

IFN 治疗慢性丙型病毒性肝炎患者外周血单个核细胞 HCV 的变化

付丽娟, 吕淑兰, 程险峰, 王晓燕

付丽娟, 吕淑兰, 王晓燕, 哈尔滨医科大学附属第二医院传染科 黑龙江省哈尔滨市 150076
程险峰, 黑龙江省医院南岗分院 黑龙江省哈尔滨市 150001
付丽娟, 女, 1974-08-24 生, 黑龙江省哈尔滨市人, 汉族, 2001 年哈尔滨医科大学硕士研究生, 主要从事丙型病毒性肝炎的研究。
黑龙江省自然科学基金资助项目, No. GC02C159
项目负责人: 吕淑兰, 150076, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第二医院传染科。lijuan_fu_8@hotmail.com
电话: 0451-86605614
收稿日期: 2003-10-21 接受日期: 2003-12-16

Alterations of HCV in peripheral blood mononuclear cells from IFN-treated patients with chronic HCV RNA infection

Li-Juan Fu, Shu-Lan Lü, Xian-Feng Cheng, Xiao-Yan Wang

Li-Juan Fu, Shu-Lan Lü, Xiao-Yan Wang, Department of Infectious Diseases, The Second Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150076, Heilongjiang Province, China
Xian-Feng Cheng, Heilongjiang Provincial Hospital, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China
Supported by the Provincial Natural Science Foundation of Heilongjiang, No. GC02C159
Correspondence to: Dr. Shu-Lan Lü, Department of Infectious Diseases, The Second Hospital of Harbin Medical University, 456 Xuefu Street, Harbin 150076, Heilongjiang Province, China. lijuan_fu_8@hotmail.com
Received: 2003-10-21 Accepted: 2003-12-16

Abstract

AIM: To study HCV RNA and HCV protein expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and to evaluate the therapeutic efficacy of alpha 2b interferon on the treatment of HCV RNA in PBMC of patients with chronic hepatitis C.

METHODS: Fluorescence quantitative RT-PCR was used to detect the quantitation of HCV RNA in PBMC and plasma, and immunohistochemistry assay was applied to identify HCV NS3 protein expression in PBMC from 20 patients with chronic hepatitis C; Eight patients with chronic hepatitis C received IFN therapy (5 MU/d, three times/week for 16 weeks). HCV RNA load in plasma and PBMC was tested with a quantitative assay before and after treatment for 16 weeks and compared with that of the control. The data were analyzed by Wilcoxon 2-sample test and Fisher's exact test.

RESULTS: HCV RNA in plasma was found in 15 of 20 (75 %) chronic hepatitis C patients and in PBMC was found in 9 of 20 (45%) by fluorescence quantitative RT-PCR. HCV NS3 protein expression was found in 7 of 20 (35%) chronic hepatitis C patients by immunohistochemical assay. HCV RNA loads in PBMC was uncorrelated with those in plasma. In 8 patients, but there are significant differences of the decreasing of HCV-RNA loads in plasma and PBMC between before and after interferon treatment for 16 weeks ($^aP =$

0.0 017, $^bP = 0.0 059$). The loads of HCV in plasma and PBMC in patients were significantly lower than that of controls after interferon treatment for 16 weeks ($^cP = 0.0 042$, $^dP = 0.0 155$).

CONCLUSION: HCV can infect, replicate and express in PBMC. HCV RNA loads in PBMC is uncorrelated with those in plasma. HCV RNA in PBMC could be clean out by alpha 2b interferon treatment.

Fu LJ, Lü SL, Cheng XF, Wang XY. Alterations of HCV in peripheral blood mononuclear cells from IFN-treated patients with chronic HCV RNA infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3):610-613

摘要

目的: 应用荧光定量反转录多聚酶链反应技术(RT-PCR)及免疫组化技术研究慢性丙型病毒性肝炎患者外周血单个核细胞(PBMC)丙型肝炎病毒感染并评价干扰素对外周血单个核细胞中HCV的作用。

方法: 20 例慢性丙型病毒性肝炎患者血浆、PBMC 中的 HCV RNA 含量应用荧光定量 RT-PCR 检测, 应用免疫组化技术检测 HCV NS3 在 PBMC 中的表达; 荧光定量 RT-PCR 法检测 8 例血浆及 PBMC 均阳性患者接受 α -2b 干扰素治疗; 对照组 6 例血浆及 PBMC 荧光定量 RT-PCR 法检测均阳性, 未用干扰素治疗。比较治疗前后用药组与对照组血浆及 PBMC 中 HCV RNA 载量变化。应用双侧 Wilcoxon 秩和检验(wilcoxon 2-sample test), 确切概率法(fisher's exact test)进行分析。

结果: 20 例中荧光定量 RT-PCR 检出血浆 15 例、PBMC 9 例阳性; 免疫组化法检出 7 例 PBMC 阳性。应用确切概率法分析 PBMC 感染 HCV RNA 与血浆中病毒水平无相关性 ($P = 0.319$)。8 例患者接受干扰素治疗后其血浆及 PBMC 中 HCV RNA 载量均下降, 与治疗前相比有显著性差异 ($^aP = 0.0 017$, $^bP = 0.0 059$); 与对照组相比治疗后差异有显著性 ($^cP = 0.0 042$, $^dP = 0.0 155$)。

结论: PBMC 是丙型肝炎病毒肝外复制并表达的场所。PBMC 感染 HCV RNA 病毒载量与血浆病毒水平无关。干扰素对 PBMC 感染的 HCV RNA 有清除作用。

付丽娟, 吕淑兰, 程险峰, 王晓燕. IFN 治疗慢性丙型病毒性肝炎患者外周血单个核细胞 HCV 的变化. *世界华人消化杂志* 2004;12(3):610-613
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/610.asp>

0 引言

丙型肝炎是威胁人类健康的全球性疾病^[1-8], 50-70% 会导致慢性化, 最终发展致肝硬化^[9-11], 并与原发性肝癌的发病关系密切^[12-15]. 丙型肝炎病毒感染慢性化机制尚不清楚, 众多学者认为丙型肝炎病毒感染外周血单个核细胞、甲状腺、胰腺、骨髓、脑脊液、脾脏等肝外组织可能与其慢性化机制相关, 其中以感染外周血单个核细胞与其慢性化机制关系最为密切^[16-17]. 检测 PBMC 中 HCV RNA 正链及 HCV RNA 负链只表明 HCV-RNA 的存在, 不能说明病毒载量的变化. 因此我们应用荧光定量 RT-PCR 方法检测 PBMC 中 HCV RNA, 并对干扰素治疗前后病毒载量的变化进行分析, 从而进一步探讨 HCV-RNA 感染 PBMC 的意义.

1 材料和方法

1.1 材料 慢性丙型肝炎患者 20 例, 男 16 例, 女 4 例, 年龄 39.5 ± 16.5 岁. 诊断标准符合 2000-09 西安传染病与寄生虫病学术会议修订标准. 所有病例抗 HCV(+), ALT(160 ± 100 u/L), TBIL(12.3 ± 6.7 μ mol/L), 并排除其他类型肝炎, 无饮酒及服用肝损害药物史. 其中 8 例荧光定量 RT-PCR 法血浆及 PBMC 均阳性患者接受干扰素治疗, 5MU 隔日 1 次, 共 16 wk; 对照组 6 例血浆及 PBMC 均阳性, 未用干扰素治疗. 淋巴细胞分离液(购于中国医学科学院血液研究所)、Trizol 提取液(invitrogen 公司)、HCV 核酸扩增荧光检测试剂盒(购于达安公司)、NS3 mAb(购于北京病毒研究所)、SABC 免疫组化试剂盒(购于天津灏洋生物有限公司)、DAB 染色试剂盒(购于武汉博士德公司)、Roche LightCycler 荧光检测仪、高速离心机

1.2 方法 EDTA 抗凝静脉血 4 mL, 离心取血浆 0.5 mL 用于提取血浆 HCV-RNA, 剩余部分混匀应用淋巴细胞分离液梯度离心分离 PBMC. 生理盐水洗涤 2 次, 按文献^[18] 方法加胰酶及 RNA 酶以清除血浆 HCV RNA 污染. 洗涤定容 2 mL, 1 mL 用于滴片, 1 mL 离心沉淀用于 HCV RNA 提取. Trizol 提取液按说明操作提取 PBMC 总 RNA, 于无水乙醇中 -70 °C 冰箱保存. 两步法荧光定量试剂盒按说明操作, 荧光检测仪、软件定量分析. 琼脂糖凝胶电泳检测预期产物. 多聚赖氨酸预先处理玻片, PBMC 混悬液涂片, 丙酮固定, 双氧水甲醇溶液浸泡, 1 g/L Triton X-100 滴片, 抗 NS3mAb 滴片, 按 SABC 试剂盒、DAB 试剂盒说明操作. 设置正常对照、空白对照及 PBS 替代对照.

统计学处理 应用双侧 Wilcoxon 秩和检验(Wilcoxon 2-sample test), 确切概率法(fisher's exact test)进行数据分析.

2 结果

慢性丙型肝炎患者 20 例中荧光定量 RT-PCR 检出血浆 HCV 定量(4.42×10^5 - 1.05×10^{10} copy/L)15 例,

0 copy/L 5 例, 血浆阳性 15 例中 PBMC 检出 8 例(1.00×10^4 - 2.20×10^7 copy/L), 血浆阴性 5 例中 PBMC 检出 1 例(1.02×10^5 copy/L)并应用免疫组化法检测此例为阳性. 经统计分析 PBMC 中 HCV RNA 载量与血浆病毒水平无相关性($P=0.319$). 荧光定量 RT-PCR 检测血浆及 PBMC 均阳性 8 例患者接受干扰素治疗 16 wk 后其血浆及 PBMCs 中 HCV RNA 载量均下降, 与治疗前相比有显著性差异($^aP=0.0017$, $^bP=0.0059$), 与对照组相比治疗后血浆及 PBMC 中病毒载量差异有显著性($^cP=0.0042$, $^dP=0.00155$); 而血浆与 PBMC 中 HCV-RNA 载量评价干扰素疗效, 二者比较无显著性差.

应用免疫组化法检测 PBMC 中 HCVNS3 20 例阳性 7 例. 阳性产物成棕黄色, 细颗粒状, 不均匀或呈弥漫分布定位于胞质和胞膜(图 1、2).



图1 外周血单个核细胞免疫组化. HCV NS3 抗原阳性, 棕黄色物定位于胞质×400.

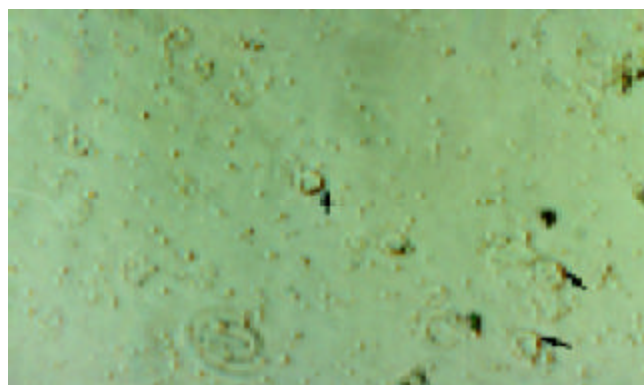


图2 外周血单个核细胞免疫组化. HCV NS3 抗原阳性, 棕黄色物定位于胞膜×400.

3 讨论

丙型肝炎是一种广泛威胁人类健康的疾病, 陈良标 et al^[18-21] 于 PBMC 中检测出完整病毒颗粒及 HCV-RNA 正负链, 表明 PBMC 是 HCV-RNA 肝外复制并表达的场所, HCV RNA 亦可在 PBMC 中持续存在^[22]. 但定性实验只能确定病毒的存在而不能对病毒复制的活跃程度进行分析, 因此我们应用荧光定量 RT-PCR 及免疫组化方法对 20 例慢性丙型肝炎患者进行检测. 其中血浆病毒载量检测出 75%, PBMC 检出 45%, 免疫

组化检出35%胞质及胞膜表达HCV NS3. 进一步证实丙型肝炎病毒可以感染慢性丙型肝炎患者外周血单个核细胞, 并在其中复制和表达. Meier et al^[23]认为是由于污染或被动吸附血浆中HCV RNA而导致PBMC检测HCV RNA阳性. 但是本实验经荧光定量RT-PCR检测血浆及PBMC中HCV RNA载量经Fisher's exact test, ($P=0.319$), 表明PBMC中HCV RNA与血浆载量无关. 本实验中1例患者血浆病毒载量为0copy/L, PBMC中检测出HCV RNA为(1.02×10^5 copy/L)并且免疫组化检出此例PBMC中HCV NS3表达阳性, 表明HCV RNA可独立感染慢性丙型肝炎患者外周血PBMC. 同时我们发现检测PBMC感染HCV RNA荧光定量RT-PCR法与免疫组化法灵敏度相比无显著性差异, 但荧光定量RT-PCR法操作简便、节省时间更适用于临床应用.

干扰素治疗慢性丙型肝炎现已被公认为是较为有效的药物, 临床已应用于检测血浆病毒载量作为评价干扰素疗效的指标之一. 本实验采用荧光定量RT-PCR检测干扰素治疗(16 wk)前后PBMC中及血浆中HCV-RNA病毒载量变化. 结果干扰素治疗后血浆及PBMC中病毒含量均有下降, 与治疗前及对照组相比有显著性差异, 表明干扰素对于PBMC内的HCV-RNA也有清除作用^[24-25]. 有研究表明慢性丙型肝炎患者PBMC感染HCV使CD4细胞比例减低, CD4/CD8比值降低甚至倒置^[26], 从而影响机体细胞免疫机制, HCV RNA感染亦可引起机体细胞因子(IL, TNF等)失调, 使机体清除病毒能力降低, 导致病毒持续感染^[27]. 而干扰素具有抗病毒和调节免疫双重功能, 探讨干扰素对慢性丙型肝炎患者外周血PBMC中HCV RNA清除的机制: (1)有研究表明干扰素可使CD4细胞增多从而增强机体的细胞免疫反应, 促使分泌IL-2、 γ -IFN增加、IL-12降低, 从而增强了Th2细胞效应提高机体的抗病毒能力^[28-30]. (2)干扰素可诱导PBMC双链RNA激活蛋白酶(PKR)mRNA及MxAmRNA表达生成抗病毒蛋白清除HCV RNA^[31]. 本实验表明监测PBMC中HCV-RNA载量可作为评价干扰素治疗效果指标之一, 因有报道复发病例中HCV RNA再现于PBMC中比血浆中早, 故亦可作为干扰素治疗后复发的监测指标^[32]. 但HCV RNA感染PBMC对于干扰素治疗效果的影响尚需结合病毒基因型、HCV-RNA水平、及HCV变异株等进一步研究^[33-34].

总之, 应用荧光定量RT-PCR方法可证实HCV RNA可感染PBMC, 与免疫组化方法相比敏感性无差异, 但更适用于临床应用. 虽然应用荧光定量RT-PCR方法证实干扰素对PBMC中感染的HCV RNA有近期的清除作用, 但对远期的治疗效果尚需进一步随访观察.

4 参考文献

- Sherriff LC, Mayon-White RT. A survey of hepatitis C prevalence amongst the homeless community of Oxford. *J Public Health Med* 2003;25:358-361
- Nagao Y, Tanaka K, Kobayashi K, Kumashiro R, Sata M. Analysis of approach to therapy for chronic liver disease in an HCV hyperendemic area of Japan. *Hepatol Res* 2004;28:30-35
- Fleckenstein J. Chronic hepatitis C in African Americans and other minority groups. *Curr Gastroenterol Rep* 2004;6:66-70
- Poynard T, Yuen MF, Ratzin V, Lai CL. Viral hepatitis C. *Lancet* 2003;362:2095-2100
- Mohan P, Chandra RS, Kleiner DE, Luban NL. An unusual presentation of perinatally transmitted hepatitis C. *Arch Dis Child* 2003;88:160-161
- Zoulim F, Chevallier M, Maynard M, Trepo C. Clinical consequences of hepatitis C virus infection. *Rev Med Virol* 2003;13:57-68
- Strickland GT, Elhefni H, Salman T, Waked I, Abdel-Hamid M, Mikhail NN, Esmat G, Fix A. Role of hepatitis C infection in chronic liver disease in Egypt. *Am J Trop Med Hyg* 2002;67:436-442
- Laufs R, Polywka S, Feucht HH, Schroter M, Zollner B, Oehler G. Hepatitis C. Virology, transmission modes, clinical aspects, prevention and therapy. *Anaesthesist* 2002;51:884-889
- Chopra KB, Demetris AJ, Blakolmer K, Dvorchik I, Laskus T, Wang LF, Araya VR, Dodson F, Fung JJ, Rakela J, Vargas HE. Progression of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C after orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 2003;76:1487-1491
- Puoti C, Castellacci R, Bellis L, Montagnese R, Corvisieri P, Festuccia P, Mellozzi M, Villani AR. Hepatitis C virus RNA quantitation in hepatic veins and peripheral blood in patients with liver cirrhosis: evidence for low level intrahepatic hepatitis C virus replication in advanced liver disease. *Dig Liver Dis* 2002;34:802-807
- Costa LB, Ferraz ML, Perez RM, Ferreira AS, Matos CA, Lanzoni VP, Silva AE. Effect of host-related factors on the intensity of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Braz J Infect Dis* 2002;6:219-224
- Nagao Y, Tanaka K, Kobayashi K, Kumashiro R, Sata M. A cohort study of chronic liver disease in an HCV hyperendemic area of Japan: a prospective analysis for 12 years. *Int J Mol Med* 2004;13:257-265
- Street A, Macdonald A, Crowder K, Harris M. The hepatitis C virus NS5A protein activates a phosphoinositide 3-kinase dependent survival signalling cascade. *J Biol Chem* 2004;5
- Ebara M, Fukuda H, Hatano R, Yoshikawa M, Sugiura N, Saisho H, Kondo F, Yukawa M. Metal contents in the liver of patients with chronic liver disease caused by hepatitis C virus. Reference to hepatocellular carcinoma. *Oncology* 2003;65:323-330
- Persico M, Palmentieri B, Coppola L, Di Giacomo Russo G, De Marino F, De Sio I, Torella R. Occurrence of HCC in asymptomatic HCV-related chronic hepatitis. *Dig Dis Sci* 2002;47:2407-2410
- Laskus T, Radkowsky M, Bednarska A, Wilkinson J, Adair D, Nowicki M, Nikolopoulou GB, Vargas H, Rakela J. Detection and analysis of hepatitis C virus sequences in cerebrospinal fluid. *J Virol* 2002;76:10064-10068
- Li CP, Wang KX, Wang J, Pan BR. mL-2R, T cell subsets & hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2002;8:298-300
- 安萍, 陈良标, 田惠英, 陈佩兰, 李琳, 刘超英. 慢性丙型肝炎患者外周血单个核细胞丙型肝炎病毒检测及其意义. *中华内科杂志* 1999;11:737-739
- Gong GZ, Lai LY, Jiang YF, He Y, Su XS. HCV replication in PBMC and its influence on interferon therapy. *World J Gastroenterol* 2003;9:291-294
- 陈良标, 陈佩兰, 安萍, 田惠英, 刘英超, 李琳. 慢性丙型肝炎患者外周血单个核细胞丙型肝炎病毒感染研究. *中华肝病杂志* 2000;5:266-268
- Mazur W, Mazurek U, Jurzak M, Wilczok T, Bulanowski Z, Gonciarz Z. Positive and negative strands of HCV-RNA in sera and peripheral blood mononuclear cells of chronically hemodialyzed patients. *Med Sci Monit* 2001;7: 108-115
- Chen L, Chen P, Fan G, Li L, Liu C. Localization of hepatitis C

- virus core protein in the nucleus of peripheral blood mononuclear cells of hepatitis C patients. *Zhonghua Shiyen He Linchuang Bingduxue Zazhi* 2002;16:37-39
- 23 Meier V, Mihm S, Braun Wietzke P, Ramadori G. HCV-RNA positivity in peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic HCV infection: does it really mean viral replication? *World J Gastroenterol* 2001;7:228-234
 - 24 Asahina Y, Izumi N, Uchihara M, Noguchi O, Tsuchiya K, Hamano K, Kanazawa N, Itakura J, Miyake S, Sakai T. A potent antiviral effect on hepatitis C viral dynamics in serum and peripheral blood mononuclear cells during combination therapy with high-dose daily interferon alfa plus ribavirin and intravenous twice-daily treatment with interferon beta. *Hepatology* 2001;34:377-384
 - 25 Trimoulet P, Bernard PH, de Ledinghen V, Oui B, Chene G, Saint-Marc Girardin MF, Dantin S, Couzigou P, Fleury H. Quantitation of hepatitis C virus RNA in plasma and peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic hepatitis treated with interferon-alpha. *Dig Dis Sci* 2000;45:175-181
 - 26 Wozniakowska-Gesicka T, Wisniewska-Ligier M, Kups J, Borowska-Rybus B, Sulat-Syncerek D, Grzegorzczak W. Influence of interferon-alpha therapy on the count and function of T lymphocytes in children with chronic hepatitis C. *Pol Merkuriusz Lek* 2001;11:344-347
 - 27 Jia HY, Du J, Zhu SH, Ma YJ, Chen HY, Yang BS, Cai HF. The roles of serum IL-18, IL-10, TNF-alpha and sIL-2R in patients with chronic hepatitis C. *Hepatobil Pancreat Dis Int* 2002; 1:378-382
 - 28 Piazzolla G, Tortorella C, Fiore G, Fanelli M, Pisconti A, Antonaci S. Interleukin-12 p40/p70 ratio and in vivo responsiveness to IFN-alpha treatment in chronic hepatitis C. *J Interferon Cytokine Res* 2001;21:453-461
 - 29 Jia H, Du J, Zhu S, Ma Y, Cai H. Clinical observation of serum IL-18, IL-10 and sIL-2R levels in patients with chronic hepatitis C pre- and post antiviral treatment. *Chin Med J (Engl)* 2003;116:605-608
 - 30 Mazur W, Mazurek U, Jurzak M, Wilczok T, Gonciarz M, Gonciarz Z. Short-term changes of serum IL-2 and IL-6 induced by interferon alpha-2b in patients with chronic hepatitis C. *Med Sci Monit* 2001;7(Suppl 1):151-156
 - 31 Asahina Y, Izumi N, Uchihara M, Noguchi O, Nishimura Y, Inoue K, Ueda K, Tsuchiya K, Hamano K, Itakura J, Miyake S. Interferon-stimulated gene expression and hepatitis C viral dynamics during different interferon regimens. *J Hepatol* 2003; 39:421-427
 - 32 Trimoulet P, Bernard PH, de Ledinghen V, Oui B, Chene G, Saint-Marc Girardin MF, Dantin S, Couzigou P, Fleury H. Quantitation of hepatitis C virus RNA in plasma and peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic hepatitis treated with interferon-alpha. *Dig Dis Sci* 2000;45:175-181
 - 33 张琳, 赵桂珍, 石理兰, 曹丽. 丙型肝炎病毒 NS5A 基因变异与干扰素疗效的关系. *世界华人消化杂志* 2003;11:1135-1138
 - 34 张琳, 赵桂珍, 李颖, 石理兰. 慢性丙型肝炎患者干扰素治疗前后 HCV HVR1 准种的动态变化. *世界华人消化杂志* 2003;11:182-184

World Journal of Gastroenterology 稿件来源及论文资助情况

随着我国科学研究整体水平的提高, 质量较高的论文逐年增加, 来自名牌大学、研究院所, 特别是具有良好科学记录的实验室、课题组和科学家的论文增长幅度较大. 2003-04-01/2003-10-01 以来《World Journal of Gastroenterology, WJG》共收到论文 618 篇, 其中国内论文 501 篇(81.06%), 国际论文 117 篇(18.93%). WJG 2003 年 1-10 期共发表论文 521 篇, 其中文献综述 21 篇, 食管癌 27 篇, 胃癌 54 篇, 肝癌 65 篇, 大肠癌 39 篇, 病毒性肝炎 46 篇, 幽门螺杆菌 20 篇, 基础研究 115 篇, 临床研究 62 篇, 研究快报 62 篇, 病例报告 8 篇, 读者来信 2 篇. 发表国内论文 450 篇(86.37%), 发表国际论文 71 篇(13.62%). 作者共 2949 人, 国际作者占 14.41%, 国内作者占 85.90%. 发表论文分布 34 个国家和地区, 包括阿根廷、澳大利亚、巴基斯坦、巴西、比利时、波兰、丹麦、德国、法国、芬兰、韩国、荷兰、加拿大、克罗地亚、美国、南非、南斯拉夫、日本、瑞典、瑞士、沙特阿拉伯、泰国、土耳其、西班牙、希腊、新加坡、匈牙利、伊朗、意大利、印度、英国、中国、中国台湾、中国香港. 基金资助论文 292 篇(56.04%), 各项目基金论文共 440 篇(84.45%), 其中国际基金论文 25 篇(4.79%), 国家 973、863、国家自然科学基金资助论文 180 篇(34.54%), 部、省级基金资助论文 235 篇(45.10%). WJG 2002 年共发表论文 226 篇, 分布为 26 个地区, 国内论文占 93.36%, 国际论文占 6.63%, 基金论文占 60.61%. WJG 2001 年共发表论文 173 篇, 分布 20 个地区, 112 个机构, 国际论文占 35%, 基金论文占 55%. WJG 2000 年共发表论文 205 篇, 基金论文占 50%. WJG 1999 年共发表论文 144 篇, 分布 20 个地区, 100 个机构, 国际论文占 23%, 基金论文占 50%. WJG 1998 年共发表论文 183 篇, 11 个地区分布, 国际论文占 9.84%, 基金论文占 59.56%.