

MMP-2、MMP-9 及 TIMP-1、TIMP-2 在 TPV 感染 OMK 细胞中的表达及其与感染的关系

费 晨^{1a}, 钱永华^{1a,1b}, 焦 锋^{1b}, James Johnston², 王 根²

(1 西北农林科技大学 a 动物医学院, b 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100;

2 国家研究委员会营养与科学研究所, 加拿大爱德华王子岛 夏洛特敦 C1A 4P3)

【摘 要】【目的】研究在特纳河痘病毒(Tanapox virus, TPV)感染泉猴肾上皮细胞(Owl monkey kidney epithelial cells, OMK)过程中, 基质金属蛋白酶-2(Matrix metalloproteinase-2, MMP-2)、MMP-9 和其组织抑制剂(Tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP)TIMP-1、TIMP-2 的表达变化及其与感染的关系。【方法】用 MMPs 高特异性抑制剂(MMP-2 II、MMP-9 I)降低 MMP-2 或 MMP-9 的活性, 研究其对 TPV 感染的影响和对 OMK 细胞的毒性。采用明胶酶谱法检测 MMP-9 和 MMP-2 在 TPV 感染过程中蛋白质水平的变化, 并应用实时荧光定量 PCR 方法检测 TPV 感染中 TIMP-1 和 TIMP-2 mRNA 表达水平的变化。【结果】MMP-2 和 MMP-9 的高特异性抑制剂对 TPV 感染具有显著抑制效果, 且对 OMK 细胞没有毒性作用。在 TPV 感染 OMK 细胞过程中, MMP-2 和 MMP-9 蛋白水平升高, 而 TIMP-1 和 TIMP-2 的 mRNA 表达水平下降。【结论】MMP-2 和 MMP-9 参与 TPV 感染, 可能对病毒的感染具有促进作用。MMP-2、MMP-9 和 TIMP-1、TIMP-2 比例失衡, 造成 MMP-2 和 MMP-9 相对“过盛”, 这可能是 MMPs 促进 TPV 感染的重要机制。

【关键词】 基质金属蛋白酶; 特纳河痘病毒; 基质金属蛋白酶组织抑制剂

【中图分类号】 Q291

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2011)05-0015-06

Expression of MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 in tanapox virus infecting OMK cells and their relationships with tanapox virus infection

FEI Chen^{1a}, QIAN Yong-hua^{1a,1b}, JIAO Feng^{1b}, James Johnston², WANG Gen²

(1 a College of Veterinary Medicine, b College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 NRC Institute for Nutrisciences and Health, PE, Charlottetown C1A 4P3, Canada)

Abstract: 【Objective】The study was to examine the expression of matrix metalloproteinase-2, 9 (MMP-2, 9) and tissue inhibitors of metalloproteinase-1, 2 (TIMP-1, 2) in Tanapox virus (TPV) infection and their relationship with TPV infection. 【Method】The inhibitory effects of MMP-2 or MMP-9 high selective inhibitors on TPV infection and the cell toxicity of them in OMK cell were tested respectively. Gelatin zymography and Real time PCR were applied to evaluate the protein levels of MMP-2, 9 and the mRNA levels of TIMP-1, 2, respectively. 【Result】TPV infection was inhibited by MMP-2 and MMP-9 inhibitors through decreasing the MMPs activity without OMK cell toxicity. The protein levels of MMP-2 and MMP-9 were up regulated during TPV infection. At the same time, the mRNA levels of TIMP-1 and TIMP-2 were down regulated during TPV infection. 【Conclusion】MMP-2 and MMP-9 play an important role in TPV infection and possible are factors to promote the infection. Perhaps TPV infection is associated with imbal-

* [收稿日期] 2010-11-03

[作者简介] 费 晨(1978—), 女, 河北廊坊人, 在读博士, 主要从事细胞生物学研究。E-mail: fcbest1@yahoo.com.cn

[通信作者] 钱永华(1962—), 男, 四川雅安人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事细胞生物学研究。E-mail: qyh@nwsuaf.edu.cn

ance of MMPs/TIMPs, especially MMP-9, MMP-2, TIMP-1 and TIMP-2.

Key words: matrix metalloproteinase; Tanapox virus; tissue inhibitors of metalloproteinase

特纳河痘病毒(Tanapox virus, TPV)是非洲的一种地方性病毒^[1],可导致以短暂发热、皮肤结节性损伤和局部淋巴结病为特征的人类温和、自限性疾病^[2]。现今,TPV 被应用于构建病毒载体和癌症的活载体疫苗,还作为溶瘤病毒用于治疗癌症^[3]。因此,对 TPV 感染机理的研究不仅有助于该病毒感染的防治,而且可以更好地将其应用于基因工程中,以治疗其他疾病。

基质金属蛋白酶(Matrix metalloproteinase, MMPs)是一类细胞内锌离子依赖的限制性内切酶,广泛参与许多生理和病理过程。MMPs 可通过降解细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)和基底膜(Basement membrane, BM)调控细胞因子和趋化因子的活性,促进病毒的扩散并参与病毒感染引起的宿主免疫反应,从而在艾滋病毒(HIV)等多种病毒感染过程中发挥重要的调控作用。研究表明,病毒的种类不同,MMPs 的作用、表达以及参与调控的关键 MMPs 也不同^[4-5]。迄今为止,未见关于痘病毒感染过程中 MMPs 的作用和表达变化的报道。

在 TPV 感染中,ECM 周围的感染组织被认为是阻碍痘病毒感染的屏障,因此对 ECM 的破坏是 TPV 入侵和传播的一个关键步骤。而且 TPV 感染可以引起强烈的免疫反应,其在实际中的应用都与其引起的免疫反应密切相关。因此,MMPs 可能在痘病毒感染中起着重要的调控作用。MMP-2 和 MMP-9 均属于明胶酶,分别被命名为明胶酶-A 和明胶酶-B。有报道显示,MMP-2 和 MMP-9 通过降解 ECM 和免疫调控功能参与很多病毒,如 HIV、人类 T 淋巴细胞白血病病毒 I (HTLV-I) 和乙肝病毒(HBV)等^[5]的感染过程。但是对于 MMP-2 和 MMP-9 在痘病毒感染过程中的作用和表达调控的研究尚未见报道。MMPs 的组织抑制剂(Tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMPs)是 MMPs 的天然抑制剂,在维持 MMPs/TIMPs 间的平衡和 ECM 重建的动态平衡过程中起重要作用^[6-7]。迄今为止,已知有 4 种 MMPs 活性组织抑制剂:TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3 和 TIMP-4^[8]。TIMP-1 能够与 MMP-9 按照 1:1 的比例形成混合物^[9],而 TIMP-2 可选择性地与 MMP-2 相结合^[10-11]。

本试验研究了 MMP-2 和 MMP-9 活性降低对 TPV 感染的影响,并探讨了病毒感染过程中 MMP-

2、MMP-9 及其组织抑制剂 TIMP-1 和 TIMP-2 的表达变化,以期从一个新的角度——MMPs 的功能来探讨痘病毒感染的分子机理,为发展新的 TPV 防治方法提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与病毒 泉猴肾上皮细胞(Owl monkey kidney epithelial cells, OMK) (ATCC CRL-1556)购自美国典型培养物保存中心(ATCC)细胞库。TPV 重组病毒由加拿大营养与科学研究所病毒实验室构建并保存,其基因中插入了由病毒早/晚启动子调控的绿色荧光蛋白(Green fluorescence proteins, GFP)基因^[12]。

1.1.2 MMP-2 及 MMP-9 高特异性抑制剂 MMP-2 高特异性人工合成抑制剂 MMP-2 Inhibitor II (MMP-2 II) 和 MMP-9 高特异性人工合成抑制剂 MMP-9 Inhibitor I (MMP-9 I), 均购自于 Calbiochem 公司。

1.1.3 主要试剂 细胞增殖检测试剂盒购自于 Roche 公司, EZ-10 柱总 RNA 纯化试剂盒和明胶酶谱所用试剂均购自于 Sigma 公司, Improm-II™ 反转录试剂盒购自于 Promega 公司, 实时荧光定量 PCR 试剂盒购自于 BIO-RAD 公司。

1.2 MMP-2 II 和 MMP-9 I 对 TPV 感染的影响

用不同浓度的 MMP-2 II (0(对照), 0.5, 1.0, 5.0 $\mu\text{mol/L}$) 和 MMP-9 I (0(对照), 0.1, 0.5, 1.0 $\mu\text{mol/L}$) 对 OMK 细胞预处理 24 h。取 50 μL TPV, 在感染复数 (Multiplicity of infection, MOI) 为 1 和 0.01 下感染 OMK 细胞, 然后将细胞培养在与预处理浓度相同的 MMPs 抑制剂中, 分别于感染后 72 和 96 h (72 HPI, 96 HPI) 测定细胞的荧光强度, 激发波长为 485 nm, 发射波长为 538 nm, 检测 TPV 的感染情况, 结果以抑制剂处理组细胞荧光强度与对照组细胞荧光强度的比值来表示。

1.3 MMP-2 II 和 MMP-9 I 对 OMK 细胞毒性的 MTT 法检测

用工作浓度 (0.5, 1.0, 5.0 $\mu\text{mol/L}$) 的 MMPs 抑制剂对 OMK 细胞预处理 72 h, 其余操作同 1.2 节, 每组设 4 个重复。应用细胞增殖检测试剂盒 (MTT 法), 依据其使用说明书测定 MMPs 抑制剂

对细胞的毒性。

1.4 OMK细胞样品的制备

将OMK细胞接种于24孔板中(接种剂量为 2×10^5 孔 $^{-1}$),在MOI分别为1,0.1,0.01和0.001条件下,用TPV感染OMK细胞,分别于感染后24,48和72 h(24HPI、48HPI、72HPI)收集细胞及上清液,用于测定TIMP-1、TIMP-2 mRNA和MMPs蛋白水平的变化。

1.5 TIMP-1和TIMP-2 mRNA表达的实时荧光定量PCR检测

1.5.1 总RNA的提取及反转录 采用EZ-10柱总RNA纯化试剂盒,按照使用说明提取总RNA,用紫外分光光度仪于260和280 nm处测定总RNA的吸光值(A_{260} 和 A_{280}),检测其浓度和纯度,结果显示所有总RNA都具有相对较高的纯度($A_{260}/A_{280} > 1.9$),可作为单链cDNA合成的样品。将总RNA于 -80°C 储存,以备后用。

反转录按照Promega公司Improm-II™反转录试剂盒的说明进行操作。取1 μg RNA与0.5 μg Oligo(dT)₁₅ Primer混合于5 μL 体系中,70 $^\circ\text{C}$ 温浴5 min,再放置于冰上至少5 min;然后从冰上取出,加入4 μL 5 $\times$ Reaction Buffer,6 μL 5.3 mmol/L MgCl₂, 8 μL 0.5 mmol/L dNTP mix,20 U RNA酶抑制剂和1 μL 反转录酶,25 $^\circ\text{C}$ 温浴5 min,42 $^\circ\text{C}$ 温浴1 h;将产物在70 $^\circ\text{C}$ 温浴15 min,以变性RNA-cDNA双螺旋,使cDNA成为聚合的模板。

1.5.2 引物的设计与合成 实时定量PCR(Quantitative real-time PCR, QRT-PCR)的引物数据库RT PRIMER DATABASE (<http://medgen.ugent.be/rtpimerdb/index.php>),由Sigma公司合成,其序列如下:TIMP-1 Sense Primer 5'-CTTCTGGCATCCTGTTGTTG-3', Antisense Primer 5'-AGAAGGCCGTCTGTGGGT-3'; TIMP-2 Sense Primer 5'-CCAAGCAGGAGTTTCTCGAC-3', Antisense Primer 5'-TTTCCAGGAAGGGATGTCA G-3'; β actin Sense Primer 5'-TCACCCACACTGTGCCATCTACGA-3', Antisense Primer 5'-CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG-3'。

1.5.3 实时荧光定量PCR 以 β actin基因为内标,进行实时荧光定量PCR,20 μL 反应体系包括10 μL iQTM SYBR® Green Supermix (BIO-RAD, Mississauga, Canada),4 μL 水,2.5 μL 引物,1 μL cDNA样品。反应条件为:95 $^\circ\text{C}$ 变性3 min;95 $^\circ\text{C}$ 15 s,60 $^\circ\text{C}$ 45 s,72 $^\circ\text{C}$ 45 s,45个循环;80 $^\circ\text{C}$ 10 s。

测定实时荧光信号强度,其与目标cDNA的浓度直接相关。将cDNA产品分别作1,5,10,100,1 000和10 000倍稀释,绘制其浓度-荧光信号强度标准曲线,将待测样本的荧光强度与标准稀释液的荧光强度进行比对,可得出样本的cDNA浓度。

1.6 明胶酶谱法分析MMP-2和MMP-9蛋白质水平的表达变化

调整1.4节收集的不同细胞上清液样品中的蛋白质质量浓度为300 $\mu\text{g}/\text{L}$,取细胞上清液30 μL ,与包含SDS的电泳上样缓冲液混合,加于上样孔中,在100 g/L的聚丙烯酰胺凝胶(含有1 g/L的明胶)中电泳分离,电泳在电压为80 V、温度为4 $^\circ\text{C}$ 的条件下进行2 h,当溴酚蓝径迹染料到达胶的末端时,结束电泳。室温下,在复性缓冲液中洗胶20 min,以除去SDS,然后将胶放入孵育缓冲液中37 $^\circ\text{C}$ 摇24 h,最后将胶在考马斯亮蓝R-250中染色,在甲醇/乙酸/水中脱色,在蓝色背景下明胶酶蛋白条带为白色条带。

1.7 数据统计分析

试验数据表示为“平均数 $\pm$ 标准偏差”;数据差异通过Microsoft Excel的Student's t test来比较分析, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 MMP-2 II和MMP-9 I对TPV感染的影响

由图1可知,MMP-2 II和MMP-9 I对TPV的感染能力均具有不同程度的抑制作用。分析结果表明,MMP-2或MMP-9参与了TPV的感染,可能在病毒感染过程中起重要作用,抑制其活性可以降低TPV的感染能力。

2.2 MMP-2 II和MMP-9 I对OMK细胞的毒性

与对照组相比,MMPs抑制剂预处理组的吸光值(A_{570})没有显著减少,对照组与试验组 A_{570} 值差异小于10%(图2),表明MMPs抑制剂对OMK细胞没有毒性作用。

2.3 TPV感染对TIMP-1和TIMP-2 mRNA表达水平的影响

从图3可看出,TPV的感染导致TIMP-1和TIMP-2的mRNA在感染后24和48 h表达下降,但是在72 h时,TIMP-1和TIMP-2的mRNA表达上调。

2.4 TPV感染对MMP-2和MMP-9蛋白质水平的影响

MMP-2和MMP-9在细胞内合成后,以酶原形式被分泌到细胞外,然后以酶原和活性形式存在。

本研究利用明胶酶谱法分析了细胞上清液中 MMP-2 和 MMP-9 的蛋白水平,结果(图 4)显示,MMP-9 和 MMP-2 的条带清晰可见,在 TPV 感染过程中,MMP-2 和 MMP-9 的蛋白水平较对照组(MOI=0)明显升高,在 MOI 为 0.01 和 0.1 时升高幅度更大;

MMP-2 与 MMP-9 相比,MMP-9 的升高程度更明显。在 TPV 感染后 72 h,TIMP-1 和 TIMP-2 mRNA 的表达显著上调,可能是为了抑制 MMP-2 和 MMP-9 的表达增高。

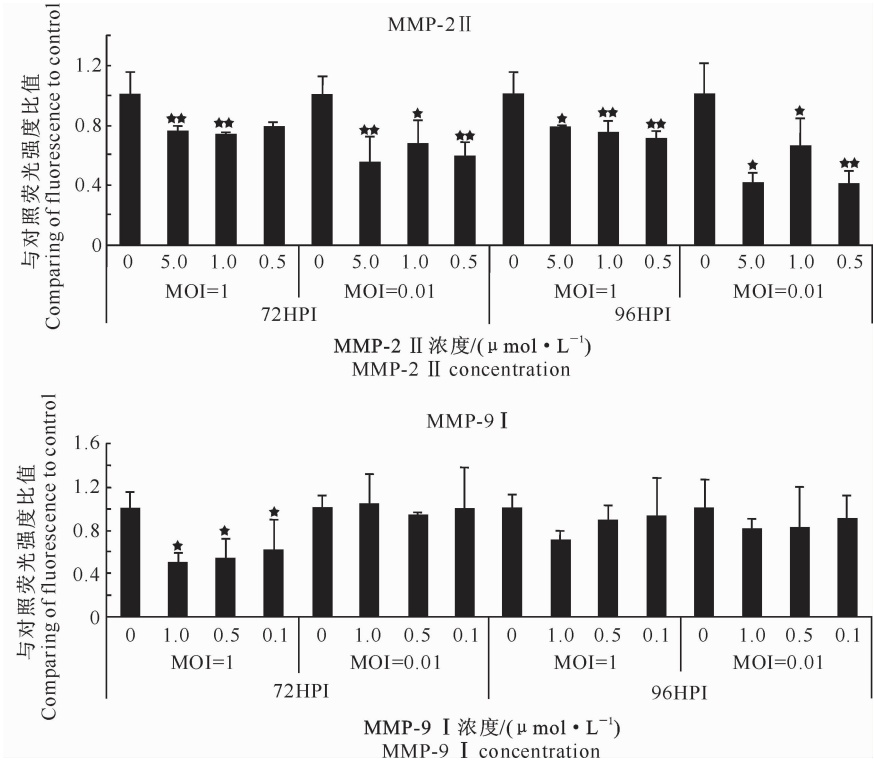


图 1 MMP-2 II 和 MMP-9 I 对 TPV 感染的抑制效果

★.表示与对照差异显著($P<0.05$);★★.表示与对照差异极显著($P<0.01$)

Fig. 1 Inhibition effects on TPV infection with MMP-2 or MMP-9 high selective inhibitors.

★. means $P<0.05$ compared with control;★★. means $P<0.01$ compared with control

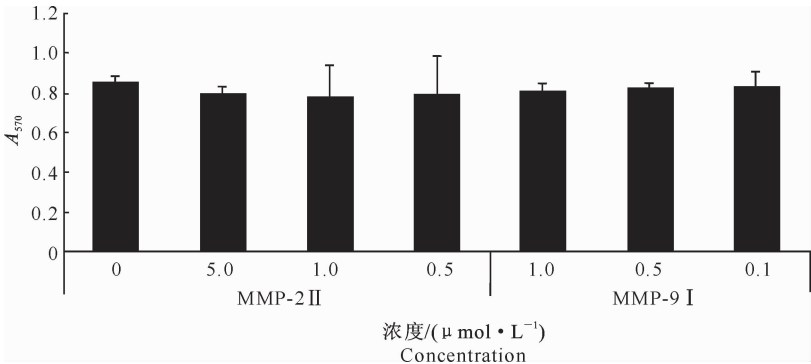


图 2 MMP-2 II 和 MMP-9 I 对 OMK 细胞毒性的测定

Fig. 2 The toxicity of MMP-2 II and MMP-9 I inhibitors on OMK cells

分析本研究结果可知,首先,MMP-2 或 MMP-9 高特异性抑制剂降低了 TPV 感染能力,揭示 MMP-2 和 MMP-9 可能在 TPV 感染过程中起重要作用;其次,在 TPV 感染过程中,MMP-2 和 MMP-9 的蛋

白质水平上调,这提示其在 TPV 感染中起重要的促进作用;再次,TIMP-1 和 TIMP-2 mRNA 水平的下调,必然造成其蛋白质水平下降,这与 TIMPs 是 MMPs 抑制剂的理论相一致,也暗示 TIMP-1 和

TIMP-2 在 TPV 感染过程中为 MMP-2 和 MMP-9 功能的发挥提供了良好的微环境;最后,MMP-2、MMP-9、TIMP-1 和 TIMP-2 表达水平的变化,必然

导致 MMPs/TIMPs 之间的平衡被破坏,造成 MMP-2 和 MMP-9 相对“过盛”,这可能是 MMPs 促进 TPV 感染的重要机制。

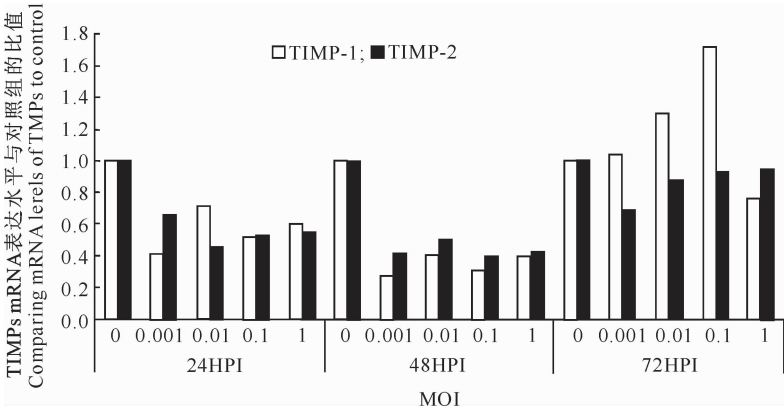


图 3 TPV 感染对 OMK 细胞 TIMP-1 和 TIMP-2 mRNA 表达的影响
Fig. 3 TPV infection decreases the mRNA expression of TIMP-1 and TIMP-2

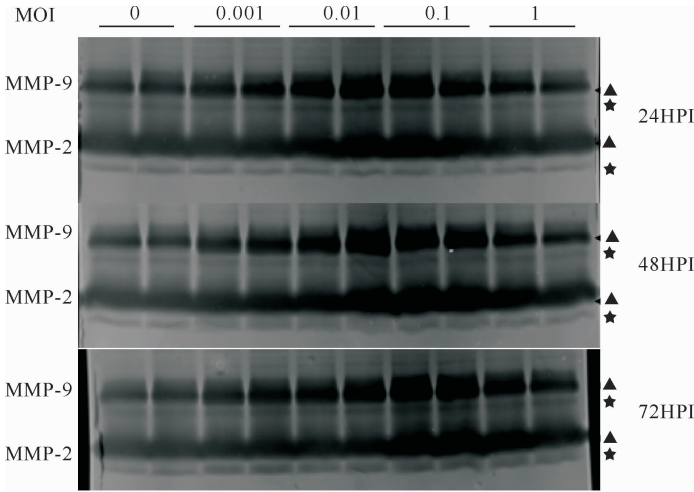


图 4 TPV 感染对 OMK 细胞培养上清液中 MMP-2 和 MMP-9 蛋白质水平的影响
▲. 92 ku 的 MMP-9 或 72 ku 的 MMP-2;★. 过度曝光后 MMP-2 或 MMP-9 的活性形式
Fig. 4 Influence of TPV infection on MMP-2 and MMP-9 protein expressin levels
Representative gelatin zymogram indicating the 92 ku and 72 ku pro-enzyme forms of MMP-9 and MMP-2, respectively(triangle), as well as active,cleaved forms of each(asterisk)

3 讨 论

MMPs 广泛参与生理(创伤愈合、胚胎形成和血管发生)和病理(动脉粥样硬化、关节炎、癌症转移、组织溃疡和病毒感染)过程,通过降解 ECM 和 BM 在疾病发展过程中起重要的调控作用^[13-14]。越来越多的研究表明,MMPs 尤其是 MMP-2 或 MMP-9 在病毒感染过程中起着非常重要的调控作用^[15]。

至今,关于 MMPs 在病毒感染中表达变化的研究主要集中在逆转录病毒和单链 RNA 病毒方面。

大部分的病毒感染都正调控 MMPs 的表达和分泌^[15-19]。本研究结果显示,在 TPV 的感染过程中,OMK 细胞中的 MMP-2 和 MMP-9 水平升高,与大多数病毒感染过程中 MMPs 表达的变化趋势相一致。

TPV 感染可以引起机体强烈的免疫反应,其感染所导致的结果是“细胞因子暴发”或脓毒症,属于免疫病理症状^[20]。在本研究中,TPV 感染 OMK 细胞,导致 MMP-2 和 MMP-9 表达升高。MMPs 可促进白细胞聚集,调控细胞因子、趋化因子的加工处理,参与防卫素激活和基质重建过程,在 TPV 感染

过程中发挥重要的调控功能。而且,ECM 周围的感染组织被认为是阻碍 TPV 感染的屏障,因此对 ECM 的破坏是 TPV 入侵和传播的一个关键步骤。TPV 感染导致 MMP-2 和 MMP-9 表达升高,造成组织破坏等免疫病理变化,从而促进 TPV 的迁移和传播。

综上所述,抑制 MMP-2 或 MMP-9 的活性可降低 TPV 的感染能力;而在 TPV 感染过程中,这 2 种酶的表达上调,因而 MMP-2 和 MMP-9 在 TPV 感染过程中起促进作用。同时 TIMP-1 和 TIMP-2 在感染过程中表达下调,从而破坏了 MMPs/TIMPs 间的平衡,导致 MMP-2 和 MMP-9 表达相对“过盛”,这可能是 MMPs 促进 TPV 感染的重要机制。因此,在 TPV 感染过程中,MMP-2 和 MMP-9 作为重要的调节因子发挥了关键的作用,这为将它们作为靶点防治痘病毒感染提供了试验依据。本研究首次从 MMPs 生物学功能角度探讨了 TPV 的感染机制,不仅为 TPV 感染的防治开辟了新的途径,也为 MMPs 在基因工程和癌症等疾病治疗方面的应用提供了理论指导。

[参考文献]

[1] Downie A W, Taylor-Robinson C H, Caunt A E, et al. Tanapox: A new disease caused by a pox virus [J]. Br Med J, 1971, 1(5745): 363-368.

[2] Essani K, Chalasani S, Eversole R, et al. Multiple anti-cytokine activities secreted from tanapox virus-infected cells [J]. Microb Pathog, 1994, 17(5): 347-353.

[3] Stanford M M, McFadden G. Myxoma virus and oncolytic virotherapy: A new biologic weapon in the war against cancer [J]. Expert Opin Biol Ther, 2007, 7(9): 1415-1425.

[4] Kahari V M, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour growth and invasion [J]. Ann Med, 1999, 31(1): 34-45.

[5] Johansson N, Ahonen M, Kahari V M. Matrix metalloproteinases in tumor invasion [J]. Cell Mol Life Sci, 2000, 57(1): 5-15.

[6] Hornebeck W. Down-regulation of tissue inhibitor of matrix metalloprotease-1 (TIMP-1) in aged human skin contributes to matrix degradation and impaired cell growth and survival [J]. Pathol Biol (Paris), 2003, 51(10): 569-573.

[7] Pardo A, Selman M. Mmp-1: The elder of the family [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2005, 37(2): 283-288.

[8] Brinckerhoff C E, Matrisian L M. Matrix metalloproteinases: A tail of a frog that became a prince [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002, 3(3): 207-214.

[9] Goldberg G I, Collier I E, Eisen A Z, et al. Mosaic structure of the secreted ecm metalloproteases and interaction of the type iv collagenases with inhibitors [J]. Matrix Suppl, 1992, 1: 25-30.

[10] Tetler-Stevenson W G, Krutzsch H C, Liotta L A. Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2): A new member of the metalloproteinase inhibitor family [J]. J Biol Chem, 1989, 264(29): 17374-17378.

[11] Schnaper H W, Grant D S, Stetler-Stevenson W G, et al. Type IV collagenase(s) and TIMPs modulate endothelial cell morphogenesis *in vitro* [J]. J Cell Physiol, 1993, 156(2): 235-246.

[12] Chakrabarti S, Sisler J R, Moss B. Compact, synthetic, vaccinia virus early/late promoter for protein expression [J]. Biotechniques, 1997, 23(6): 1094-1097.

[13] Kajanane R, Miettinen P, Mehlem A, et al. EGF-R regulates MMP function in fibroblasts through MAPK and AP-1 pathways [J]. J Cell Physiol, 2007, 212(2): 489-497.

[14] John A, Tuszynski G. The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis [J]. Pathol Oncol Res, 2001, 7(1): 14-23.

[15] Elkington P T, O' Kane C M, Friedland J S. The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease [J]. Clin Exp Immunol, 2005, 142(1): 12-20.

[16] Suryadevara, Holter R S, Borgmann K, et al. Regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by astrocytes: Links to HIV-1 dementia [J]. Glia, 2003, 44(1): 47-56.

[17] Lee S M, Kleiboeker S B. Porcine arterivirus activates the NF-kappaB pathway through IkappaB degradation [J]. Virology, 2005, 342(1): 47-59.

[18] Aggarwal B B, Shishodia S, Sandur S K, et al. Inflammation and cancer: How hot is the link? [J]. Biochem Pharmacol, 2006, 72(11): 1605-1621.

[19] Yamada H, Le Q T, Kousaka A, et al. Sendai virus infection up-regulates trypsin I and matrix metalloproteinase-9, triggering viral multiplication and matrix degradation in rat lungs and lung L2 cells [J]. Arch Virol, 2006, 151(12): 2529-2537.

[20] Stanford M M, McFadden G, Karupiah G, et al. Immunopathogenesis of poxvirus infections: Forecasting the impending storm [J]. Immunol Cell Biol, 2007, 85(2): 93-102.