

DOI: 10.16505/j.2095-0136.2019.0067

• 论 著 •

三元融合蛋白 MBP-SERPINA3-IFN- κ 的表达及抗单纯疱疹病毒/人乳头瘤病毒功能研究

冀旺盛¹, 王斌², 刘新奇¹

1. 药物化学生物学国家重点实验室 南开大学生命科学学院, 天津 300071;

2. 山西天南易联医疗科技有限公司, 山西 太原 030000

摘要: 目的 原核表达三元融合蛋白 MBP-SERPINA3-IFN- κ (简称 MSIK), 并在细胞和小鼠水平上对其抗人乳头瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 的功能进行研究。方法 构建三元融合蛋白 MSIK 的原核表达质粒 pET30-MBP-SERPINA3-IFN- κ , 将构建好的质粒转入 BL21 (DE3) codon Plus 大肠埃希菌并利用异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, IPTG) 诱导蛋白的表达, 经亲和层析纯化得到蛋白, 用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 验证目的蛋白的纯度, 用 1 型单纯疱疹病毒 (herpes simplex virus type 1, HSV-1) 分别在角质细胞中及 BALB/c 小鼠上验证该蛋白的抗病毒活性, 通过实时荧光定量 PCR (Q-PCR) 检测样本中病毒的含量。结果 该融合蛋白经 IPTG 诱导表达并由亲和层析纯化后, 获得相对分子质量约为 100×10^3 的纯化蛋白, 经 SDS-PAGE 法检验, 并使用 Image J 进行灰度分析, 该融合蛋白纯度大于 95%。在角质细胞中, 该三元融合蛋白能够有效抑制 HSV-1 病毒的复制, 在小鼠皮肤创伤模型中, 该三元融合蛋白同样能够有效抑制 HSV-1 病毒的复制并能够促进创口的愈合。结论 成功表达了三元融合蛋白 MSIK, 并利用亲和层析柱进行了有效的纯化。获得的融合蛋白具有良好的生物学活性, 能够有效抑制 HSV-1 病毒的复制并促进创口的愈合。该三元融合蛋白可用于研发有效的抗 HPV 护创敷料, 用来治疗一些由 HPV 引发的相关疾病。

关键词: 融合蛋白 MBP-SERPINA3-IFN- κ ; 原核表达; 亲和层析; 人乳头瘤病毒; 1 型单纯疱疹病毒; 促创口愈合

中图分类号: R737 文献标识码: A 文章编号: 2095-0136 (2019) 06-0443-06

Prokaryotic expression and anti-HSV/HPV function of ternary fusion protein MBP-SERPINA3-IFN- κ

JI Wang-sheng*, WANG Bin, LIU Xin-qi

* State Key Laboratory of Medicinal Chemical Biology, School of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China

Corresponding author: LIU Xin-qi, E-mail: liu2008@nankai.edu.cn

Abstract: Objective To express the ternary fusion protein MBP-SERPINA3-IFN- κ in prokaryotic cells and study its anti-HPV virus function at the cellular and mouse levels. **Methods** The recombinant plasmid pET30-MBP-SERPINA3-IFN- κ containing gene encoding MBP-SERPINA3-IFN- κ (MSIK) was constructed and transformed into *E. Coli*. The recombinant *E. Coli* was cultured and induced by isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) and the fusion protein was purified using affinity chromatography column. SDS-PAGE method was used to verify the purity of the fusion protein. HSV-1 was used to test the antiviral activity of the fusion protein in human keratinocytes and BALB/c mice, respectively. The titer of virus in samples was determined by real-time fluorescent quantitative PCR (Q-PCR). **Results** The desired protein was purified by the affinity chromatography column and the relative molecular mass of the protein was approximately 100×10^3 . SDS-PAGE assay and Image J gray analysis showed that the purity of the fusion protein was more than 95%. The ternary fusion protein can effectively inhibit the replication of HSV-1 virus in keratinocytes. In mouse skin

基金项目: 国家自然科学基金 (31870730)

作者简介: 冀旺盛, 在读博士研究生, 主要从事病毒感染和免疫学研究工作

通讯作者: 刘新奇, E-mail: liu2008@nankai.edu.cn

wound model, the ternary fusion protein was also effective in inhibiting HSV-1 virus replication and promoting wound healing. **Conclusions** The ternary fusion protein MSIK was successfully expressed and purified. The obtained fusion protein could inhibit the replication of HSV-1 virus and promote wound healing. The ternary fusion protein has the potential to develop anti-HPV drugs and prevent the diseases caused by HPV infection.

Key words: Fusion protein MBP-SERPINA3-IFN- κ (MSIK); Prokaryotic expression; Affinity chromatography; HPV; HSV-1; Wound healing

人乳头瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 属于乳头多瘤空泡病毒科乳头瘤病毒属, 为一组无包膜的小分子双链环状 DNA 病毒, 人的皮肤和黏膜上皮细胞为其主要宿主细胞^[1]。根据 HPV 的生物学特征和致癌潜能, 可将其分为低危型和高危型^[2-4]。其中低危型主要引起感染部位的低度病变、生殖器或皮肤疣和尖锐湿疣, 而高危型 HPV 的持续感染与宫颈癌的发生密切相关^[1,5]。

目前虽有较多的治疗 HPV 感染的方法, 但普遍使用传统的治疗手段^[6]: 如手术、激光、外涂药物等, 其目的都只是去掉临床肉眼可见的疣体, 却难以解决亚临床以及潜伏感染的问题, 治标不治本, 致使反复发作^[7-8]。另外, 虽然目前已经能够通过接种 HPV 疫苗来预防 HPV 感染^[9], 但其成本很高, 极大地限制了大范围的推广^[5]。因此, 目前由 HPV 感染引发的相关疾病的治疗依然十分重要和严峻。

迄今为止, 世界上治疗 HPV 的抗病毒药物极为匮乏。其中山西锦波生物医药股份有限公司开发的生物蛋白敷料 (JB01-BD) 被临床试验证明安全有效, 也为宫颈癌的防治做出了一定的贡献^[10]。其活性蛋白质的作用机制, 是针对 HPV 病毒的侵袭和复制过程。但是, 由于 HPV 在体内的复制效率很低, 活体组织上很难检测到活的 HPV 病毒。HPV 感染所引起的宫颈癌和其他病症往往并不是由 HPV 的直接感染造成, 而是由于 HPV 致癌基因的整合, 以及 HPV 慢性感染和长期低剂量复制对宿主的影响而引起, 所以直接针对 HPV 活跃病毒的复制而进行抑制难于有好的效果^[2]。

HPV 感染后难以清除^[11], 一是由于子宫颈上皮细胞本身容易受到损伤, 产生微创, 给病毒传播产生了通道; 二是由于子宫颈上皮细胞的局部免疫系统不活跃, 容易给病毒有可乘之机。

本研究针对这些问题, 设计了一种三元融合蛋白 MBP-SERPINA3-IFN- κ (简称 MSIK)。其中, SERPINA3 是一种近期发现的胰凝乳蛋白酶抑制剂, 外敷时可以帮助上皮细胞的微小创口愈合, 促进局部皮肤再生^[12]。IFN- κ 是新近发现的一种上

皮细胞特异的 I 型干扰素, 激活上皮细胞的抗病毒免疫, 抑制病毒复制^[13]。MBP (麦芽糖结合蛋白) 可以增加融合蛋白的可溶性及稳定性。经验证, 该融合蛋白同时具有 SERPINA3 和 IFN- κ 的生物学活性及功能, 这些特性为其成为一种抗 HPV 的生物蛋白敷料提供了潜在的可能。

1 材料与方法

1.1 菌株及载体 原核重组载体 pET30 (经本实验室改造带有 MBP 标签), 大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) 株系 DH5 α 和 BL21 (DE3) codon Plus 均为本实验室保存。

1.2 主要试剂及仪器 金牌 MixDNA 聚合酶购自擎科生物, 限制性内切酶 *Ssp* I、*Kpn* I、*Bam*h I 购自 Thermo Scientific 公司 (美国), 重组酶购自南京 Vazyme 公司, 蛋白 Marker 及 DNA Marker 购自 Takara 公司 (日本), DNA 凝胶回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒购自 Axygen 公司 (美国), PCR 引物合成及重组质粒测序由金唯智公司完成, 琼脂糖、琼脂粉购自生工生物, LB 培养基购自 BD 公司 (美国), 水合氯醛购自生工生物, DMEM 细胞培养基、FBS 购自 Hyclone 公司 (美国), 移液管、培养皿、孔板等细胞实验耗材购自耐思生物, TRIzol RNA 提取试剂购自 Invitrogen 公司 (美国), RT Master Mix 逆转录试剂盒购自 Abm 公司 (加拿大), SYBR Premix Ex Taq II 购自 Takara 公司 (日本), CO₂ 恒温培养箱购自上海 Heal Force 公司。mastercycler ep realplex2 荧光定量 PCR 仪购自 Eppendorf 公司 (德国)。Avanti JXN-26 落地低温超速离心机购自贝克曼库尔特公司 (美国)。

1.3 细胞及小鼠 BALB/c 小鼠: 南开大学实验动物中心提供 [许可证号: SYXK (津) 2014-00003], 角质细胞由暨南大学宾亮华实验室惠赠。HSV-1 病毒由南开大学曹又佳实验室惠赠。

1.4 重组质粒的构建与鉴定 使用 Overlap PCR 方法以 GGSGG 为 linker 将 SerpinA3 基因和 IFN- κ 基因拼接到一起。PCR 过程中使用到的 4 条

引物分别为, 引物 1: SERPINA3-F: 5'-TACT-TCCAATCCAATGCCACCCCTAACAGCCCA-3', 引物 2: SERPINA3-R: 5'-CCCTCCACTGCCAC-CGGCTTGCTTGGGATT-3', 引物 3: IFN- κ -F: 5'-GGTGGCAGTGGAGGGCTGGACTGTA ACT-TA-3', 引物 4: IFN- κ -R: 5'-TTATCCACTTCCAA-TGCTATTATTTCTCTCTGAA -3'。使用 *S_{sp}I* 酶切处理 pET30 载体质粒, PCR 产物和酶切载体经重组酶处理后转化至 DH5 α 。挑取单菌落并进行质粒提取, 由金唯智公司进行测序鉴定。将测序正确的质粒命名为 pET30-MBP-SERPINA3-IFN- κ 。

1.5 重组质粒蛋白的诱导表达 将测序正确的质粒转化到 BL21 (DE3) codon Plus 大肠埃希菌感受态细胞中。挑取单菌落于 100 ml LB (Kana 抗性) 液体培养基中, 37 °C, 220 r/min 恒温振荡培养 6~8 h 至吸光度 $A_{600}=0.6\sim 0.8$, 以每份 20~30 ml 的量分装到 1 000 ml LB (Kana 抗性) 液体培养基中, 37 °C, 220 r/min 恒温振荡培养 3~5 h 至吸光度 $A_{600}=0.6\sim 0.8$ 。每瓶加入 100 μ l 浓度为 1 mol/L 的 IPTG 诱导蛋白的表达, 16 °C, 220 r/min 恒温振荡培养 12~16 h, 4 000 r/min 离心 20 min 收集菌体, 以 30 ml Binding Buffer (20 mmol/L Tris, 0.5 mol/L NaCl) 重悬菌体, 置于 -30 °C 保存备用。

1.6 融合蛋白的亲纯化及鉴定 菌体解冻后进行超声破碎, 以 4 °C、18 000 r/min 离心 40 min。收取上清加至由 Binding Buffer 平衡的含有 MBP 亲和 beads 的重力柱中, 重复 3 次以增加结合效率。用 10 ml 的 Binding Buffer 洗涤柱子, 重复 3 次从而去除杂蛋白, 用 MBP Elute Buffer (20 mmol/L Tris, 0.5 mol/L NaCl, 10 mmol/L 麦芽糖) 洗脱目的蛋白并收集洗脱组分, 进行冷冻干燥处理后存于 -80 °C。最后, 用质量分数为 12% 的 SDS-PAGE 胶结合考马斯亮蓝染色法分析目的蛋白的纯度以及可能的降解情况。

1.7 RNA 的提取、反转录及 Q-PCR 检测 细胞样品直接使用 Trizol 法提取总 RNA, 皮肤样品经液氮冷冻研磨后使用 Trizol 法提取总 RNA。提取的总 RNA 立刻进行反转录合成 cDNA, 反转录体系为: RNA 2 μ g、RT Master Mix 4 μ l、补 RNase Free dH₂O 至 20 μ l。反应条件为: 25 °C 10 min、42 °C 30 min、85 °C 5 min。反转录的 cDNA 进行 Q-PCR 检测, 反应体系为: SYBR green MIX 10 μ l、引物 8 μ l、cDNA 2 μ l。反应条件为: 95 °C 2 min 预变性、95 °C 5 s、60 °C 30 s, 共 40 个循

环, 在每个循环结束时进行荧光信号检测。

1.8 融合蛋白在角质细胞中对 HSV-1 的影响 接种适量角质细胞至六孔板, 在 37 °C, 5% CO₂ 的恒温培养箱中培养 18~24 h, 至细胞融合度到达 70% 左右。用不同浓度的 MSIK 蛋白处理 2 h 并以 PBS 处理作为对照, 随后使用 HSV-1 感染 24 h, 收取 1×10^6 个细胞用 Trizol 法提取总 RNA。对总 RNA 进行反转录并使用实时荧光定量 PCR 检测病毒拷贝。

1.9 小鼠皮肤创口愈合实验及融合蛋白对皮肤创口中 HSV-1 的影响

1.9.1 小鼠皮肤创口的形成 取 BALB/c 雄性小鼠, 使用剃须刀除净背部毛发, 用质量分数为 4% 的水合氯醛麻醉小鼠, 体积分数为 75% 的乙醇棉球擦拭皮肤进行消毒, 用直径 6 mm 打孔器在小鼠背部制造皮肤创口。

1.9.2 融合蛋白对皮肤创口愈合的影响 每组 5 只 BALB/c 雄性小鼠, 在其背部制造创口, 在创口处分别滴加 10 μ l 浓度为 50 μ g/ml 和 100 μ g/ml 的融合蛋白溶液, 以 PBS 溶液处理作为对照。每天重复进行上述处理, 观察创口愈合情况并进行创口大小的测量及统计, 同时对创口进行拍照。

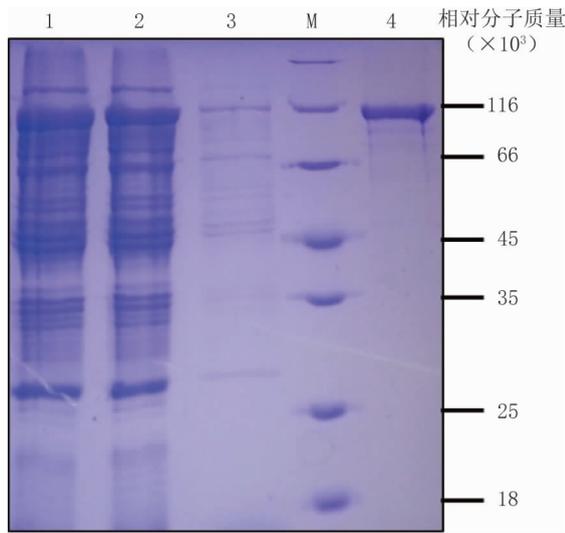
1.9.3 融合蛋白对皮肤创口中 HSV-1 的影响 每组 3 只 BALB/c 雄性小鼠, 在其背部制造创口。在创口处滴加 10 μ l 不同浓度的融合蛋白溶液并以 PBS 溶液处理作为对照, 18 h 后在创口处滴加滴度为 1×10^9 /ml 的 HSV-1 病毒 10 μ l 进行感染, 随后 3 d 重复进行上述处理。在第 3 天, 使用断颈法处死小鼠, 取小鼠创口以及周围 2 mm 处的皮肤并在液氮中速冻。在研钵中快速将皮肤研磨成粉末 (期间不断使用液氮降温防止 RNA 降解)。研磨后的皮肤使用 Trizol 法提取总 RNA, 将总 RNA 进行反转录并使用实时荧光定量 PCR 检测病毒拷贝数。

2 结果

2.1 三元融合蛋白 MSIK 的表达纯化及鉴定 重组原核表达质粒 pET30-MBP-SERPINA3-IFN- κ 转化到 BL21 (DE3) codon Plus 大肠埃希菌, 用异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, IPTG) 诱导后蛋白可以高效地进行表达。由 MBP 柱亲和层析后可以获得目的蛋白。经质量分数为 12% 的 SDS-PAGE 检测, 结果如图 1 所示, 破碎后的大肠埃希菌上清液中含有大量的目的蛋白, 洗脱液样品在相对分子质量约 100×10^3 处可见清晰的目的蛋白的条带, 并且洗脱

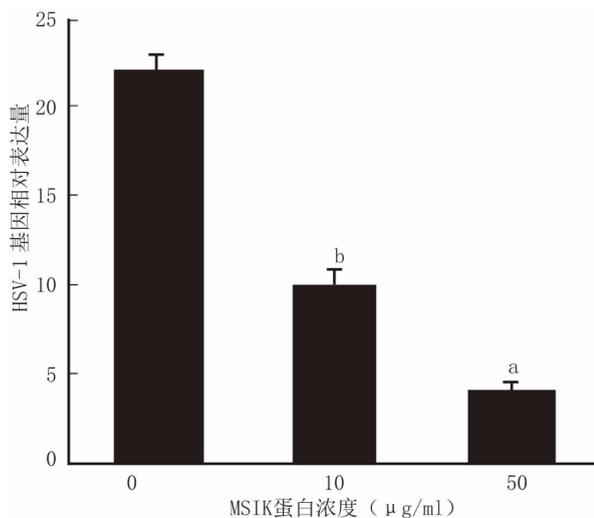
液样品中无明显可见的杂带。经过浓度测定可知，1 L 大肠埃希菌可纯化出 5 mg 左右的融合蛋白。

2.2 在角质细胞中融合蛋白 MSIK 有抑制 HSV-1 作用 由于 HPV 在体外很难培养，故本课题组使用跟 HPV 生活周期相近的 HSV-1 来进行代替。将角质细胞用不同浓度的 MSIK 蛋白处理 2 h，随后使用 HSV-1 感染 24 h，由 Q-PCR 检测各组细胞内病毒拷贝。结果如图 2 所示，角质细胞经融合蛋白 MSIK 处理后，细胞内 HSV-1 的含量显著降低，并且随着蛋白浓度的提高，其对 HSV-1 的抑制作用愈强。说明该三元融合蛋白 MSIK 在角质细胞中对 HSV-1 具有显著的抑制作用。



注：1 为大肠埃希菌破碎离心后的上清液；2 为流穿液；3 为 Binding Buffer 洗脱液；M 为蛋白分子量 Marker；4 为 MBP Elute Buffer 洗脱液。

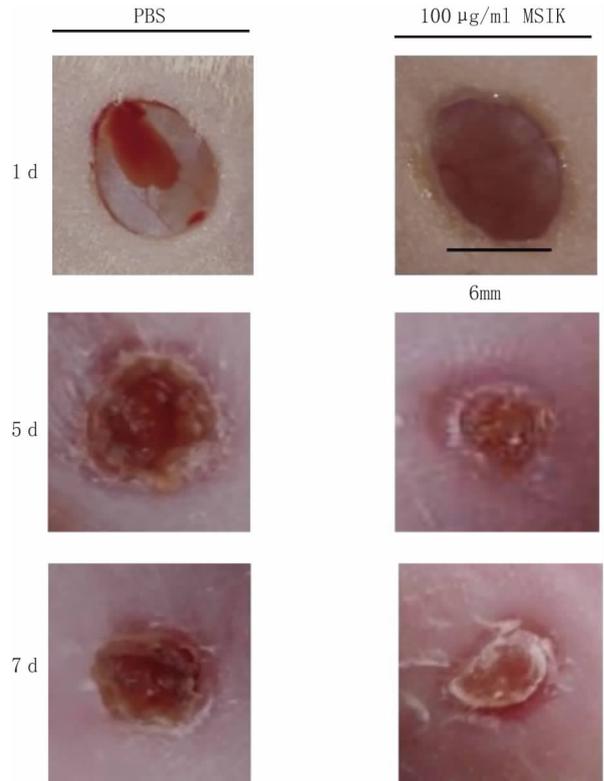
图 1 纯化蛋白的 SDS-PAGE 分析结果



注：将角质细胞用不同浓度 MSIK 蛋白处理 2 h 后，HSV-1 刺激 24 h，使用 Q-PCR 检测各组细胞内病毒拷贝。实验结果来自 3 次独立重复实验，以平均值和标准差表示。数据统计采用双尾 *t* 检验 (^a*P*<0.01, ^b*P*<0.001)。

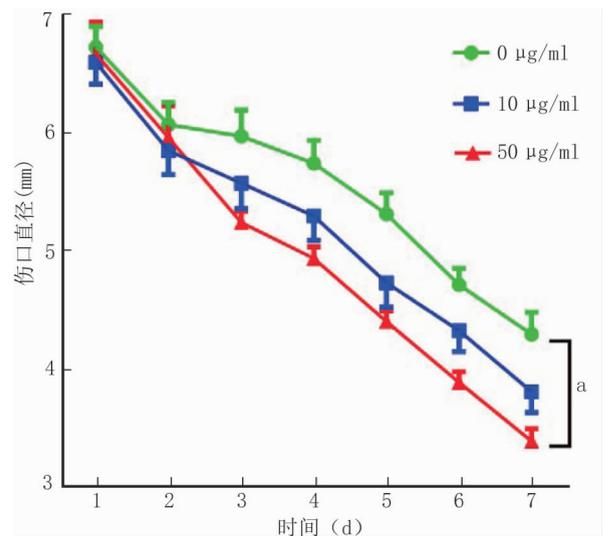
图 2 MSIK 蛋白对角质细胞内 HSV-1 增殖的影响

2.3 融合蛋白 MSIK 能够促进小鼠创口的愈合 分别以质量浓度为 50 μg/ml 和 100 μg/ml 的融合蛋白 MSIK 处理小鼠创口，以 PBS 溶液处理作为对照。每天重复进行上述处理，进行创口大小的测量及统计，并拍照。结果如图 3 和图 4 所示，融合蛋白 MSIK 能够有效地加速小鼠创口的愈合，并且具有十分显著的效果。对小鼠创口直径进行统计和分析，结果显示该融合蛋白的促创口愈合功能随



注：使用 100 μg/ml MSIK 蛋白处理创口，并以 PBS 处理为对照组。

图 3 小鼠创口愈合图

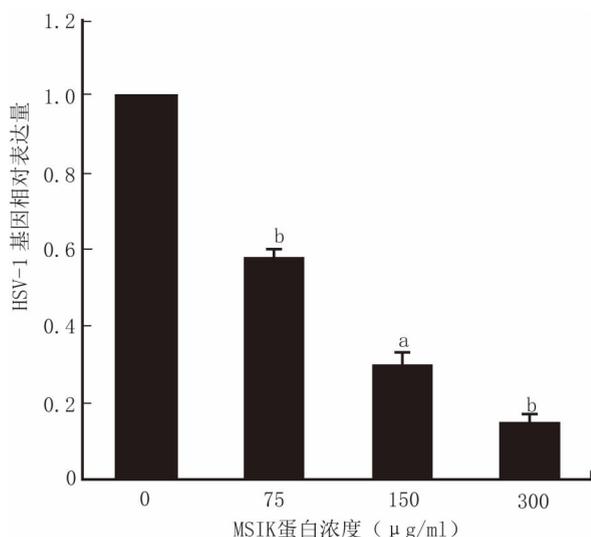


注：每组 5 只小鼠，以不同浓度 MSIK 蛋白处理创口，实验结果来自 3 次独立重复实验，以平均值和标准差表示。数据统计采用双尾 *t* 检验 (^a*P*<0.05)。

图 4 小鼠创口直径统计结果

蛋白浓度的升高而加强，并且差异有统计学意义 ($P=0.03$)，稳定可信。

2.4 融合蛋白 MSIK 对小鼠创口内的 HSV-1 具有抑制作用 使用不同浓度融合蛋白 MSIK 处理小鼠创口，18 h 后用 HSV-1 病毒感染创口，连续处理 3 d 后，以 Q-PCR 检测创口 HSV-1 的含量。结果如图 5 所示，该融合蛋白能够有效抑制皮肤创口内 HSV-1 的增殖，并且该融合蛋白对 HSV-1 病毒的抑制能力与其浓度呈正相关。实验经 3 次重复，数据经分析差异有统计学意义 ($P=0.007$)。



注：使用不同浓度融合蛋白 MSIK 处理小鼠创口，随后用 HSV-1 病毒感染创口，并以 Q-PCR 检测创口 HSV-1 的含量。实验结果来自 3 次独立重复实验，以平均值和标准差表示。数据统计采用双尾 t 检验 ($^a P < 0.05$, $^b P < 0.01$)。

图 5 小鼠创口内 HSV-1 含量的检测

3 讨论

HPV 需要通过子宫颈鳞状上皮细胞的微创口进入，才能在人体内完成感染。这些微创口很容易产生（如性交、上皮细胞死亡脱落、细菌感染等），一般不会流血和引起可见的炎症而引人注意。自身的皮肤修复系统对这些微创口的修复非常缓慢。另外，子宫颈上皮细胞的局部免疫系统不活跃，很难对 HPV 的感染产生有效的免疫反应。所以，对于 HPV 感染的治疗，在促进微创口愈合的同时，有效激活子宫颈上皮细胞的局部免疫系统，就显得至关重要。

本研究设计的融合蛋白中，SERPINA3 可以有效加快微创口的修复^[12]，使子宫颈鳞状上皮细胞层形成完整的屏障，阻断 HPV 的感染。IFN- κ 可以有效激活局部的上皮细胞抗病毒免疫信号通

路，抑制和杀灭 HPV^[13]。对比 IFN- α 或 IFN- β ，IFN- κ 限定在上皮细胞表达，通过自分泌途径激活，所以只在上皮细胞局部起作用，外敷时不进入血液循环，不会引起全身性反应，从而避免长期使用 IFN- α 和 IFN- β 时的不良反应。另外，近期的研究发现，IFN- κ 与 HPV 感染紧密相关，HPV 感染抑制 IFN- κ 的表达，而外源表达的 IFN- κ 可以抑制 HPV 的激活，IFN- α 和 IFN- β 并不具备上述特征^[14]。这 2 种活性蛋白的联合使用，会有效解决 HPV 不易清除的难题。

由于 IFN- κ 具有很强的疏水性^[15]，因此，其单独在原核表达系统中表达，基本以包涵体的形式存在。虽然包涵体经过变性复性也可以得到部分可溶的蛋白，但其操作复杂并且这些纯化方式不利于后期的应用。本研究设计的三元融合蛋白 MBP-SERPINA3-IFN- κ (MSIK) 中，MBP（麦芽糖结合蛋白）可以极大地增加 IFN- κ 的可溶性与稳定性，还可以通过与细胞表面糖链的结合协助融合蛋白附着于细胞表面。SERPINA3 本身的溶解性及稳定性均较好，也为整个融合蛋白的溶解及稳定提供了一定的帮助。本课题组获得的融合蛋白具有良好的溶解性和稳定性，并且可以通过简单的亲和层析的方法得到大量的高纯度蛋白，这些特性为其以后的应用提供了极大的帮助。

此外，本实验结果显示，三元融合蛋白 MSIK 具有良好的生物学活性，在细胞和小鼠个体水平均可有效抑制 HSV-1 的复制（由于 HPV 在体外很难培养，所以我们使用跟 HPV 生活周期相近的 HSV-1 来进行代替）。与此同时，在小鼠创口恢复过程中，该蛋白也能有效促进小鼠创口的愈合。

综上所述，本研究设计的三元融合蛋白 MSIK 均一性好，易于纯化，活性高，无不良反应，非常适合作为抗 HPV 的宫颈护创敷料，具有较为广泛的应用前景。

参考文献

- [1] Ding YZ, Wen JY, Lai BL, *et al.* Caffeic acid has activity against the human papillomavirus [J]. Bingdu Xuebao, 2018, 34 (3): 287-295. (in Chinese)
丁永楦, 温嘉泳, 赖宝龙, 等. 咖啡酸抗人乳头瘤病毒感染的研究[J]. 病毒学报, 2018, 34 (3): 287-295.
- [2] Wu SZ, Xu HY. Progress in immunization of cervical human papillomavirus infection [J]. Yixue Xinx, 2018, 31 (19): 33-36. (in Chinese)
邬素珍, 许焕英. 宫颈人乳头瘤病毒感染的免疫研究进展[J]. 医学信息, 2018, 31 (19): 33-36.
- [3] Bharti AC, Shukla S, Mahata S, *et al.* Anti-human papillo-

- mavirus therapeutics; facts & future [J]. Indian J Med Res, 2009, 130 (3): 296-310.
- [4] Graham SV. The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review [J]. Clin Sci, 2017, 131 (17): 2201-2221.
- [5] Rezhake R, Hu SY, Zhao S, *et al.* Eight-type human papillomavirus e6/e7 oncoprotein detection as a novel and promising triage strategy for managing HPV-positive women [J]. Int J Cancer, 2019, 144 (1): 34-42.
- [6] Ma H, Xu H, Gu WT, *et al.* 5 α -aminolevulinic acid photodynamic and recombinant interferon α -2b gel therapy for condyloma acuminatum and cervical high risk human papilloma virus infection of female patients [J]. Zhongguo Redai Yixue, 2018, 18 (11): 1079-1082. (in Chinese)
马红, 许辉, 顾文涛, 等. 5 α -氨基酮戊酸联合重组人干扰素 α -2b 凝胶治疗女性尖锐湿疣合并宫颈高危 HPV 感染 [J]. 中国热带医学, 2018, 18 (11): 1079-1082.
- [7] Dodd RH, Mccaffery KJ, Marlow AV, *et al.* Knowledge of human papillomavirus (HPV) testing in the USA, the UK and Australia: an international survey [J]. Sex Transm Infect, 2014, 90 (3): 201-207.
- [8] Graham SV. Human papillomavirus E2 protein: linking replication, transcription, and RNA processing [J]. J Virol, 2016, 90 (19): 8384-8388.
- [9] Oberlin AM, Rahangdale L, Chinula L, *et al.* Making HPV vaccination available to girls everywhere [J]. Int J Gynecol Obstet, 2018, 143 (3): 267-276.
- [10] Wardak S. Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer [J]. Me D Mikro, 2016, 68 (1): 73-84.
- [11] Yan BB, Jin F, Wang ZM, *et al.* The level and clinical significance of human papillomavirus in cervical cancer, cervical precancerous lesion and cervicitis [J]. Shiyong Aizheng Zazhi, 2018, 33 (10): 1724-1726. (in Chinese)
阎冰冰, 金芬, 王忠民, 等. 人乳头瘤病毒在宫颈癌、宫颈癌前病变和宫颈炎症中的水平及其临床意义 [J]. 实用癌症杂志, 2018, 33 (10): 1724-1726.
- [12] Hoffmann DC, Textoris C, Oehme F, *et al.* Pivotal role for alpha 1-antichymotrypsin in skin repair [J]. J Biol Chem, 2011, 286 (33): 28889-28901.
- [13] Habiger C, Jager G, Walter M, *et al.* Interferon kappa inhibits human papillomavirus 31 transcription by inducing sp100 proteins [J]. J Virol, 2016, 90 (2): 694-704.
- [14] Decarlo CA, Severini A, Edler L, *et al.* IFN-kappa, a novel type I IFN, is undetectable in HPV-positive human cervical keratinocytes [J]. Lab Invest, 2010, 90 (10): 1482-1491.
- [15] Zhang H, Duan ZJ, Zhu JG, *et al.* Cloning, expression and purification of interferon- κ , a novel human interferon, and its antiviral activity [J]. Zhonghua Shiyan He Linchuang Bingduxue Zazhi, 2005, 19 (3): 223-226. (in Chinese)
张辉, 段招军, 朱建高, 等. 人新型干扰素 κ 的基因克隆、表达、纯化及其抗病毒活性的初步研究 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2005, 19 (3): 223-226.

收稿日期:2019-02-25 修回日期:2019-09-20 责任编辑:刘磊

论文撰写规范

图位:以排于首次提及的相应正文所在自然段落后为宜,或简单集中于文末。

插图宽度:以占一栏或两栏宽度为宜,图旁一般不串文。病理(组织)切片图应注明染色方法、放大或缩小倍数,插图为黑白图,若需作彩色图,应注明,并另付制作彩色图的制版费。插图应具自明性。

坐标图:纵横坐标轴的标目均应平行排在标轴外,纵轴标目以“顶左底右”排。标目由物理量名称、符号和相应单位组成。量与单位间用斜线隔开。坐标轴上应标明标值线(刻度线)和标值,否则,应在坐标轴尾端画出箭头。

图题:一律排在图下方。图序号使用阿拉伯数字,全文从“1”开始连续编码,只有1幅图也应编1。插图必须具有自明性。

图中注释或说明语均放于图与图题之间。