

尿液外泌体在泌尿系统肿瘤中的研究进展

郭利伟¹, 陈爱萍², 王 华³, 李国荣⁴, 赵 安²

(1. 浙江大学医学院附属第一医院, 传染病诊治国家重点实验室, 浙江 杭州 310006; 2. 浙江省肿瘤研究所, 浙江省肿瘤医院, 浙江 杭州 310022; 3. 浙江省肿瘤医院, 浙江 杭州 310022; 4. 法国里昂大学中心医院, 圣艾第安, 41000)

摘 要: 外泌体是细胞主动分泌的具有脂质双分子层的小囊泡。尿液是在泌尿系统中产生, 并存在大量的外泌体。肿瘤在发生、发展过程中能不断释放外泌体到细胞外。通过检测尿液中的外泌体可能早期追踪及监控泌尿系统肿瘤, 代替活检穿刺或影像学等检测。外泌体还可用于脂溶性药物的装载、靶向药物及免疫疫苗的制备。全文对尿液外泌体的提取及其在泌尿系统肿瘤诊断、治疗的应用进展进行综述。

关键词: 泌尿系统肿瘤; 尿液; 外泌体; 靶向治疗

中图分类号: R737 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2017)07-0593-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2017.07.B006

New Progress on Urinary Exosome in Urological Cancer

GUO Li-wei¹, CHEN Ai-ping², WANG Hua³, et al.

(1. State Key Laboratory for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital of Zhejiang University, Hangzhou 310006, China; 2. Zhejiang Cancer Research Institute, Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China; 3. Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China)

Abstract: Exosomes are defined as nanovesicles, which comprising a lipid bilayer membrane, that can be secreted by tumor cells. The urine produced by the urology system, which contains a large number of exosome. The exosome can be secreted by tumor cell during the tumor progression and development. Urinary exosomes can be used for the diagnosis and monitoring of urological tumors. The urinary exosomes also have potential as targeted-drug carriers and tumor vaccine. This article reviews the recent advances in the extraction of urinary exosomes and their application in the diagnosis and treatment of urinary system tumors.

Subject words: urological cancer; urine; exosome; targeted therapy

外泌体是细胞主动分泌的一种小囊泡^[1,2]。先前认为外泌体是一种无功能的细胞成份, 但越来越多的研究发现其能通过携带基因和蛋白等生物物质穿梭在细胞间进行“信息传递”而参与生理与疾病的调控进程^[3]。肿瘤细胞在其发生、发展过程中能不断释放外泌体到微环境中, 其释放外泌体的量还高于正常细胞^[4,5]。在细胞培养液或外周体液(血、尿液、唾

液等)中都能检测到外泌体, 意味其具有成为无创生物标志物的潜能^[6,7]。尿液的产生、储存和排放是在泌尿系统中完成。通过检测尿液中的外泌体, 可能早期发现泌尿系肿瘤, 也可补充术后复发监控等检查方面的不足。另一方面, 外泌体是一种 100nm 大小、携带肿瘤抗原、脂质双分子层的结构, 其在脂溶性药物装载、疫苗研发等方面也具有开发价值^[8,9]。

基金项目: 国家自然科学基金(81402117); 浙江省自然科学基金(LY17H160043); 浙江省钱江人才计划(QJD1602025); 浙江省卫生科技计划(2015111814)

郭利伟, 陈爱萍为共同第一作者

通讯作者: 赵安, 副研究员, 博士; 浙江省肿瘤研究所 浙江省肿瘤医院, 浙江省杭州市半山东路 1 号(310022); E-mail: zhaoan@zjcc.org.cn

收稿日期: 2017-03-02; **修回日期:** 2017-05-22

1 尿液外泌体的提取与鉴定

超高速梯度离心是外泌体提取的最常用方法: 通过不同速度的多次离心去除细胞及细胞碎片, 最

后一次超高速离心以 100 000~200 000 rpm 速度收集沉淀的外泌体^[10]。通过磁珠抗体结合外泌体表面的分子(如 MHC class II)来富集,也是一种提取外泌体的方法^[11]。虽然该方法能有效避免超高速离心机的使用,但其提取外泌体的总量是非常有限的。2013 年后,一些商业性试剂盒如 Total Exosome Isolation Reagent(Invitrogen)、Exo Quick(SBI)等基于脂溶性抽提液的试剂盒越来越成为提取外泌体的主要方法。该方法简单,易于实验室操作,但费用较高,常需进一步的纯化后用于后续实验开展。

Alvarez 和 Tauro 分别对外泌体提取方法超高速离心法、试剂盒抽提法、DG-Exos 法、Epcam 磁珠法等进行了提取效率的比较。上述方法都能成功提取外泌体,试剂盒抽提和磁珠富集法得到的外泌体量相比较其他方法高^[12,13]。此外,一些基于微流控技术的芯片提取方法也陆续展现出来^[14]。但至今外泌体提取的方法还没有一个统一的标准。

提取外泌体后需要在其形态学上进行鉴定。较常利用电子显微镜观察确定其为一种 50~100nm 大小的双分子层结构囊泡,或利用 Nanoparticle Tracking Analysis 对其直径大小进行测量^[15,16]。另一方面,通过外泌体表明携带的分子进行检测也是常规的鉴定方法。如用蛋白质免疫印迹(Western Blotting, WB)方法检测四联体跨膜蛋白(如 CD63、CD9)、热休克蛋白(如 Hsp90)等外泌体标志性分子;也可用免疫荧光或流式细胞术等方法检测这些指标的表达^[17]。

2 尿液外泌体与泌尿系统肿瘤

尿液外泌体与泌尿肿瘤的研究报道逐渐增多,其作为生物标志物的潜能得到了越来越多的肯定与关注。然而大样本的临床多中心随机试验仍然较少,睾丸癌、阴茎癌等少见肿瘤还未发现相关研究报道。

2.1 前列腺癌

在 2009 年最早对前列腺癌(prostate cancer, PCa)患者尿液外泌体核糖核酸(ribonucleic acid, RNA)检测进行了报道,发现前列腺癌基因 3(prostate cancer associated 3, PCA3)和跨膜丝氨酸蛋白酶 2:ETS 相关基因(ETS-related gene, ERG)融合基因在 PCa 患者尿液外泌体中表达,尿液外泌体

因此具有潜力作为 PCa 诊断的一种新方法^[18]。Russo 等^[19]在 PCa 活检阳性组、阴性组、手术组及正常组的尿液外泌体中也证实了 PCA 和 ERG 等基因表达水平的区别。通过直肠指检方法后收集的尿液,能提高 PCA3 RNA 在外泌体中的检测概率,并增加 PCa 的诊断曲线下面积(area under curve, AUC)值^[20]。

最近发表在 JAMA Oncol 上的一篇文章报道尿液外泌体基因测序得到的 3 个联合基因(ERG、PCA 和 SPDEF)对高级别 PCa($\geq$ GS7)诊断的阴性预测率为 91%、阳性预测率为 36%;敏感度为 92%、特异性为 34%。相应的人群可用尿液外泌体检查方法代替不必要的活检穿刺^[21]。Felix 等首次对 PCa 患者尿液外泌体进行了转录组测序,通过筛选和验证最终确定了钙依赖性黏附蛋白 3 在 PCa 组中显著性降低,可能在 PCa 中起到抑癌的作用^[22]。Foj 等检测了 5 种在 PCa 组织中高表达的微小 RNA(microRNAs, miRNAs)在尿液外泌体中的表达情况,联合 miR-21 和 miR-375 具有最佳的 PCa 诊断价值。此外, Samsonov 报道了通过一种 Lectin-Induced Agglutination 方法可以更便宜和简单的从尿液中分离外泌体, PCa 组织中高表达相关 miRNAs(miR-574-3p, miR-141-5p 和 miR-21-5p)在尿液外泌体中也能得到相应扩增结果^[23]。

外泌体不仅携带核酸,其膜上或胞内还拥有肿瘤相关蛋白或脂类。Øverbye 等利用质谱对 PCa 尿液外泌体的蛋白组学进行了鉴定,发现 37 个关键蛋白的表达水平单个或联合能区分 PCa 组和正常组^[24]。利用 WB 和酶联免疫吸附测定(ELISA)的免疫抗原检测法,也能检测到 PCa 患者尿液外泌体中脂筏特征蛋白 2,跨膜蛋白 256 等蛋白的特异性高表达,但需要的一定的蛋白提取溶度^[25]。另外,通过高通量质谱学定量分析尿液外泌体的脂类研究鉴定出 107 个的脂类,其中 Phosphatidylserine 与 Lactosylceramide 表达水平联合对 PCa 的诊断达到 93%敏感度和 100%特异性^[26]。

2.2 膀胱癌

膀胱是尿液储存的直接器官,在尿液中可能比血液更快检测到膀胱癌(bladder cancer, BCa)相关指标的改变。Joanne 等^[27]应用 Sucrose Cushion 方法提纯外泌体,证实其外泌体标志物 CD9、CD81 和 CD63 的表达。Perez 对^[28]BCa 患者尿液外泌体 RNA

进行分析,证实尿液外泌体中的 RNA 是个稳定的生物标志物,其中黏液蛋白糖化酶 1 和人源性长寿保障基因 2 可作为 BCa 患者的诊断指标。通过对膀胱移行细胞癌患者尿液外泌体 miRNA 表达谱的研究,发现有 7 种 miRNA 的表达明显高于健康对照,并且对膀胱移行细胞癌的分期分级有参考意义^[29]。David 等^[30]发现 BCa 患者尿液外泌体 miR-4454 和 miR-21 表达水平明显高于患者肿瘤组织及白细胞。

Smalley 等^[31]通过质谱检测技术 BCa 患者及健康对照人群中尿液外泌体的 307 种蛋白进行检测,鉴定出 BCa 患者尿液外泌体中有 8 个蛋白高表达,健康人群尿液外泌体中 1 个蛋白高表达。另一方面,将 BCa 患者尿液外泌体蛋白质谱与疝气患者比较,发现尿液外泌体肿瘤相关钙信号转换器蛋白 2 是潜在的 BCa 诊断的无创标记物^[32]。

高病理分级 BCa 的尿液外泌体可以促进 BCa 细胞和内皮细胞的生成和迁移。沉默了 EGF 样重复盘状结构 I 样域蛋白 3 (EGF like repeats and discoidin domains 3, EDIL-3) 的外泌体不促进尿路上皮和内皮细胞的迁移,且患者尿液外泌体 EDIL-3 的表达水平显著性高于其在健康人群中的表达水平,并参与内皮生长因子信号的传导,阻断 EGFR 信号传导可以阻断 EDIL-3 诱导的 BCa 肿瘤细胞的转移^[33]。此外, Franzen 等^[34]发现 BCa 患者尿液外泌体可以诱导间充质细胞标记物 CDH 类活化,并在患者尿路上皮细胞的表达。

2.3 肾细胞癌

目前国内外对肾细胞癌尿液外泌体研究报道还不多。我们课题组报道肾细胞癌 (renal cell carcinoma, RCC) 患者尿液中存在大量小片段非编码 RNA,尿液中可检测到 RCC 相关癌基因^[35]。RCC 细胞能通过 exosome 选择性携带组织中高表达的 miR-210 和 miR-1233 释放到外周中,利用 Epcam 方法纯化出肿瘤来源的外泌体,可以有效提高对 RCC 诊断的特异性^[17]。最近,我们又证实 miR-210 表达水平在尿液中也显著性高表达,尿液 miR-210 可成为 RCC 的液态活检术^[36]。这些小片段 RNA 如何通过 exosome 携带而被 RCC 细胞释放仍需进一步研究。在蛋白组研究方面, Raimondo 等报道了 RCC 尿液外泌体可检测到 186 个蛋白,其中 10 个可成为潜在的生物标志物区分 RCC 组和对照组的蛋白^[37]。

3 外泌体的治疗前景

3.1 药物载体

外泌体除了作为肿瘤无创诊断标志物外还可以用作药物载体,其脂质包膜可以保护外泌体 RNA 不被血液中 RNA 酶降解,还可被传递到靶细胞^[38]。Alvarez 等证实来源于鼠树突细胞的外泌体可以靶向定位于脑组织。这表明外泌体在外周可穿过血脑屏障并降低小鼠脑组织中目的基因的表达^[39]。应用类似方法可以将装载 miRNA 的外泌体运输到小鼠表达 EGFR 的乳腺癌细胞^[40]。

有研究表明膀胱癌细胞比尿路正常上皮细胞的吸收外泌体的能力更强,是其 50 倍或者更高^[41]。PLK-1 siRNA 可以电穿孔到来源于人胚胎肾细胞的外泌体,并在体外运输到膀胱癌细胞。用含有 PLK1 siRNA 的外泌体处理的膀胱癌细胞,可以使其 PLK1 mRNA 表达下调,这也支持外泌体可以运输 siRNA 到靶细胞的观点^[42]。

另一方面, Tian 等报道多柔比星可以被电穿孔到靶细胞为表达 iRGD 的乳腺肿瘤细胞的外泌体中。这些外泌体递送至裸鼠模型中,与给予相同全身剂量的多柔比星的小鼠相比,外泌体可以优先在乳腺肿瘤细胞富集,并使肿瘤在 21d 内缩小^[43]。有治疗作用的纳米颗粒、小分子抑制剂、亲脂内药物可以装载到外泌体中,可以增加靶组织中药物浓度和并降低对正常组织毒性作用^[43]。这些技术为开发外泌体用于膀胱、前列腺及肾脏肿瘤的靶向治疗提供了理论基础。

3.2 免疫疫苗

外泌体用作肿瘤疫苗也是当今的研究热点。来源于肿瘤的外泌体符合无细胞疫苗的全部抗原提呈要求,此外还弥补了传统疫苗的不足。外泌体同时可以表达特异性免疫抑制分子,例如 FasL 或 TGFb,降低其免疫原性^[44]。Zhang 等发现来源于 IL-12 锚定的肾癌细胞的外泌体在体外比外泌体和 IL-12 有更显著的抗肿瘤效应^[44]。他们研制的 RCa 外泌体疫苗因其含有 GPI 锚定的 IL-12,具有更强的免疫原性。此疫苗在体外可以介导更显著的细胞毒性效应,为外泌体用于肿瘤疫苗用于 RCC 的治疗提供证据。

最近几年,外泌体相关的研究论文和课题呈明显上升趋势。提取方法的标准化操作和外泌体定量

的参照物还缺失,其临床转化价值展现出巨大的潜力,但仍需要更多的基础研究来支持。

参考文献:

- [1] Kahlert C, Kalluri R. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2013, 91(4): 431–437.
- [2] Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends[J]. *J Cell Biol*, 2013, 200(4): 373–383.
- [3] Shi WZ, Lu EQ, Guo L. Research progress in the detection of extracellular vesicles in patients with malignancy[J]. *China Cancer*, 2015, 24 (10): 849–854. [施卫忠, 卢仁泉, 郭林. 恶性肿瘤患者外泌体检测的研究进展[J]. *中国肿瘤*, 2015, 24 (10): 849–854.]
- [4] Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer [J]. *Nature*, 2015, 523(7559): 177–182.
- [5] Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2008, 110(1): 13–21.
- [6] Kalluri R. The biology and function of exosomes in cancer [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2016, 126(4): 1208.
- [7] Cappello F, Logozzi M, Campanella C, et al. Exosome levels in human body fluids: a tumor marker by themselves? [J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2017, 96: 93–98.
- [8] Vader P, Mol EA, Pasterkamp G, et al. Extracellular vesicles for drug delivery [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 106 (Pt A): 148–156.
- [9] Li SD, Hou X, Qi HZ, et al. Exosomes: provide naturally occurring endogenous nanocarriers for effective drug delivery strategies [J]. *Progress in Chemistry*, 2016, 28(2/3): 353–362. [李思迪, 侯信, 齐洪昭, 等. 外泌体: 为高效药物投递策略提供天然的内源性纳米载体[J]. *化学进展*, 2016, 28(2/3): 353–362.]
- [10] Wang D, Sun W. Urinary extracellular microvesicles: isolation methods and prospects for urinary proteome[J]. *Proteomics*, 2014, 14(16): 1922–1932.
- [11] Théry C, Amigorena S, Raposo G, et al. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids [J]. *Curr Protoc Cell Biol*, 2006 Apr; Chapter 3: Unit 3.22.
- [12] Alvarez ML, Khosroheidari M, Ravi RK, et al. Comparison of protein, microRNA, and mRNA yields using different methods of urinary exosome isolation for the discovery of kidney disease biomarkers [J]. *Kidney Int*, 2012, 82 (9): 1024–1032.
- [13] Tauro BJ, Greening DW, Mathias RA, et al. Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes [J]. *Methods*, 2012, 56(2): 293–304.
- [14] He M, Crow J, Roth M, et al. Integrated immunoisolation and protein analysis of circulating exosomes using microfluidic technology[J]. *Lab on a Chip*, 2014, 14(19): 3773–3780.
- [15] Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(36): 13368–13373.
- [16] Sokolova V, Ludwig AK, Hornung S, et al. Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2011, 87(1): 146–150.
- [17] Zhang W, Ni M, Su Y, et al. MicroRNAs in serum exosomes as potential biomarkers in clear-cell renal cell carcinoma [J]. *Eur Urol Focus*, 2016, 10.14. [Epub ahead of print.]
- [18] Nilsson J, Skog J, Nordstrand A, et al. Prostate cancer-derived urine exosomes: a novel approach to biomarkers for prostate cancer[J]. *Br J Cancer*, 2009, 100(10): 1603–1607.
- [19] Russo L M, Bate K, Motamedinia P, et al. Urinary exosomes as a stable source of mRNA for prostate cancer analysis[J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30(5_suppl): 174.
- [20] Dijkstra S, Birker IL, Smit FP, et al. Prostate cancer biomarker profiles in urinary sediments and exosomes[J]. *J Urol*, 2014, 191(4): 1132–1138.
- [21] McKiernan J, Donovan MJ, O'Neill V, et al. A novel urine exosome gene expression assay to predict high-grade prostate cancer at initial biopsy [J]. *JAMA Oncol*, 2016, 2 (7): 882–889.
- [22] Royo F, Zuñiga-Garcia P, Torrano V, et al. Transcriptomic profiling of urine extracellular vesicles reveals alterations of CDH3 in prostate cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(6): 6835–6846.
- [23] Samsonov R, Shtam T, Burdakov V, et al. Lectin - induced agglutination method of urinary exosomes isolation followed by miRNA analysis: application for prostate cancer diagnostic[J]. *Prostate*, 2016, 76(1): 68–79.
- [24] Øverbye A, Skotland T, Koehler CJ, et al. Identification of prostate cancer biomarkers in urinary exosomes[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(30): 30357–30376.

- [25] Wang L, Skotland T, Berge V, et al. Exosomal proteins as prostate cancer biomarkers in urine: from mass spectrometry discovery to immunoassay-based validation[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2017, 98: 80–85.
- [26] Skotland T, Ekroos K, Kauhanen D, et al. Molecular lipid species in urinary exosomes as potential prostate cancer biomarkers[J]. *Eur J Cancer*, 2017, 70: 122–132.
- [27] Welton JL, Khanna S, Giles PJ, et al. Proteomic analysis of bladder cancer exosomes[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2010: mcp. M000063–MCP201.
- [28] Perez A, Loizaga A, Arceo R, et al. A pilot study on the potential of RNA-associated to urinary vesicles as a suitable non-invasive source for diagnostic purposes in bladder cancer[J]. *Cancers*, 2014, 6(1): 179–192.
- [29] Armstrong DA, Green BB, Seigne JD, et al. MicroRNA molecular profiling from matched tumor and bio-fluids in bladder cancer[J]. *Mol Cancer*, 2015, 14: 194.
- [30] Smalley DM, Sheman NE, Nelson K, et al. Isolation and identification of potential urinary microparticle biomarkers of bladder cancer[J]. *J Proteome Res*, 2008, 7(5): 2088–2096.
- [31] Chen CL, Lai YF, Tang P, et al. Comparative and targeted proteomic analyses of urinary microparticles from bladder cancer and hernia patients [J]. *J Proteome Res*, 2012, 11(12): 5611–5629.
- [32] Beckham CJ, Olsen J, Yin PN, et al. Bladder cancer exosomes contain EDIL-3/Del1 and facilitate cancer progression[J]. *J Urol*, 2014, 192(2): 583–592.
- [33] Franzen CA, Blackwell RH, Todorovic V, et al. Urothelial cells undergo epithelial-to-mesenchymal transition after exposure to muscle invasive bladder cancer exosomes[J]. *Oncogenesis*, 2015, 4(8): e163.
- [34] Zhao A, Péoch M, Cottier M, et al. Cell - free RNA content in urine as a possible molecular diagnostic tool for clear cell renal cell carcinoma[J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(11): 2610–2615.
- [35] Li G, Zhao A, Péoch M, et al. Detection of urinary cell-free miR-210 as a potential tool of liquid biopsy for clear cell renal cell carcinoma[J]. *Urol Oncol*, 2017, 35(5): 294–299.
- [36] Raimondo F, Morosi L, Corbetta S, et al. Differential protein profiling of renal cell carcinoma urinary exosomes[J]. *Mol Biosyst*, 2013, 9(6): 1220–1233.
- [37] Shtam TA, Kovalev RA, Varfolomeeva EY, et al. Exosomes are natural carriers of exogenous siRNA to human cells in vitro[J]. *Cell Commun Signal*, 2013, 11: 88.
- [38] Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin HF, et al. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes[J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(4): 341–345.
- [39] Ohno S, Takanashi M, Sudo K, et al. Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microRNA to breast cancer cells[J]. *Mol Ther*, 2013, 21(1): 185–191.
- [40] Greco KA, Franzen CA, Kuo PC, et al. PLK1 silencing in bladder cancer by siRNA delivered with exosomes [J]. *J Urol*, 2014, 191(4): e367–e368.
- [41] Tian Y, Li S, Song J, et al. A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(7): 2383–2390.
- [42] Malam Y, Loizidou M, Seifalian AM. Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2009, 30(11): 592–599.
- [43] Zhang Y, Luo CL, He BC, et al. Exosomes derived from IL-12-anchored renal cancer cells increase induction of specific antitumor response in vitro: a novel vaccine for renal cell carcinoma[J]. *Int J Oncol*, 2010, 36(1): 133–140.

《肿瘤学杂志》关于提交“作者投稿无学术不端行为承诺书”的申明

本刊已开通网上在线投稿系统(<http://www.chinaoncology.cn>), 作者登录网站后, 请在左上角选择《肿瘤学杂志》, 选中后进入首页, 首次投稿作者请先注册, 在完成稿件上传、作者信息填写等程序后, 请您在网站首页(<http://www.chinaoncology.cn>)“下载中心”栏中下载《肿瘤学杂志》的“作者投稿无学术不端行为承诺书文档”, 填写后 1 周内连同单位介绍信、基金证明复印件快递寄至本刊编辑部, 本刊确认收到上述材料后, 该文稿才能进入审稿编辑流程。