

MUC5AC、MUC6 核粘蛋白合成肽诱导小鼠抗肿瘤免疫反应

汪荣泉,房殿春,刘为纹

汪荣泉,房殿春,刘为纹,中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化
专科中心 重庆市 400038

汪荣泉,男,1968-7-14 生,汉族.1992 年第三军医大学本科毕业,1999 年第三
军医大学博士研究生毕业,副教授.主要从事消化系统疾病的研究.

项目负责人:房殿春,400038,重庆市,中国人民解放军第三军医大学西南医院
消化科. fangdianchun@hotmail.com

电话:023-68773055

收稿日期:2002-08-10 接受日期:2002-08-23

Anti-tumor immunity in mice induced by synthetic polypeptides of MUC5AC and MUC6 apomucins

Rong-Quan Wang,Dian-Chun Fang,Wei-Wen Liu

Rong-Quan Wang,Dian-Chun Fang,Wei-Wen Liu,Department of
Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical
University, Chongqing 400038,China

Correspondence to:Dr. Dian-Chun Fang, Department of Gastroenterology,
Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing
400038,China. fangdianchun@hotmail.com

Received:2002-08-10 Accepted:2002-08-23

Abstract

AIM:To evaluate the immune response and anti-tumor activity induced by synthetic polypeptides of MUC5AC and MUC6 apomucins in mice.

METHODS:The cellular and humoral immunity induced by MUC5AC and MUC6 synthetic polypeptides were examined in mouse,proliferation of lymphocyte and cytotoxicity of T lymphocytes were assessed by ³H-TDR incorporation assay.

RESULTS:The conjugated MUC5AC and MUC6 synthetic polypeptides could induce B cells in mice to produce high titre antibodies against the immunized peptides and delayed-type hypersensitivity. But they could not induce significant proliferation of lymphocyte and specific cytotoxic T-lymphocytes (CTL) *in vitro* against 7901 gastric cancer cells. This may be caused by the experimental design, inefficient epitope of synthetic polypeptides, or MHC restriction.

CONCLUSION:MUC5AC-KLH and MUC6-KLH synthetic polypeptide conjugates can induce cellular and humoral immunity other than cytotoxic T lymphocytes of anti-tumor effect.

Wang RQ, Fang DC, Liu WW. Anti-tumor immunity in mice induced by synthetic polypeptides of MUC5AC and MUC6 apomucins. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(3):314-317

摘要

目的:探讨 MUC5AC, MUC6 核粘蛋白合成肽在诱导小鼠抗肿瘤免疫反应中的作用.

方法:采用动物实验方法观察 MUC5AC 和 MUC6 黏核蛋白的合成肽诱导小鼠的细胞和体液免疫反应及其淋巴细胞体外抗肿瘤作用.

结果:MUC5AC, MUC6 合成肽可诱导小鼠产生相应的抗体及迟发型过敏反应,但不能产生脾淋巴细胞的明显增生及体外抗 7901 胃癌细胞株的作用.

结论:MUC5AC, MUC6 合成肽免疫小鼠可引发体液及细胞免疫反应,但尚不足以产生淋巴细胞毒作用.

汪荣泉,房殿春,刘为纹. MUC5AC、MUC6 核粘蛋白合成肽诱导小鼠抗肿瘤免疫反应. *世界华人消化杂志* 2003;11(3):314-317

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/314.htm>

0 引言

粘蛋白表达于多种人类正常腺上皮组织及部分腺癌,其分子结构是近年来研究的热点.目前已克隆出至少17种人粘蛋白基因及其他动物的类似物(MUC1-17),其中以MUC1-MUC6研究最为深入^[1-5].MUC1核粘蛋白及其糖链成份,甚至MUC1的DNA疫苗已提示具有诱发机体的细胞免疫和体液免疫作用,部分基于MUC1分子所设计的黏液瘤苗已进入了临床、期验证,有的已用于临床^[6-8].国内马运国研究提示,MUC2、MUC3核粘蛋白可诱发抗肿瘤细胞免疫^[9].其中的MUC2与MUC1和MUC3不同,他却是一种分泌型粘蛋白分子,由于其可能具有诱发机体抗肿瘤细胞免疫的作用,这也促使我们对其他的分泌型粘蛋白分子MUC5AC、MUC6进行研究.MUC5AC、MUC6编码的核粘蛋白在正常细胞内是被高度糖基化后才被分泌出细胞外,所以很少暴露于免疫系统,肿瘤细胞内MUC5AC、MUC6的编码产物由于他们的不完全糖基化,使核粘蛋白的表位易于暴露,从而可能激发机体的抗肿瘤免疫反应^[8,9].为了进一步明确粘蛋白介导的杀伤肿瘤细胞作用,及其诱发免疫反应的有效肽成份,本研究以体外合成的MUC5AC、MUC6粘蛋白合成肽免疫小鼠,以证实其是否具有与MUC1、MUC2、MUC3相似的诱发小鼠抗肿瘤免疫反应,藉以探索新的黏液瘤苗用于胃癌的治疗.

1 材料和方法

1.1 材料 MUC5AC 粘蛋白核心肽 TTSTTSAPTTS, MUC6 粘蛋白核心肽 SFQTTTTYTPSHPTTLTP, 皆由巴塞罗那自动化大学临床医学研究所 de Bolos Carme 博士惠赠. 合成肽用 ABI430A 合成仪经固相方法合成, 粗肽经高效液相色谱法测定其纯度超过 80%, 再进一步以反向固相色谱法纯化均匀的产物, 最后经氨基酸分析和电子喷雾物质光谱鉴定合成肽氨基酸序列的正确性^[10]. 6-8 周龄 Balb/c 小鼠(47 只)购自第三军医大学动物饲养中心, 随机分成 11 组, 每组 3-5 只, 雌雄搭配. 福氏佐剂和福氏不完全佐剂按常规方法自制, 其中的液体石蜡油、羊毛脂由本院药房提供, 而结核杆菌疫苗由重庆市沙坪坝区小龙坎防疫站惠赠. 胰蛋白酶, KLH 购自 Sigma 公司, ³H-TDR 购自中国原子能研究所, RPMI1640 购自 Gebco 公司, 重组人 IL-2 购自第三军医大学免疫学教研室.

1.2 方法 MUC5AC、MUC6 合成肽与 KLH 的连接按戊二醛连接法进行. MUC5AC, MUC6 合成肽溶于去离子水, MUC5AC 合成肽中(2.9 mg)加入去离子水(1.45 mL), MUC6 合成肽(4.4 mg)中加入去离子水(2.2 mL). 连接反应: MUC5AC 合成肽 1.45 mg(0.725 mL)加入 KLH 1.45 mg 和 3g·L⁻¹ 戊二醛 0.3 mL 组成反应液(1.17 mL). MUC6 合成肽 2.2 mg(1.1 mL)加入 KLH 2.2 mg 和 3g·L⁻¹ 戊二醛 0.44 mL 组成反应液(1.76 mL). 反应液经室温下搅拌反应 2 h, 加入 1 mol/L 甘氨酸 0.25 mL 阻断未反应的戊二醛. MUC5AC-KLH, MUC6-KLH 用 PBS 液透析过夜后, 分别获得相对纯化的 MUC5AC-KLH 和 MUC6-KLH. 实验动物分 11 组, 皮下注射免疫源. 组 1(5 只): MUC5AC-KLH(10 μg)加佐剂 0.25 mL; 组 2(3 只): MUC5AC-KLH(20 μg)加佐剂 0.25 mL; 组 3(3 只): MUC5AC-KLH(30 μg)加佐剂 0.25 mL; 组 4(5 只): MUC6-KLH(10 μg)加佐剂 0.25 mL; 组 5(3 只): MUC6-KLH(20 μg)加佐剂 0.25 mL; 组 6(3 只): MUC6-KLH(30 μg)加佐剂 0.25 mL; 组 7(5 只): MUC5AC(10 μg); 组 8(5 只): MUC6(10 μg); 组 9(5 只): KLH(10 μg); 组 10(5 只): 佐剂 0.25 mL; 组 11(5 只): 生理盐水 0.25 mL. 第 1 次免疫时应用完全福氏佐剂, 2 wk 后第 2 次免疫, 应用不完全福氏佐剂, 2 wk 后再免疫第 3 次, 以后隔 1 wk 免疫 1 次, 共 3 次, 每次均用不完全福氏佐剂. 最后 1 次免疫后 1 wk 按要求安乐处死小鼠, 收集小鼠血清作 ELISA 以检测抗 MUC5AC 和 MUC6 合成肽的抗体, 取小鼠脾脏并分离其淋巴细胞, 测定淋巴细胞增生试验及其肿瘤细胞杀伤活性试验.

1.2.1 血清学试验 血清中抗 MUC5AC, MUC6 合成肽抗体的检测采用 EILISA 法. MUC5AC, MUC6 合成肽(10 μg/孔)包被在酶联板上, 系列稀释的血清与包被的抗原孵育过夜, 辣根过氧化物酶标记的抗小鼠 IgG 二抗(购自北京中山公司)室温孵育 3 h, 每孔加入底物(H₂O₂ 和 OPD)(300 μL)反应. 以上各步之间均采用 PBS-Tween20 缓冲液冲洗各孔 3 次, 每次 3 min. 每孔加入

3 mol/L NaOH(50 μL)终止反应, 测定波长 449 nm 处各孔的吸光度 A.

1.2.2 T 淋巴细胞试验 第 2 次免疫后 10 d 行迟发型皮肤过敏试验, 在小鼠的脚掌内平均注射抗原 8 μg(溶于 PBS 内), 24 h 和 48 h 后用游标卡尺测量各只经注射处的小鼠脚掌厚度. 末次免疫 1wk 后按要求安乐处死小鼠并无菌取脾, 分离单个核细胞, 体外培养于 RPMI1640 培养液(含 100 mL·L⁻¹ 小牛血清蛋白), 其中含 MUC5AC 和 MUC6 合成肽(5 mg/L)和 -hIL-2 100 mg/L, 并以 2 × 10⁵ 个细胞/孔加入 96 孔培养板上, 在 37 和 50 mL/L CO₂ 条件下孵育 3 d, 加入 18.5 kBq/L [³H]-TDR 18 h 后, 用多头细胞收集仪收集细胞于 49 型玻璃纤维滤纸上, 60 烘干, 膜片置闪烁杯中, 每杯中加入闪烁液 4 mL. 液闪仪测各管的 Bq 值.

1.2.3 细胞毒测定 取对数生长期的胃癌细胞株 7901, 调成 1 × 10⁶/L 浓度, 加入 ³H-TDR 740 kBq/L, 置 37 水浴中温育 4 h, 每隔 15 min 振荡 1 次, 离心洗涤 3 次, 配成所需浓度待用. 效应细胞杀伤活性的测定采用 ³H-TDR 释放法微量细胞毒试验进行检测, ³H-TDR 标记的靶细胞配成 1 × 10⁶/L 浓度, 待测效应细胞样本配成 5 × 10⁶/ml, 于 96 孔平底培养板中每孔加靶细胞及待测效应细胞各 0.1 ml, 此为实验组; 自然释放组不加效应细胞, 用 RPMI1640 培养液 0.1 mL 代替, 每组设 3 个复孔, 置饱和湿度、37、50 mL/L CO₂ 孵育箱中培养 4 h, 于培养终止前 30 min 每孔加 2% 胰酶 10 μL, 消化 30 min, 用冷 Hanks 液 50 μL/孔终止消化. 经多头细胞收集器将样品收集于 49 型玻璃纤维滤纸上. 60 烘干, 膜片置闪烁杯中, 每杯中加入闪烁液 4 mL, 液闪仪测各管 Bq 值. 效应细胞的杀伤活性用细胞毒指数(CI)表示. CI%=1-(实验组 Bq 值 - 本底 Bq 值 ÷ 自然释放组 Bq 值 - 本底 Bq 值) × 100%. 效应细胞培养上清杀伤活性的测定, 靶细胞的标记同前, 收获培养一定时间的效应细胞(淋巴细胞)培养上清分别加入到含 ³H-TDR 标记靶细胞的 96 孔培养板内, 0.1 mL/孔, 每组设 3 个复孔, 置饱和湿度, 在 50 mL/L CO₂ 孵育箱中于 37 条件下培养 16-18 h, 多头细胞收集器收集细胞, 用液闪仪测定残留靶细胞的 ³H-TDR 掺入量. 阴性对照组加标记的靶细胞 0.1 mL/孔, 以 RPMI1640 培养液代替效应细胞上清. 杀伤活性(%)=1-(实验组 Bq ÷ 阴性对照 Bq) × 100%. 胃癌细胞株 7901, Kato-3 中粘蛋白 MUC1, MUC2, MUC3, MUC5AC, MUC6 核粘蛋白的表达采用免疫组化方法, 方法同前^[11,12].

统计学处理 所得数据用 t 检验, P < 0.05 为相差显著; P < 0.01 为相差非常显著.

2 结果

胃癌细胞株 7901 细胞中 MUC5AC, MUC6 核粘蛋白表达为强阳性或中等度阳性, 故下列实验采用 7901 细胞株为细胞毒试验的靶细胞.

2.1 小鼠血清中抗 MUC5AC、抗 MUC6 合成肽的抗体经 ELISA 法检测免疫后小鼠血清中抗 MUC5AC, 抗 MUC6 合成肽的抗体, 结果免疫原为单纯佐剂、单纯 KLH 和生理盐水的小鼠无抗 MUC5AC, 抗 MUC6 合成肽的抗体产生; 免疫原为单纯 10 μg 的 MUC5AC, MUC6 合成肽(连接型), 20 μg , 30 μg 的 MUC5AC, 和 20 μg , 30 μg 的 MUC6 合成肽(非连接型)的小鼠均产生了相应的抗 MUC5AC, 抗 MUC6 合成肽的抗体. 这说明 MUC5AC、MUC6 的连接型和非连接型均能诱导小鼠的体液免疫反应并产生其相应的抗体.

2.2 小鼠皮肤迟发型过敏反应 经刺激原刺激后 24 h 和 48 h 测定小鼠脚掌厚度, MUC5AC, MUC6 合成肽与 KLH 的连接型小鼠的脚掌厚度较 MUC5AC, MUC6 合成肽的非连接型组、单纯 KLH 组、单纯生理盐水组和单纯佐剂组明显厚, 这说明 MUC5AC, MUC6 合成肽与 KLH 的连接型加佐剂免疫小鼠后产生了皮肤迟发型过敏反应. 而单纯 MUC5AC, 单纯 KLH 和单纯佐剂均不能产生皮肤迟发型过敏反应, 单纯 MUC6 合成肽则可能产生皮肤迟发型过敏反应. 由于皮肤迟发型皮肤过敏反应是细胞免疫反应的表现形式, 故 MUC5AC, MUC6 合成肽与 KLH 的连接型加佐剂可以诱导小鼠的细胞免疫反应(表 1).

表 1 免疫小鼠的皮肤迟发过敏反应

Group	Immunogen	Stimulus	24 h 脚掌厚度 ($n=5, \bar{x} \pm S, \text{mm}$)	48 h 后的脚掌厚度 ($n=5, \bar{x} \pm S, \text{mm}$)
1	MUC5AC-KLH + adjuvant	MUC5AC	29 \pm 0.9 ^b	30 \pm 1.9 ^b
2	MUC6-KLH + adjuvant	MUC6	28 \pm 3.4 ^a	32 \pm 3.5
3	MUC5AC	MUC5AC	18 \pm 1.6	21 \pm 1.6
4	MUC6(10 μg)	MUC6	22 \pm 2.5	29 \pm 1.8
5	Saline	MUC5AC	19 \pm 1.8	22 \pm 1.6
6	KLH	KLH	22 \pm 0.6	23 \pm 1.8
7	adjuvant	MUC6	20 \pm 1.8	22 \pm 2.1

^b $P < 0.01$ vs 3,5,6,7 组; ^a $P < 0.05$ vs 4,5,6,7 组.

2.3 小鼠脾淋巴细胞的增生反应 MUC5AC, MUC6 合成肽的连接型与佐剂组和单纯合成肽、生理盐水和单纯佐剂组相比, 他们淋巴细胞的 ³H-TDR 标记率无差别, 而 ³H-TDR 标记率(Bq)反映了培养中的淋巴细胞的增生反应能力, 这提示我们, 尽管 MUC5AC, MUC6 合成肽的连接型可以诱导小鼠的体液免疫和细胞免疫反应, 但我们所设计的实验并没有发现其免疫小鼠的淋巴细胞增生率较其他组高, 具体的原因目前并不清楚, 可能与所用的佐剂或使用免疫原的量较少有关. 所以我们分别用 10, 20, 30 μg 的 MUC5AC, MUC6 合成肽的连接型与佐剂免疫不同的小鼠, 并在同一条件下测定各小鼠脾淋巴细胞的 ³H-TDR 标记率, 结果 30 μg 组较 10, 20 μg 组有增高的趋势, 但经统计学分析他们之间并没有显著差别($P > 0.05$), 进而提示小鼠淋巴细

胞的增生率与 MUC5AC, MUC6 合成肽的连接型抗原加入量之间可能无关.

2.4 小鼠脾淋巴细胞的细胞毒测定 MUC5AC, MUC6 合成肽的连接型与佐剂组和单纯合成肽、生理盐水和单纯佐剂组相比, 小鼠脾细胞及其培养上清在体外对胃癌细胞株 7901 无明显的杀伤作用. 这提示 MUC5AC, MUC6 合成肽的连接型虽然可以一定程度上诱导机体的体液免疫和细胞免疫应答, 但我们设计的 MUC5AC, MUC6 合成肽尚不足以诱导小鼠的抗肿瘤免疫反应. 将来使用其他不同的 MUC5AC, MUC6 合成肽分子的实验及实验方法的改进是需要的.

3 讨论

一些人类肿瘤抗原已被证明可诱发机体的细胞免疫和体液免疫反应, 而细胞免疫在抑制肿瘤生长中起重要作用.

本研究证明, MUC5AC, MUC6 合成肽与 KLH 的连接型加用福氏佐剂不仅可以诱发小鼠的体液免疫, 还可诱发细胞免疫反应, 但不能诱导小鼠淋巴细胞在体外的增生反应, 因而不能使小鼠淋巴细胞或其培养上清产生体外杀伤肿瘤细胞活性, 而单纯应用 MUC6, MUC5AC 合成肽组小鼠不能产生皮肤迟发性过敏反应, 这说明 KLH 和佐剂在诱发细胞免疫中起了很重要的作用, 可能是起加强抗原提呈的作用. 粘蛋白在癌变时可发生质和量的改变, 出现新的抗原表位. 由于 MUC1 是最先与机体免疫系统接触的细胞表面分子之一, 且含有许多连续重复序列, 可作为一种抗原使 T 细胞的 TCR 交联, 从而不需要 MHC 的参与就可活化细胞毒淋巴细胞(CTL), 即他对 CTL 的活化是非 MHC 限制性的. 因此 MUC1 是肿瘤主动特异性免疫治疗理想的靶分子^[6-8]. 目前已设计了多种基于 MUC1 的免疫原, 如表达 MUC1 的细胞、从癌细胞中纯化的 MUC1、重组核心蛋白、转染细胞产生的 MUC1 糖型、含有连续重复序列的肽或糖肽, 表达 MUC1 cDNA 的重组病毒, 合成的糖链疫苗、MUC1 核酸疫苗、抗 MUC1 抗体, 作为一种新的黏液瘤苗用于肿瘤治疗的研究, 其中含连续重复序列的肽, 合成的糖链疫苗和抗 MUC1 抗体已应用于临床, 并取得了一定的结果^[11].

属于粘蛋白家族的 MUC2, MUC3, MUC4, MUC5 和 MUC6 粘蛋白同样在肿瘤中是不完全糖基化的, 而正常组织是高度糖基化的, 并且 MUC2, MUC5 和 MUC6 这些粘蛋白与 MUC1 粘蛋白不同, 他们不存在于细胞表面, 而是以分泌型粘蛋白存在于人体的一些腔道内, 几无可能暴露于免疫系统. 所以进一步研究这些粘蛋白前体是否可诱发抗肿瘤的免疫反应, 对探索一些新的粘蛋白瘤苗具有潜在的价值. 国内袁玫 et al^[9] 研究提示, MUC2 和 MUC3 可能诱发细胞免疫, 证据主要是(1)核心肽加 Detox 免疫小鼠后, 皮内注射 MUC2 或 MUC3 都可诱发皮肤迟发过敏反应; (2)抗 MUC2 及

MUC3的抗体都可不同程度地阻断核心肽的免疫小鼠的淋巴细胞毒作用。而我们用 MUC5AC, MUC6 合成肽免疫小鼠引发了体液和细胞免疫反应,但尚不足以产生淋巴细胞毒作用,究其原因,可能与(1)所使用的佐剂是福氏佐剂,这种佐剂主要引起体液免疫反应,这被我们的 ELISA 检测结果证实,细胞免疫很弱,而马运国及其他的报道所采用的佐剂为专门诱发细胞免疫反应为主的佐剂,如 Detox 和 QS-21^[12]; (2)采用检测细胞毒的方法,⁵¹Cr 释放法可能比³H-TDR 释放法更敏感。所以进一步改进实验的设计方法进行的研究还是需要的。此外合成肽的连接型(与 KIH 相连)能产生高滴度的抗体,这对于设计合成新的黏液瘤苗是必须的; (3) de Bolos 所设计的合成肽主要目的是制备其相应的检测抗体,可能在诱导细胞免疫方面的作用较弱,所以进一步使用不同合成肽分子的实验是必须的。

4 参考文献

- Hanisch FG, Muller S. MUC1: the polymorphic appearance of a human mucin. *Glycobiology* 2000;10:429-449
- Velcich A, Yang WC, Heyer J, Fragale A, Nicholas C, Viani S, Kucherlapati R, Lipkin M, Yang K, Augenlicht L. Colorectal cancer in mice genetically deficient in the Mucin Muc2. *Science* 2002; 295:1726-1729
- Williams SJ, Wreschner DH, Tran M, Eyre HJ, Sutherland GR, McGuckin MA. MUC13, a novel human cell surface mucin expressed by epithelial and hemopoietic cells. *J Biol Chem* 2001;276: 18327-18336
- Perrais M, Pigny P, Buisine MP, Porchet N, Aubert JP, Van Seuningem-Lempire I. Aberrant expression of human mucin gene MUC5B in gastric carcinoma and cancer cells. Identification and regulation of a distal promoter. *J Biol Chem* 2001;276:15386-15396
- Gum JR Jr, Crawley SC, Hicks JW, Szymkowski DE, Kim YS. MUC17, a novel membrane-tethered mucin. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 291: 466-475
- Zhang SL, Graeber LA, Helling F, Ragupathi G, Adluri S, Lloyd KO, Livingstom PO. Augmenting the immunogenicity of synthetic MUC1 peptide vaccines in mice. *Cancer Res* 1996;56:3315-3319
- Graham RA, Burchell JM, Beverly P, Taylor-Papadimitriou J. Intramuscular immunization with MUC1 cDNA can protect C57 mice challenged with MUC1-expressing syngenic mouse tumor cells. *Int J Cancer* 1996;65:664-670
- Balloul JM, Acres RB, Geist M, Dott K, Stefani L, Schmitt D, Drillien R, Spohner D, Mckenzie I, Xing PX. Recombinant MUC1 vaccinia virus: a potential vector for immunotherapy of breast cancer. *Cell Mol Biol* 1994;40:49-59
- 袁玫,马远国,费丽华. 人癌相关粘蛋白前体诱发小鼠抗肿瘤免疫反应的研究. *中华肿瘤杂志* 1996;18:419-421
- de Bolos C, Garrido M, Real FX. MUC6 apomucin shows a distinct normal tissue distribution that correlates with Lewis antigen expression in the human stomach. *Gastroenterology* 1995;109: 723-734
- Kontani K, Taguchi O, Ozaki Y, Hanaoka J, Tezuka N, Sawai S. Novel vaccination protocol consisting of injecting MUC1 DNA and nonprimed dendritic cells at the same region greatly enhanced MUC1-specific antitumor immunity in a murine model. *Cancer Gene Ther* 2002;9:330-337
- Mitchell MS. Cancer vaccines, a critical review—Part II. *Curr Opin Investig Drugs* 2002;3:150-158

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

美国国立医学图书馆 2002 年度收录中国医学期刊名单

(2002-07-19)

本刊讯 美国《医学索引 (Index Medicus /MEDLINE, IM) 是世界上公认的重要的医学检索工具,由世界上最大的医学信息中心 - 美国国立医学图书馆 (National Library of Medicine, NLM) 编辑出版.2002 年度美国国立医学图书馆收录我国医学期刊 58 种,分别为法医学杂志 (中),湖南医科大学学报 (中),华西口腔医学杂志 (中),华西医科大学学报 (中) 环境科学 (中),临床耳鼻咽喉科杂志 (中),色谱 (中),生理科学进展 (中),生理学报 (中) 生物工程学报 (中),生物化学与生物物理学报 (中),生物医学工程学报 (中) 实验生物学报 (中),**世界胃肠病学杂志 (英)**,同济医科大学学报 (英),微生物学报 (中) 卫生研究 (中),细胞研究 (英),香港医学杂志 (英) 亚洲男科学杂志 (英文版),亚洲太平洋公共健康杂志 (英),眼科学报 (中),药学学报 (中),遗传学报 (中),应用生态学报 (中) 中国寄生虫学与寄生虫病杂志 (中),中国科学 (C 辑) (英),中国修复重建外科杂志 (中) 中国药理学报 (英),中国医疗器械杂志 (中),中国医学科学院学报 (英),中国医学科学院学报 (中),中国应用生理学杂志 (中),中国中西医结合杂志 (中),中国中药杂志 (中) 中华病理学杂志 (中),中华创伤杂志 (英),中华妇产科杂志 (中),中华肝脏病杂志 (中) 中华结核和呼吸杂志 (中),中华口腔医学杂志 (中),中华内科杂志 (中),中华烧伤杂志 (中),中华实验和临床病毒学杂志 (中),中华外科杂志 (中),中华血液学杂志 (中),中华眼科学杂志 (中),中华医学遗传学杂志 (中),中华医学杂志 (英),中华医学杂志 (中),中华预防医学杂志 (中),中华整形烧伤外科杂志 (中),中药材 (中),中医杂志 (英).

(世界胃肠病学杂志社 2002-10-18)