

# 原代培养大鼠肝细胞的基因转染

何 勇, 周 峻, 窦科峰, 陈 勇

何勇, 窦科峰, 陈勇, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科 陕西省西安市 710032  
周峻, 中国人民解放军第四军医大学秦都医院病理科 陕西省西安市 710032  
何勇, 男, 1968-09-27 生, 辽宁省海城市人, 汉族, 医学博士, 讲师, 主治医师。  
国家自然科学基金资助, No. 30170927, No. 30070210  
项目负责人: 何勇, 710032, 陕西省西安市长乐西路 127 号, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科。 heyong007@yahoo.com  
电话: 029-83375259 传真: 029-83244986  
收稿日期: 2003-03-08 接受日期: 2003-04-05

## Gene transfection for rat primary cultured hepatocytes

Yong He, Jun Zhou, Ke-Feng Dou, Yong Chen

Yong He, Ke-Feng Dou, Yong Chen, Department of Hepatobiliary Surgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China  
Jun Zhou, Department of Pathology, Qindu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China  
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30170927, No. 30070210  
Correspondence to: Dr. Yong He, 127 Changle West Road, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China. heyong007@yahoo.com  
Received: 2003-03-08 Accepted: 2003-04-05

## Abstract

AIM: To study the efficient and stable gene transfection method of rat primary cultured hepatocytes by liposome.

METHODS: Rat hepatocytes were isolated by collagenase perfusion, and the pEGFP-N<sub>3</sub> plasmid containing GFP and Neo gene was transfected into rat primary hepatocyte with liposome. The expression of GFP and Neo was observed by fluorescence microscopy and *in situ* hybridization.

RESULTS: The rate of live hepatocytes obtained was 95%. Under fluorescence microscope, hepatocyte transfected with pEGFP-N<sub>3</sub> plasmid showed green fluorescence. By using *in situ* hybridization method, expression of Neo gene was observed in hepatocyte transfected with pEGFP-N<sub>3</sub>.

CONCLUSION: Rat hepatocyte can be transfected by pEGFP-N<sub>3</sub>. pEGFP-N<sub>3</sub> expression vector and makes it easy to assess the expression of target gene in transfected hepatocyte, and it can be used for localization of transplanted hepatocyte.

He Y, Zhou J, Dou KF, Chen Y. Gene transfection for rat primary cultured hepatocytes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3):642-645

## 摘要

目的: 研究原代培养大鼠肝细胞的基因转染的方法。

方法: 采用胶原酶灌注法获取原代培养大鼠肝细胞。利用脂质体转染法将含有绿色荧光蛋白(GFP)和Neo基因的真核细

胞表达载体(pEGFP-N<sub>3</sub>)转染原代培养大鼠肝细胞。用荧光显微镜观察和Neo基因原位杂交染色方法检测肝细胞内基因表达情况。

结果: 获取的原代大鼠肝细胞活细胞率达95%。荧光显微镜下观察可见转染基因的细胞可发出绿色荧光, 原位杂交显示有Neo基因的表达。

结论: pEGFP-N<sub>3</sub>基因可转入大鼠肝细胞并获得表达, 可用于标记原代培养的大鼠肝细胞, 有利于研究肝细胞移植后移植的肝细胞在体内的分布及功能。

何勇, 周峻, 窦科峰, 陈勇. 原代培养大鼠肝细胞的基因转染. 世界华人消化杂志 2004;12(3):642-645

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/642.asp>

## 0 引言

我们在建立一个肝细胞原代培养系统的基础上, 转染携带Neo基因和GFP基因的真核细胞表达载体, 并观察标记基因在肝细胞内的表达。

## 1 材料和方法

1.1 材料 ♂ 幼龄 Sprage-Dawley 大鼠(第四军医大学实验动物中心), 体质量 180-220 g, 普通块料喂养, 随意饮水, 室温 18-22 °C, 每日光照 12-14 h, 术前禁食 12 h。IV型胶原酶、地塞米松、胰岛素及 HGF 为 Sigma 公司产品; RPMI1640 培养基为 Gibco 公司产品。参照 Seglen (Exp Cell Res 1972;74:450)的方法进行肝细胞的分离纯化并作了部分改进。大鼠用 20 g/L 戊巴比妥钠溶液腹腔注射麻醉(30 mg/kg), 同时腹腔内注射肝素钠溶液 200 U。消毒皮肤后, 取正中切口进入腹腔。显露门静脉后在距肝门 2 cm 处插入 18 号导管, 导管与一次性输血器相接, 后者连接输液瓶, 先以 30 mL/min 的速度输注无钙镁的 Hanks 液(含 EDTA 1 mmol/L)200 mL, 夹闭肝上下腔静脉, 在肝下腔静脉插入 16 号导管放出积血积液, 再输注含 0.5 g/L IV型胶原酶的 Hanks 液 100 mL, 输注速度为 15 mL/min, 取下肝脏, 置于含 4 °C Hanks 液的平皿中, 去除肝包膜及血管, 钝性撕裂肝组织, 多层纱布过滤, 制成细胞悬液, 将此悬液以 100 目及 200 目不锈钢网过滤, 以 500 r/min 离心 2 min, 弃上清, 以 4 °C Hank 液清洗并离心 3 次, 用 4g/L 台盼蓝进行染色判断细胞活率, 用血细胞计数板计数细胞浓度并计算细胞产量。将分离、纯化的肝细

胞用合成培养基(含 RPMI1640 80 mL, 新生小牛血清 20 mL, HGF 5  $\mu\text{g/L}$ , 地塞米松  $10^{-7}$  mol/L, 牛胰岛素  $10^{-8}$  mol/L, 青霉素 100 kU/L, 链霉素 100 kU/L)稀释成  $0.5 \times 10^6/\text{L}$ , 在  $37^\circ\text{C}$ , 50 mL/L  $\text{CO}_2$  条件下培养, 每 24 h 更换培养基 1 次, 每天在倒置相差显微镜下观察细胞生长情况。

1.2 方法 采用脂质体介导的基因转染法, 脂质体为 Gibco 公司的 lipofectamine2000, 真核细胞表达质粒 pEGFP-N<sub>3</sub> 含有 Neo 基因和 GFP 基因两个标记基因。取 pEGFP-HGF 质粒 2  $\mu\text{g}$ , lipofectamine 12  $\mu\text{L}$ , 与适量无血清无抗生素的 RPMI1640 在室温下混合摇匀成转染液。取在 35 mm 培养皿中(培养皿中铺有盖玻片)培养生长 3 d 的肝细胞, 吸去培养液, 先用无血清无抗生素的 RPMI1640 将待转染细胞洗 2 遍, 再加入转染液, 转染 6 h 后更换成新鲜的含 200 mL/L 小牛血清的 RPMI1640 培养液继续培养。1 次/d, 重复转染 4 次。基因表达情况的检测: (1) GFP 蛋白表达的检测用 PBS 洗细胞铺片 2 次, 40 g/L 多聚甲醛(PBS 配制)室温固定 30 min, PBS 振洗, 在荧光显微镜下, 488 nm 激发波长下观察, 表达 GFP 的细胞发绿色荧光。(2) Neo 基因表达检测细胞铺片经 3 mL/L Triton X-100/PBS, 0.2 mol/L HCl 及蛋白酶 K 处理, 2 mL/L 甘氨酸终止反应, 40 mL/L PFA 后固定, 梯度酒精脱水干燥。滴加热变性后经地高辛标记的 Neo 探针,  $42^\circ\text{C}$  杂交过夜, 分别用  $2 \times \text{SSC}$ ,  $1 \times \text{SSC}$ ,  $0.5 \times \text{SSC}$  充分漂洗, 20 mL/L 正常羊血清封闭, 滴加标记碱性磷酸酶抗地高辛抗体(anti-Dig-AP, 1:100),  $37^\circ\text{C}$  温育 2 h, Buffer I, Buffer III 充分漂洗后 NBT/BCIP 暗处显色 24 h, TE 终止反应, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明封片。

## 2 结果

2.1 肝细胞的分离和培养 采用胶原酶灌注法, 每只大鼠(体质量 180-220 g)的肝脏大约可分离出  $2 \times 10^8$  个肝细胞, 活细胞率在 95% 以上。新鲜分离的肝细胞在显微镜下呈单个分散状态, 为具有立体感的圆球形, 晶莹剔透, 体积上大小一致, 整个细胞透明无色。培养 3 h 后, 绝大多数细胞贴壁生长, 培养 24 h 后细胞由球形变扁变薄呈多边形, 胞质均匀, 核清晰, 以双核细胞为主, 并以多个细胞聚集成簇排列, 3 d 后细胞逐渐生长融合形成单层膜状。

2.2 基因转染后标记基因的表达 经 Dig 标记的 Neo 探针原位杂交结果显示, 在转染基因的细胞中均有较强的紫蓝色颗粒样 Neo 基因阳性杂交信号(图 1), 而对照组肝细胞中无 Neo 基因表达杂交信号, 即为阴性表达。经基因转染的肝细胞爬片在荧光显微镜下观察, 可发现细胞表达 GFP, 表现为细胞发出明亮的绿色荧光, 这些细胞多成对出现, 或数个发光细胞聚在一起(图 2)。此外, 还可见到个别发出弱绿色荧光的细胞。未转染基因的肝细胞中未见绿色荧光。

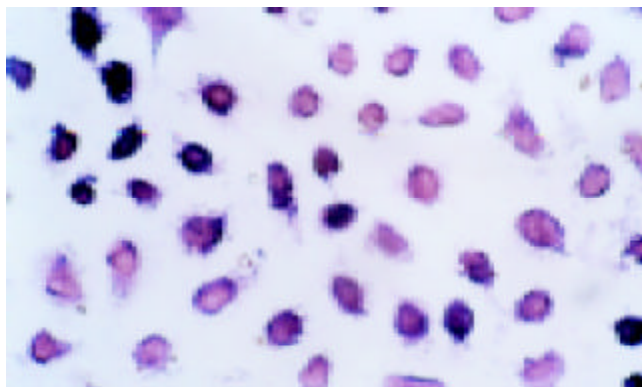


图 1 在基因转染的肝细胞中有紫蓝色颗粒样 Neo 基因阳性信号(原位杂交 100  $\times$ )。

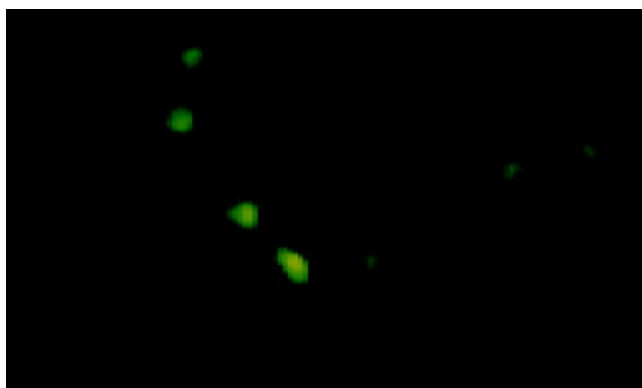


图 2 基因转染的肝细胞中可见绿色荧光(荧光显微镜 100  $\times$ )。

## 3 讨论

目前有多种方法可用于分离肝细胞<sup>[1-10]</sup>, 直接法是通过挤压、剪碎和振荡等机械手段, 使肝细胞从肝组织脱落而获得, 操作时间较长, 加之机械损伤, 其肝细胞收获量和细胞成活率均远远低于 Seglen 灌注法。我们采用经过改进的灌注法获得的肝细胞纯度达 95% 以上, 减少了非实质细胞的污染, 有利于细胞在体外培养并进行各种研究。

肝细胞移植是替代肝移植治疗各种原因引起肝功能衰竭的疗法<sup>[11-18]</sup>。肝细胞可经多途径注射至体内, 在合适的环境下植入肝细胞表达肝脏特异性功能。由于缺乏移植的肝细胞标记, 因此无法判断移植后肝细胞在体内的分布, 无法确定植入后肝细胞功能与疗效的关系。随着分子生物学技术的不断发展, 细胞标记基因的产生使肝细胞移植可采用基因标记肝细胞, 以便于追踪研究移植细胞的生物学特性。肝脏活体外基因治疗的基本方法是首先获得原代肝细胞, 进行体外培养, 并选用靶基因进行体外转染, 再将表达靶基因的肝细胞移植到受体体内<sup>[19-26]</sup>。另外肝细胞移植也需要带有标记基因的肝细胞以研究肝细胞在体内的分布情况等。我们通过脂质体介导的基因转染法, 将含有 Neo 基因和 GFP 基因两个标记基因的真核细胞表达载体转导入原代培养的肝细胞。通过 Neo 基因原位杂交、荧光显微镜观察的方法证实标记基因都获得了表达, 这也充分证实基因

转染获得了成功. 我们所选择的 pEGFP-N<sub>3</sub> 载体中带有绿色荧光蛋白(GFP)序列, GFP 可用与活体、原位、即时的检测基因表达及蛋白定位. GFP 非常稳定, 不依赖于物种, 对活细胞没有伤害性. 而且 GFP 荧光在甲醛固定的细胞中能维持很长时间, 很适于和其他荧光标记进行双标实验. 这种新型的报告分子在暴露于紫外线后即可发出明亮的绿色荧光, 因而, pEGFP-N<sub>3</sub> 常被用于检测细胞中 GFP 融合蛋白的表达情况及蛋白定位<sup>[27-40]</sup>. 本研究表明脂质体介导的基因转染法可用于体外肝细胞转染, 而可作为标记基因标记移植的肝细胞, 有利于研究肝细胞移植后移植的细胞在体内的分布、寿命和功能等情况, 为肝细胞移植<sup>[41-42]</sup>治疗急性肝衰<sup>[43-49]</sup>提供了实验基础.

#### 4 参考文献

- 张颖, 白雪帆, 黄长形, 吴军正. 肝细胞体外培养技术的研究现状. 世界华人消化杂志 2002;10:343-345
- Wang YJ, Wang YM, Li MD. Morphology and function of cultured human fetal hepatocytes. *Xin Xiaohuabingxue Zazhi* 1997;5:291-292
- 王宇明, 陈耀凯. 肝干细胞的研究进展. 世界华人消化杂志 2002;10:337-342
- 于聪慧, 冷希圣, 魏玉华, 刘继超, 杜如昱. 微囊内残余海藻酸钠对微囊化大鼠肝细胞功能的影响. 世界华人消化杂志 2000;8:1052-1053
- Li XQ, Zeng MX, Ling QH. Effects of interferon  $\alpha$  on DNA synthesis and collagen production of cultured rat hepatocytes. *Huaren Xiaohua Zazhi* 1998;6:488-490
- Yao D, Li DG, Cheng F, He TY, Xu QF. Expression of type I and II procollagen mRNAs in rat hepatocytes with or without platelet derived growth factor. *Huaren Xiaohua Zazhi* 1998;6:300-302
- Han JQ, Hu C, Liu SX, Xiu HM, Xu Z, Hu DR. The mechanism of the Chinese herbal compound in protecting hepatocyte in vitro. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:902-906
- 李璟, 温博贵, 陈爱云, 吴健宜, 李冠武. 四氯化碳中毒大鼠肝细胞核基质蛋白的变化. 世界华人消化杂志 2001;9:844-845
- Donini A, Baccarani U, Piccolo G, Lavaroni S, D'Alti V, Cautero N, Risaliti A, Degraffi A, Scalamogna M, Bresadola F. Hepatocyte isolation using human livers discarded from transplantation: analysis of cell yield and function. *Transplant Proc* 2001;33:654-655
- Kobayashi N, Westerman KA, Taguchi T, Sakaguchi M, Fujiwara T, Urata H, Kishimoto N, Hayashi N, Nakaji S, Murakami T, Leboulch P, Tanaka N. Expansion of human hepatocyte populations by a retroviral gene transfer of simian virus 40 large T antigen. *ASAIO J* 2001; 47: 481-485
- 王悍, 滕皋军. 肝细胞移植技术新进展. 世界华人消化杂志 2002;10:966-968
- Zhang WJ, Gong NQ, Li JW, Ma XX, Zhuo LQ, Guo H, Li GS. Treatment of acute hepatic failure by transplantation of microencapsulated xenogenic hepatocyte. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:1396-1398
- Zhang L, Mi J, Yu Y, Yao H, Chen H, Li M, Cao X. IFN- $\gamma$  gene therapy by intrasplenic hepatocyte transplantation: a novel strategy for reversing hepatic fibrosis in *Schistosoma japonicum*-infected mice. *Parasite Immunol* 2001;23:11-17
- Ahmad TA, Fujioka H, Eguchi S, Yanaga K, Kamohara Y, Furui J, Kanematsu T. Long-term effect of hepatocyte transplantation on fulminant hepatic failure in rats. *Hepatogastroenterology* 2003;50:467-471
- Ambrosino G, Varotto S, Basso SM, Cecchetto A, Carraro P, Naso A, De Silvestro G, Plebani M, Abatangelo G, Donato D, Cestroni A, Giron G, D'Amico DF. Hepatocyte transplantation in the treatment of acute liver failure: microencapsulated hepatocytes versus hepatocytes attached to an autologous biomatrix. *Cell Transplant* 2003;12:43-49
- Gupta S. Hepatocyte transplantation. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17(Suppl 3):S287-S293
- Gupta S, Chowdhury JR. Therapeutic potential of hepatocyte transplantation. *Semin Cell Dev Biol* 2002;13:439-446
- Ohashi K, Park F, Kay MA. Hepatocyte transplantation: clinical and experimental application. *J Mol Med* 2001;79:617-630
- Liao D, Xie Q, Zhou XQ, Qian SB, Chen SS, Li DG. Retrovirus mediated transduction of primary rat hepatocyte. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:586-589
- Van Rosenberg SM, Sliedregt-Bol KM, Koning G, Van Den Elst H, Van Berkel TJ, Van Boom JH, Van Der Marel GA, Biessen EA. Improvement of hepatocyte-specific gene expression by a targeted colchicine prodrug. *ChemBiochem* 2003;4:633-639
- Borlak J, Dangers M, Thum T. Aroclor 1254 modulates gene expression of nuclear transcription factors: implications for albumin gene transcription and protein synthesis in rat hepatocyte cultures. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002;181:79-88
- Tzanakakis ES, Waxman DJ, Hansen LK, Remmel RP, Hu WS. Long-term enhancement of cytochrome P450 2B1/2 expression in rat hepatocyte spheroids through adenovirus-mediated gene transfer. *Cell Biol Toxicol* 2002;18:13-27
- Park SW, Lee HK, Kim TG, Yoon SK, Paik SY. Hepatocyte-specific gene expression by baculovirus pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;289:444-450
- Kobayashi N, Noguchi H, Totsugawa T, Watanabe T, Matsumura T, Fujiwara T, Miyazaki M, Fukaya K, Namba M, Tanaka N. Insertion of a suicide gene into an immortalized human hepatocyte cell line. *Cell Transplant* 2001;10:373-376
- Guha C, Roy-Chowdhury N, Jauregui H, Roy-Chowdhury J. Hepatocyte-based gene therapy. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2001;8:51-57
- Lewin M, Clement O, Belguise-Valladier P, Tran L, Cuenod CA, Siauve N, Frija G. Hepatocyte targeting with Gd-EOB-DTPA: potential application for gene therapy. *Invest Radiol* 2001;36:9-14
- He Y, Zhou J, Dou KF. Construction of hepatocyte growth factor expression vector and detection of expression in human hepatocytes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1143-1146
- Cheng H, Liu YF, Zhang HZ, Shen WA, Zhang SZ. Construction and expression of anti-HCC immunotoxin of sFv-TNF- $\alpha$  and GFP fusion proteins. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:640-644
- Lin T, Ding J, Meng FP, Han QL, Yu ZC, Guo CC, Liu ZG, Fan DM. Construction and identification of recombinant adenovirus vaccines of gastric cancer MG7-Ag mimotope. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11:14-17
- Fujikawa T, Hirose T, Fujii H, Oe S, Yasuchika K, Azuma H, Yamaoka Y. Purification of adult hepatic progenitor cells using green fluorescent protein(GFP)-transgenic mice and fluorescence-activated cell sorting. *J Hepatol* 2003;39:162-170
- Scarff KL, Ung KS, Sun J, Bird PI. A retained selection cassette increases reporter gene expression without affecting tissue distribution in SPI3 knockout/GFP knock-in mice. *Genesis* 2003;36:149-157
- Waldo GS. Improving protein folding efficiency by directed evolution using the GFP folding reporter. *Methods Mol Biol* 2003;230:343-359
- Nakanishi H, Mochizuki Y, Kodaera Y, Ito S, Yamamura Y, Ito K, Akiyama S, Nakao A, Tatamatsu M. Chemosensitivity of peritoneal micrometastases as evaluated using a green fluorescence protein (GFP)-tagged human gastric cancer cell line. *Cancer Sci* 2003;94:112-118
- Jockusch H, Voigt S, Eberhard D. Localization of GFP in fro-

- zen sections from unfixed mouse tissues: immobilization of a highly soluble marker protein by formaldehyde vapor. *J Histochem Cytochem* 2003;51:401-404
- 35 Luby-Phelps K, Ning G, Fogerty J, Besharse JC. Visualization of identified GFP- expressing cells by light and electron microscopy. *J Histochem Cytochem* 2003;51:271-274
  - 36 Ahmed F, Wyckoff J, Lin EY, Wang W, Wang Y, Hennighausen L, Miyazaki J, Jones J, Pollard JW, Condeelis JS, Segall JE. GFP expression in the mammary gland for imaging of mammary tumor cells in transgenic mice. *Cancer Res* 2002;62:7166-7169
  - 37 Dunder M, McNally JG, Cohen J, Misteli T. Quantitation of GFP-fusion proteins in single living cells. *J Struct Biol* 2002;140:92-99
  - 38 Patterson GH, Lippincott-Schwartz J. A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells. *Science* 2002;297:1873-1877
  - 39 Rodgers W. Making membranes green: construction and characterization of GFP-fusion proteins targeted to discrete plasma membrane domains. *Biotechniques* 2002;32:1044-1046
  - 40 Takenaka Y, Haga N, Harumoto T, Matsuura T, Mitsui Y. Transformation of *Paramecium caudatum* with a novel expression vector harboring codon-optimized GFP gene. *Gene* 2002; 284:233-240
  - 41 Tang NH, Chen YL, Wang XQ, Li XJ, Yin FZ, Wang XZ. Construction of IL-2 gene- modified human hepatocyte and its cultivation with microcarrier. *World J Gastroenterol* 2003;9:79-83
  - 42 Ouyang EC, Wu CH, Walton C, Promrat K, Wu GY. Transplantation of human hepatocytes into tolerized genetically immunocompetent rats. *World J Gastroenterol* 2001;7:324-330
  - 43 Pan BR, Yang SF, Ma LS. Acute liver failure: a progress report. *China Nati J New Gastroenterol* 1995;1:4-8
  - 44 Xue YL, Zhao SF, Luo Y, Li XJ, Duan ZP, Chen XP, Li WG, Huang XQ, Li YL, Cui X, Zhong DG, Zhang ZY, Huang ZQ. TECA hybrid artificial liver support system in treatment of acute liver failure. *World J Gastroenterol* 2001;7:826-829
  - 45 Chen XP, Xue YL, Li XJ, Zhang ZY, Li YL, Huang ZQ. Experimental research on TECA-I bioartificial liver support system to treat canines with acute liver failure. *World J Gastroenterol* 2001;7:706-709
  - 46 Qin JM, Zhang YD. Intestinal expressions of eNOSmRNA and iNOSmRNA in rats with acute liver failure. *World J Gastroenterol* 2001;7:652-656
  - 47 Riordan SM, Williams R. Transplantation of primary and reversibly immortalized human liver cells and other gene therapies in acute liver failure and decompensated chronic liver disease. *World J Gastroenterol* 2000;6:636-642
  - 48 Xue YL, Zhao SF, Zhang ZY, Wang YF, Li XJ, Huang XQ, Luo Y, Huang YC, Liu CG. Effects of a bioartificial liver support system on acetaminophen induced acute liver failure canines. *World J Gastroenterol* 1999;5:308-311
  - 49 Ding YT, Qiu YD, Chen Z, Xu QX, Zhang HY, Tang Q, Yu DC. The development of a new bioartificial liver and its application in 12 acute liver failure patients. *World J Gastroenterol* 2003;9:829-832

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 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%.