织芯片和免疫组化技术检测胃癌组织和癌旁正常胃黏膜组织中 THBS2 的表达及 VEGF、MMP-2、MMP-9 的表达，并进行微血管密度 (MVD) 计数，分析 THBS2 与胃癌血管生成相关因子的关系，探讨 THBS2 对胃癌血管生成及预后的作用和影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象 选择 2006 年 12 月—2008 年 5 月在安徽医科大学第一附属医院行根治手术的存档原发性胃癌石蜡包埋标本 120 例，以距癌灶 > 5 cm 且经病理确诊为正常胃黏膜的 36 例癌旁组织作为对照，并将样本整合到组织芯片中，用以免疫组化染色。胃癌患者术前均未进行放化疗，其中男

82 例，女 38 例；年龄 37~80 岁，中位年龄 61 岁；肿瘤组织学为中高分化腺癌 48 例，低分化腺癌 (包括未分化癌) 72 例；TNM 分期为 I 期 24 例，II 期 36 例，III 期 39 例，IV 期 21 例。

电话或信件随访 2005 年以前在我院确诊为胃癌并行根治手术的患者，从中选取具有完整的临床资料和随访资料的 70 名患者，进一步将样本整合到组织芯片中，并且分为长生存期组和短生存期组。长生存期组 40 例 (总生存期 ≥ 10 年)：I/II 期 28 例，III/IV 期 12 例；淋巴结转移 15 例，无淋巴结转移 25 例；早期胃癌 7 例，进展期胃癌 33 例。短生存期组 30 例 (总生存期 ≤ 3 年)：I/II 期 14 例，III/IV 期 16 例；淋巴结转移 18 例，无淋巴结转移 12 例。总生存期定义为自手术之日起至随访截止时间或死亡时间。

1.1.2 组织芯片和主要试剂 组织芯片由上海芯超有限公司构建，兔抗人浓缩型 THBS2 多克隆抗体 (工作浓度 1:3 000) 购自美国 Novus 公司。鼠抗人即用型单克隆抗体 VEGF、MMP-2、CD34，兔抗人即用型单克隆抗体 MMP-9，PV-6000 免疫组化检测试剂盒和 DAB 显色试剂盒均购自北京中杉金桥公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化染色 所有抗体严格按照产品说明书进行抗原修复，均采用免疫组化二步法进行染色，用 DAB/H₂O₂ 显色，苏木精对比染色。用 PBS 代替一抗作阴性对照，已知阳性切片作阳性对照。

1.2.2 结果判读 THBS2、VEGF、MMP-2 和 MMP-9 染色的评估是根据染色强度和阳性细胞率进行评分: 无着色为 0 分; 淡黄色为 1 分; 黄色为 2 分; 棕褐色为 3 分。阳性细胞率计分标准: 阳性细胞 <5% 为 0 分; 5%~25% 为 1 分; >25%~50% 为 2 分; >50%~75% 为 3 分; >75% 为 4 分。总评分值 (阳性细胞率评分乘以着色强度评分) ≤ 3 分为阴性, >3 分为阳性。以上方法均由 2 名有经验的高年资病理医师采用双盲法独立检测, 取平均值。微血管密度 (MVD): CD34 阳性染色定位于血管内皮细胞, 呈棕褐色, 胃癌组织内孤立的棕褐色血管内皮细胞或细胞簇代表 1 条单独的微血管。在低倍物镜 ($\times 100$) 下挑选微血管分布最高的区域, 再在中倍镜 ($\times 200$) 下记录 5 个视野内的微血管数, 取其平均值作为该病例的 MVD 值。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 16.0 统计学软件分析。计数资料采

用 χ^2 检验, 计量资料采用 t 检验, MVD 以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 相关性分析采用 Spearman 等级相关检验进行分析。

2 结果

2.1 THBS2、VEGF、MMP-2、MMP-9 在胃癌中的表达

胃癌组织中 THBS2、VEGF、MMP-2、MMP-9 的阳性表达率分别为 46.7% (56/120)、65.0% (78/120)、75.8% (91/120)、67.5% (81/120), 癌旁对照组 THBS2、VEGF、MMP-2 及 MMP-9 的阳性表达率分别为 69.4% (25/36)、25.0% (9/36)、30.6% (11/36)、27.8% (10/36), 组间差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); THBS2、VEGF、MMP-2、MMP-9 的阳性信号主要在癌细胞的胞浆、其中 MMP-2 和 MMP-9 在间质细胞也有表达 (图 1)。

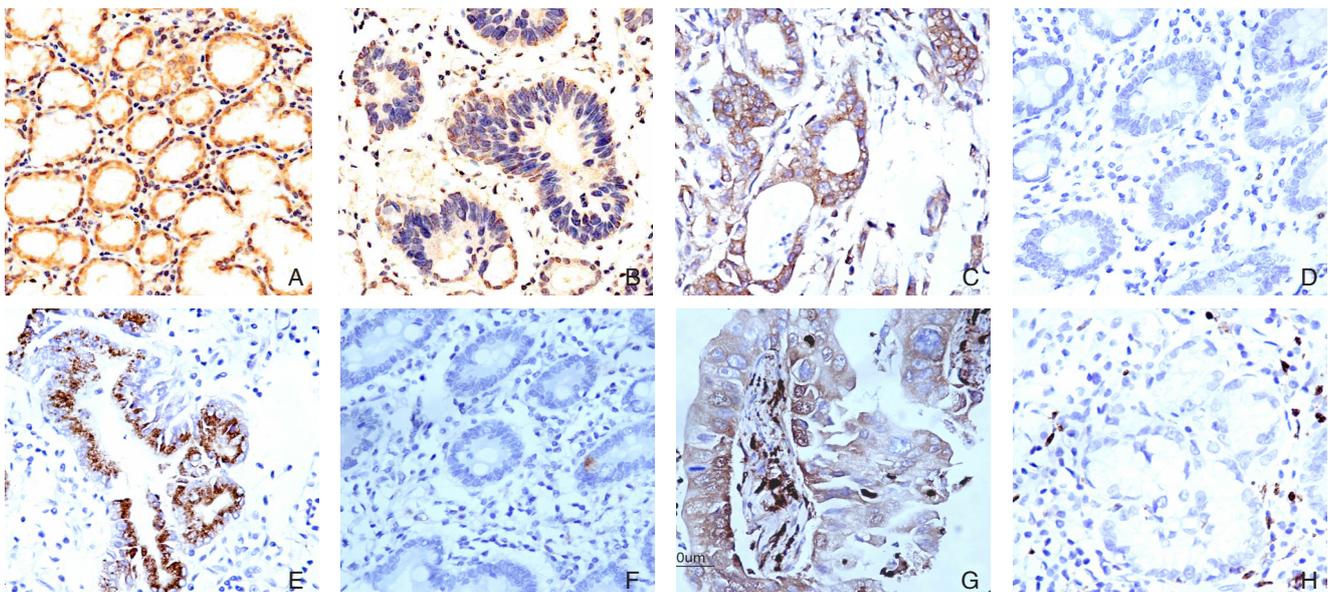


图 1 免疫组化染色结果 ($\times 400$) A: 正常胃组织 THBS2 阳性表达; B: 胃癌组织 THBS2 阴性表达; C: 胃癌组织 VEGF 阳性表达; D: 正常胃组织 VEGF 阴性表达; E: 胃癌组织 MMP-2 阳性表达; F: 正常胃组织 MMP-2 阴性表达; G: 胃癌组织 MMP-9 阳性表达; H: 正常胃组织 MMP-9 阴性表达

Figure 1 Results of immunohistochemical staining ($\times 400$) A: THBS2 positive expression in normal gastric mucosa; B: THBS2 negative expression in gastric cancer tissue; C: VEGF positive expression in gastric cancer tissue; D: VEGF negative expression normal gastric mucosa; E: MMP-2 positive expression in gastric cancer tissue; F: MMP-2 negative expression normal gastric mucosa; G: MMP-9 positive expression in gastric cancer tissue; H: MMP-9 negative expression normal gastric mucosa

2.2 CD34 在胃癌中的表达

120 例胃癌中 MVD 平均值是 55.87 ± 24.13 , 而 36 例癌旁正常胃黏膜中 MVD 平均值是

33.76 ± 12.62 , 两者差异有统计学意义 ($t=2.58$, $P < 0.05$) (图 2)。

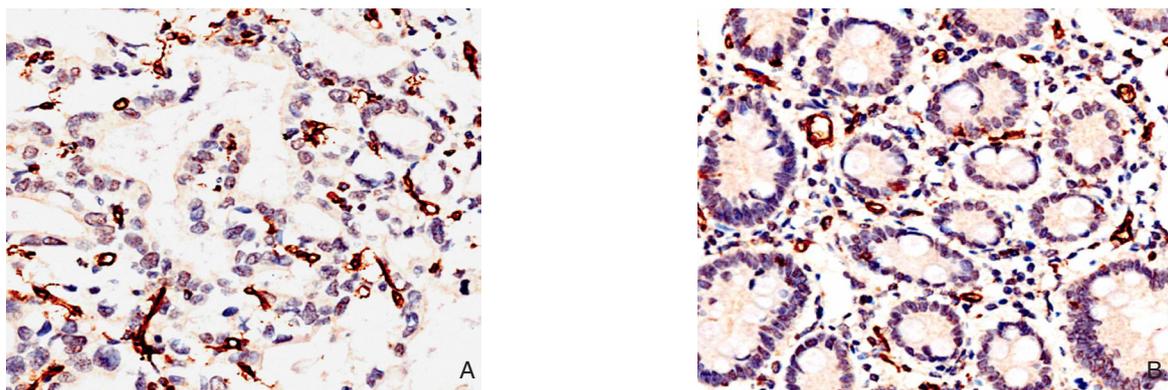


图 2 CD34 免疫组化染色 (×400)

Figure 2 Immunohistochemical staining for CD34 (×400)

A: 胃癌组织; B: 正常胃黏膜组织

A: Gastric cancer tissue; B: Normal gastric mucosal tissue

2.3 胃癌组织中 THBS2、VEGF 的表达与 MVD 的关系

120 例胃癌组织中, THBS2 阳性表达者的 MVD 值为 46.52 ± 19.57 , THBS2 阴性表达者的 MVD 值为 57.90 ± 16.99 , 两者差异有统计学意义 ($t=2.05$, $P<0.05$)。在 120 例胃癌组织中, VEGF 阳性表达者的 MVD 值为 59.20 ± 17.39 , 而 VEGF 阴性表达者的 MVD 值为 47.64 ± 20.24 , 两者差异有统计学意义 ($t=2.03$, $P<0.05$)。

2.4 胃癌组织中 THBS2 的表达与 VEGF、MMP-2、MMP-9 的相互关系

经 Spearman 等级相关检验发现胃癌组织中 THBS2 的表达与 VEGF、MMP-2、MMP-9 的表达均呈明显的负相关 ($r=-0.574$ 、 -0.447 、 -0.599 , 均 $P<0.01$) (表 1)。

表 1 胃癌中 THBS2 的表达与 VEGF、MMP-2、MMP-9 的相关性 [n (%)]

Table 1 Correlations of THBS2 expression with expression of VEGF, MMP-2 and MMP-9 [n (%)]

变量	阳性表达	阴性表达	r	P
THBS2	56 (46.7)	64 (53.3)	—	—
VEGF	78 (65.0)	42 (35.0)	-0.574	<0.01
MMP-2	91 (75.8)	29 (24.2)	-0.447	<0.01
MMP-9	81 (67.5)	39 (32.5)	-0.599	<0.01

2.5 THBS2 的表达与胃癌长期预后的关系

THBS2 在 40 例长生存期组患者胃癌组织的阳性表达率为 57.5% (23/40), 在 30 例短生存期组患者胃癌组织的阳性表达率为 33.3% (10/30), 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

3 讨论

胃癌的浸润和转移是多步骤、多因素参与的复杂过程, 在这个过程中肿瘤的血管生成是不可或缺的先决条件。肿瘤的血管生成包括基底膜的溶解、内皮细胞增殖和迁移、形成血管环以及形成新的基底膜等过程, 在这个过程中各种血管生成相关因子发挥着重要的调节作用。THBS2 是 THBS 蛋白家族中的一员, 它是一类细胞膜表面钙结合糖蛋白, 广泛参与骨骼的生长、细胞的黏附、细胞外基质的构建、炎症反应和血管生成^[9]等生物过程。由于它具有备解素样 I 型重复区域结构, 所以它主要的作用是作为血管生成的抑制剂, 它可以通过对肿瘤血管生成的抑制作用, 从而阻止肿瘤的发展和转移^[10-12]。

笔者在前期研究^[13]中通过定量 PCR 和 Western blot 实验, 已经证实胃癌中 THBS2 的 mRNA 和蛋白水平都明显低于正常对照组, 本实验也发现在胃癌组织芯片中 THBS2 的表达明显低于正常对照组, 研究结果与前面的结果相一致也与 Yang 等^[14]研究结果一致, 说明 THBS2 可能作为一种抑癌基因在胃癌的发生发展过程当中起重要作用。本研究还发现在胃癌 THBS2 阳性组中的 MVD 值明显低于 THBS2 阴性组, 提示它抑制胃癌血管的生成。Koch 等^[15]也研究发现 THBS2 可以与 CD36 受体相互作用, 从而抑制乳腺癌的血管生成。有研究^[16]表明, THBS2 可以通过作用于 VLDL 受体和降低 Akt、MAPK 的磷酸化水平来抑制血管内皮细胞的增殖, 从而影响肿瘤血管的生成。在胃癌中 THBS2 抑制血管生成的具体机制,

现在国内外研究的比较少, 有待进一步研究。

MMP-2、MMP-9 是基质金属蛋白酶家族最重要的两个成员, 因为它们能够降解细胞外基质和基底膜、促进血管生成因子的释放、调节内皮细胞迁移和管状形成, 所以它们对肿瘤的血管生成具有重大意义。很多研究表明 MMP-2、MMP-9 的表达与胃癌的关系非常密切, 且与肿瘤的浸润深度、淋巴结转移及分化程度密切相关^[17]。本研究显示在胃癌组织中 MMP-2、MMP-9 的表达率明显高于癌旁正常胃黏膜组织, 经等级相关检验表明胃癌组织中 THBS2 和 MMP-2、MMP-9 的表达具有负相关性, THBS2 可以抑制 MMP-2、MMP-9 的表达, 这与 Calabro 等^[18-19]通过构建 THBS2- 裸鼠进行动物实验的结果一致。Nakamura 等^[5]也研究发现, THBS2 可以通过降低 MMP-9 的表达而抑制胰腺癌细胞株的侵袭性。

VEGF 被认为是最强和最重要的促血管生成因子, 与人类肿瘤的发生、发展密切相关^[20-21], 本研究也发现胃癌中 THBS2 的表达和 VEGF 的关系密切, 两者呈明显的负相关性, THBS2 可以抑制 VEGF 的表达。Yan 等^[22]通过构建角膜碱烧伤动物模型研究也发现, THBS2 的表达可以抑制 VEGF 的表达。THBS2 可能通过作用于 VEGF, 对胃癌的血管生成产生重要影响。

在笔者前期研究中^[13], 通过生存分析 Kaplan-Meier 法和 COX 比例风险模型已经证实 THBS2 的表达是胃癌患者预后良好的独立因素, 本研究也发现 THBS2 长生存期组患者胃癌组织的表达率明显高于短生存期组患者胃癌组织的表达率, 两者差异有统计学意义, THBS2 可能会成为判断胃癌患者预后重要指标。THBS2 对胃癌预后的影响可能与它抗血管生成有关, 可能还有其他方面的原因, 这有待进一步的研究。相信随着更为深入的研究, THBS2 可能会为预测胃癌复发及判断预后提供新的依据, 进一步探明 THBS2 在抑制胃癌血管形成方面的机制, 将为胃癌的临床治疗提供一个更为广阔的应用前景。

参考文献

- Palenski TL, Gurel Z, Sorenson CM, et al. Cyp1B1 expression promotes angiogenesis by suppressing NF- κ B activity[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2013, 305(11):C1170-1184.
- Chen J, Yao D, Zhao S, et al. MiR-1246 promotes SiHa cervical cancer cell proliferation, invasion, and migration through suppression of its target gene thrombospondin 2[J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2014, 290(4):725-732.
- Cheon DJ, Tong Y, Sim MS, et al. A collagen-remodeling gene signature regulated by TGF-beta signaling is associated with metastasis and poor survival in serous ovarian cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(3):711-723.
- Van Hul M, Frederix L, Lijnen HR. Role of thrombospondin-2 in murine adipose tissue angiogenesis and development[J]. *Obesity (Silver Spring)*, 2012, 20(9):1757-1762.
- Nakamura M, Oida Y, Abe Y, et al. Thrombospondin-2 inhibits tumor cell invasion through the modulation of MMP-9 and uPA in pancreatic cancer cells[J]. *Mol Med Rep*, 2008, 1(3):423-427.
- Maclachlan S, Skokos EA, Agah A, et al. Enhanced angiogenesis and reduced contraction in thrombospondin-2-null wounds is associated with increased levels of matrix metalloproteinases-2 and -9, and soluble VEGF[J]. *J Histochem Cytochem*, 2009, 57(4):301-313.
- Lawler PR, Lawler J. Molecular basis for the regulation of angiogenesis by thrombospondin-1 and -2[J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012, 2(5):a006627. doi: 10.1101/cshperspect.a006627.
- Tian W, Sawyer A, Kocaoglu FB, et al. Astrocyte-derived thrombospondin-2 is critical for the repair of the blood-brain barrier[J]. *Am J Pathol*, 2011, 179(2):860-868.
- Meng H, Zhang X, Hankenson KD, et al. Thrombospondin 2 potentiates notch3/jagged1 signaling[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(12):7866-7874.
- Kunstfeld R, Hawighorst T, Streit M, et al. Thrombospondin-2 overexpression in the skin of transgenic mice reduces the susceptibility to chemically induced multistep skin carcinogenesis[J]. *J Dermatol Sci*, 2014, 74(2):106-115.
- Matos AR, Coutinho-Camillo CM, Thuler LC, et al. Expression analysis of thrombospondin 2 in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia[J]. *Exp Mol Pathol*, 2013, 94(3):438-444.
- Clemessy M, Janzer RC, Lhermitte B, et al. Expression of dual angiogenic/neurogenic growth factors in human primary brain tumors[J]. *J Neurooncol*, 2012, 107(1):29-36.
- 孙若川, 李永翔. THBS2 在胃癌组织中的表达与预后的关系 [J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49(7):995-998.
- Yang S, Shin J, Park KH, et al. Molecular basis of the differences between normal and tumor tissues of gastric cancer[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1772(9):1033-1040.
- Koch M, Hussein F, Woeste A, et al. CD36-mediated activation of endothelial cell apoptosis by an N-terminal recombinant fragment of thrombospondin-2 inhibits breast cancer growth and metastasis in vivo[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2011, 128(2):337-346.

- [16] Oganessian A, Armstrong LC, Migliorini MM, et al. Thrombospondins use the VLDL receptor and a nonapoptotic pathway to inhibit cell division in microvascular endothelial cells[J]. *Mol Biol Cell*, 2008, 19(2):563-571.
- [17] Shen W, Xi H, Wei B, et al. The prognostic role of matrix metalloproteinase 2 in gastric cancer: a systematic review with meta-analysis[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2014, 140(6):1003-1009.
- [18] Calabro NE, Kristofik NJ, Kyriakides TR. Thrombospondin-2 and extracellular matrix assembly[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1840(8):2396-2402.
- [19] Krady MM, Zeng J, Yu J, et al. Thrombospondin-2 modulates extracellular matrix remodeling during physiological angiogenesis[J]. *Am J Pathol*, 2008, 173(3):879-891.
- [20] 段思佳, 曾庆黎, 周凯, 等. 利用组织芯片研究 VEGF-C 和 MMP-9 在大肠癌中的表达及其意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2012, 21(4):427-431.
- [21] 熊立新. VEGF 和 EGFR 在青年乳腺癌的表达及其与淋巴结转移的关系[J]. *中国普通外科杂志*, 2012, 21(5):614-616.
- [22] Yan J, Zeng Y, Jiang J, et al. The expression patterns of vascular endothelial growth factor and thrombospondin 2 after corneal alkali burn[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2007, 60(1):105-109.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 赵志杰, 李永翔, 孙若川. THBS2 表达与胃癌血管生成以及预后的关系[J]. *中国普通外科杂志*, 2014, 23(10):1343-1348. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.10.008

Cite this article as: ZHAO ZJ, LI YX, SUN RC. Relations of THBS2 expression with angiogenesis and prognosis of gastric cancer[J]. *Chin J Gen Surg*, 2014, 23(10):1343-1348. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.10.008

本刊远程稿件处理系统投稿步骤

1. 选择“作者投稿”一栏, 进入“作者投稿”界面。

如果是第一次投稿, 需要先注册本系统: 点“注册”进入注册流程, 按照系统提示进行注册, 请注意, “*”选项为用户必填项。

2. 点“作者投稿”, 选择左边的“我要投稿”一栏, 按照投稿向导的提示进行。

(1) 输入稿件中文文题和英文文题。

(2) 输入作者。若所投稿件为多人撰写, 在作者信息下添加该文的合作作者, 合作作者可以只添加姓名即可。此处需注意, 如该文为 n 位作者撰写, 需在填写完 n 位作者后, 再点一下“继续添加作者”后方可点“下一步”, 否则最后一个作者本系统将不会显示。

(3) 第三步“学科类型”、“专业类型”、“创作类型”、“投稿栏目”、“文章分类号/PACS 码”可以不选。

如果该文有基金支持, 请在“基金类型”下的长条框中输入(包括基金号); 如果有多个, 请用分号分开。输完以后点“下一步”。

(4) 输入关键词。请注意各词之间一定要用分号隔开。然后点击“添加”。再点“下一步”。

(5) 输入中英文摘要后再单击“下一步”。

(6) 根据系统提示在相应的栏目中输入你要回避或推荐的专家, 也可以不写。单击“下一步”, 检查稿件的基本信息, 如有需要修改的地方, 点击“修改”; 再确认无误后, 单击“下一步”进入稿件上传步骤。

(7) 在“稿件上传操作区”点“浏览”, 选中要上传的稿件后, 点击右边的“上传稿件”。待弹出“稿件上传完毕, 请继续下一步”的对话框时, 点“确定”, 再点“下一步”继续投稿。请注意, 这一步可能因您的网速和稿件的大小, 所需时间略有不同, 请耐心等待, 如果长时间仍没有弹出“稿件上传完毕, 请继续下一步”的对话框, 可重新尝试, 确保稿件上传方可进行下一步。

(8) 核对完所投稿件的信息后请点“下一步”。如果您对编辑部有什么特别的要求或说明, 请在“给编辑部留言”框中留下您的意见, 点“立即提交”, 系统会提示“*** 同志: 非常感谢您对本刊物的支持! 您的来稿《**》我们已经收到, 请等待编辑部通知。查询请登录编辑部网站 <http://www.zpwz.net> 或咨询编辑部邮箱: pw4327400@126.com”。

中国普通外科杂志编辑部