

技术方法

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000070

过表达人 TSHR-A 亚单位的重组腺病毒 Ad-TSHR289/6xHis 载体构建与鉴定

朱晓云¹, 刘丽娟¹, 杨东甲², 高亚芹¹, 刘喜明¹

(1. 中国中医科学院广安门医院糖尿病研究室, 北京 100053; 2. 赛业(广州)生物科技有限公司销售部, 广州 510663)

【摘要】目的:构建以促甲状腺激素受体(thyroid stimulating hormone receptor, TSHR) A 亚单位(TSHR289)基因片段为免疫原的重组腺病毒载体, 以期建立 Graves 病(Graves's disease, GD)动物模型, 为探讨中药复方对 GD 的防治作用提供条件。**方法:**利用重叠 PCR 技术从 pSV2neoECE-TSHR289-6H-dhfr 质粒中将目的基因 TSHR289 扩增至载体 attB1-Kozak-TSHR289/6xHis/IRES/eGFP-attB2, 琼脂糖凝胶电泳回收, Gateway® 技术构建重组腺病毒载体(pAV.EX1d-TSHR289/6xHis/IRES/eGFP, pAd-TSHR289/6xHis), 转化到大肠杆菌 Stbl3 中, 菌落 PCR 筛选阳性克隆、测序鉴定。将 pAd-TSHR289/6xHis 转染 HEK293A 细胞包装腺病毒, CsCl 梯度离心法纯化腺病毒, TCID₅₀ 法检测病毒滴度。RT-PCR 法检测 HEK293A 中 TSHR289 的 mRNA 表达。应用该腺病毒免疫 BALB/c 小鼠制备 GD 模型。**结果:**菌落 PCR 筛选阳性克隆, 测序证明构建正确; 细胞感染腺病毒后出现明显细胞病变及增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, eGFP)表达; RT-PCR 检测证实重组腺病毒转染的细胞中 TSHR289 的 mRNA 表达量是未转染的 285 倍; 实验测得病毒滴度为 3.16×10^{10} PFU/ml; BALB/c 小鼠免疫第 10 周 T4、TSHR 抗体(TRA_b)阳性率 7/10。**结论:**成功构建了过表达人 TSHR289 基因的重组腺病毒载体, 动物实验证明该腺病毒诱发自身免疫, 产生 TRA_b。为下一步体内药物治疗 GD 试验提供了条件。

【关键词】Graves 病; 重组腺病毒; 促甲状腺激素受体; 载体构建; 动物模型

【中图分类号】R581.1

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-07-01

Construction and identification of recombinant adenovirus vector pAd-TSHR289/6xHis with overexpressed TSHR A subunit

Zhu Xiaoyun¹, Liu Lijuan¹, Yang Dongjia², Gao Yaqin¹, Liu Ximing¹

(1. Diabetes Research Department, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences;

2. Sales Department, Cyagen Biosciences (Guangzhou) Inc.)

【Abstract】Objective: To construct recombinant adenovirus vector, which takes thyroid-stimulating hormone receptor (TSHR) A subunit (TSHR289) as immunogen, to construct Grave's animal model and to explore traditional Chinese medicine prescription for the prevention and treatment of Grave's disease. **Methods:** TSHR289 gene was amplified from the plasmid of pSV2neoECE-TSHR289-6H-dhfr to attB1-Kozak-TSHR289/6xHis/IRES/eGFP-attB2 vector with overlapping PCR. PCR products purified by agarose gel electrophoresis were collected and adenovirus vector pAV.EX1d-TSHR289/6xHis/IRES/eGFP (pAd-TSHR289/6xHis) was recombined with Gateway® technology. Then recombined adenovirus vector was translated into *Escherichia coli* Stbl3; positive clones were screened out by PCR before sequencing. pAd-TSHR289/6xHis was transferred into HEK293A cells to produce recombinant adenovirus; adenovirus was purified by CsCl gradient centrifugation and titer of the virus was measured by TCID₅₀. Then mRNA expression of TSHR289 in HEK293 was measured by RT-PCR. Grave's model was created by immunizing BALB/c mice with Ad-TSHR289/6xHis. **Results:** Construction was proved correct by screening positive bacterial. Enhanced green fluorescence protein and cytopathic effect of HEK293A cells was observed by microscope after infection. RT-PCR demonstrated that mRNA expression of TSHR289 in recombinant adenovirus transferred cell were 285 times higher compared with those of untransfected cell. The titer of the virus was 3.16×10^{10} PFU/ml and the positive rate of T4 and TRA_b was 7/10 on the 10th week after BALB/c mice being immunized. **Conclusions:** Recombinant adenovirus vector of overexpressed human TSHR289 can be successfully constructed. The animal's experiments prove that

Ad-TSHR289/6xHis can induce autoimmunity and produce TRA_b, which provide the prerequisite for the experiment in vivo of treating Grave's disease.

【Key words】Grave's disease; recombinant adenovirus; thyroid-stimulating hormone receptor; vector construction; animal model

作者介绍: 朱晓云, Email: qiebenben@163.com,

研究方向: 甲状腺疾病与糖尿病基础研究。

通信作者: 刘喜明, Email: lxmhos@aliyun.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 30873252、81373593)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000070.html>

毒性弥漫性甲状腺肿,是常见多发的自身免疫性内分泌代谢性疾病,在人群中的患病率约为 1%~2%,严重影响了患者的身心健康和生活质量。临床表现主要有甲状腺毒症、弥漫性甲状腺肿、突眼征、胫前黏液性水肿^[1]。理想动物模型的建立是深入研究疾病的发病机制、探索有效治疗措施的途径之一。Chen 等^[2]和 Pichurin 等^[3]于 2004 年构建了表达人促甲状腺激素受体(thyroid stimulating hormone receptor, TSHR)A 亚单位的腺病毒(Ad-TSHR289)并开始进行动物免疫,该方法免疫小鼠的 Graves 病(Graves's disease, GD)发生率高且较稳定,是近几年采用较多的方法。虽然该模型缺乏眼病表现,但在一定程度上模拟了人 GD,对研究该病的防治措施和疾病演变等方面具有很高价值。本实验中采用 Gateway[®]技术,5 型复制缺陷型腺病毒载体,拟构建出过表达人 TSHR289 目的基因的重组腺病毒,为进一步探讨中药治疗 GD 的作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

含人 TSHR-A 亚单位全长 cDNA 的质粒 pSV2neoECE-TSHR289-6H-dhfr 由美国加利福尼亚大学的 Basil Rapoport 教授惠赠。Gateway[®] BP Clonase[™] II Enzyme Mix, invitrogen; Gateway[®] LR Clonase[™] II Plus Enzyme Mix, invitrogen; QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN; 质粒提试剂盒, TIANGEN; Taq DNA Polymerase, Fermentas; dNTP Mix, Fermentas; Gene Ruler[™] 100 bp DNA Ladder, Fermentas; PrimeSTAR[™] HS DNA Polymerase, Takara; GeneRuler[™] 10 kp DNA Ladder, Fermentas; 转染细胞 HEK293A, Invitrogen; H-DMEM, GIBCO; 胎牛血清, GIBCO; 转染混合液 Opti-MEM[®]I, GIBCO。

1.2 利用重叠 PCR 扩增质粒 attB1-Kozak-TSHR289/6xHis/IRES/eGFP-attB2

以包含 TSHR-A 亚单位全长 cDNA 的质粒 pSV2neoECE-TSHR289-6H-dhfr 为模板,进行 PCR 扩增,引物:attB1-Kozak-TSHR289:5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTG-CCACCATGAGGCCGGCGGACTTG-3', TSHR289/IRES-F:5'-ACCATCATTAAGCCCCTCTCCCTCCCC-3', TSHR289/IRES-R:5'-GGAGAGGGGCTTAATGATGGTGCTGCTGATGGCTAG-3', attB2-eGFP:5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCT-GGGTTTACTTGTACAGCTCGTCCATG-3'。扩增程序:98 ℃ 3 min; 98 ℃ 10 s, 60 ℃ 10 s, 72 ℃ 60 s, 30 个循环; 72 ℃ 5 min。PCR 产物 1% 的琼脂糖凝胶电泳回收。

1.3 利用 Gateway[®]技术构建腺病毒载体 pAV.EX1d-TSHR289/6xHis/IRES/eGFP(pAd-TSHR289/6xHis)

将纯化的 PCR 产物 attB1-Kozak-TSHR289/6xHis/IRES/eGFP-attB2 进行 BP 重组, 25 ℃ 反应 1 h。转化反应产物到大肠杆菌 Stbl3, 利用氨苄青霉素进行选择, 菌落 PCR 筛选, PCR 引物: pUpDo-flank-F: 5'-CGGCCAGTCTTAAGCTCGGG-3', pUpDo-flank-R: 5'-AATACGACTCACTATAAGGGGA-3', 扩增程序: 94 ℃ 3 min; 94 ℃ 30 s, 60 ℃ 30 s; 72 ℃ 1 min, 30 个循环; 72 ℃, 1 min。提取阳性克隆质粒, 并测序鉴定确认获得正确的质粒 pDown-TSHR289/6xHis/IRES/eGFP。测序引物: pUpDo-flank-F: 5'-CGGCCAGTCTTAAGCTCGGG-3', TSHR289/IRES/eGFP-1F: 5'-TCAATGGGACAAAGCTGGATG-3', TSHR289/IRES/eGFP-2F: 5'-AGTCAAATGGCTCT-CCTCAAG-3', pUpDo-flank-R: 5'-AATACGACTCACTATAAGGGGA-3'。

少量提取质粒 pDown-TSHR289/6xHis/IRES/eGFP, 和母载体质粒 pAV.Des1d, 25 ℃, LR 反应 1 h。同样的方法将 LR 反应产物转化到 Stbl3, 菌落 PCR 筛选, 并测序鉴定确认获得正确的 pAd-TSHR289/6xHis。PCR 鉴定引物与测序引物: pAV-Des1-flank-F: 5'-GAACCCACTGCTTACTGGCTT-3', pAV-Des1-flank-R: 5'-TCGAGACCGAGGAGAGGGT-3'。

1.4 重组腺病毒 Ad-TSHR289/6xHis 的包装、扩增、纯化

Pac I 酶切线性化 pAd-TSHR289/6xHis, 并回收。配制 A 液(质粒 DNA 1 μg+Opti-MEM 250 μl)和 B 液(3 μl lipofectamin[™]2000+Opti-MEM 250 μl), A、B 混合, 37 ℃ 反应 20 min。取培养至 80%~90% 融合的 HEK293A 细胞, PBS 漂洗后 6 孔板每孔加入 1 ml 无血清培养液, 加入 AB 混合溶液并轻轻混合, 培养过夜, 24 h 后更换成含 10% FBS 的 H-DMEM 培养基, 7 d 后开始出现细胞病变(cytopathic effect, CPE), 至 90% 以上出现细胞病变时, 收集细胞和上清。37 ℃/-80 ℃ 反复冻融 3 次以裂解细胞、释放病毒, 4 ℃, 2 000 g 离心 10 min, 将含有病毒的上清小量分装, -80 ℃ 冻存。以此病毒液继续感染 HEK293A 细胞以扩增病毒。重组腺病毒 Ad-TSHR289/6xHis 纯化采用氯化铯密度梯度离心法, 并用 GE 脱盐柱(Cat: 17-085101)进行脱盐纯化。纯化后的病毒 0.22 μm 无菌过滤后小份分装, -80 ℃ 保存。

1.5 重组腺病毒 Ad-TSHR289/6xHis 转导 HEK293A 细胞后 RT-PCR 检测 TSHR289 基因表达

Trizol 试剂提取未感染、仅带有 eGFP 的空载腺病毒、重组腺病毒 Ad-TSHR289/6xHis 感染的 3 种 HEK293A 细胞的总 RNA, 取 1 μg 的总 RNA 进行逆转录反应, 总反应体积为 20 μl, 42 ℃ 反应 1 h, 70 ℃ 5 min, 灭活逆转录酶。real-time PCR 扩增以 GAPDH 作为内参照, 引物分别为: TSHR289-F: 5'-AGTGTCACTGCCCTTCCATCC-3', TSHR289-R: 5'-AGTGGCTTGGGTAAGAAAGGTCAG-3'; Human GAPDH-F: 5'-GTCTCTCTGACTTCAACAGCG-3', Human GAPDH-R: 5'-AC

CACCCTGTTGCTGTAGCC-3'。PCR 扩增条件:95 ℃ 60 s;95 ℃ 15 s,60 ℃ 60 s,40 个循环;产物溶解曲线分析 95 ℃ 15 s,70 ℃ 1 min,95 ℃ 30 s。计算各样品 CT 值,相对定量 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析数据,计算 TSHR289 基因的相对表达量。

1.6 重组腺病毒 Ad-TSHR289/6xHis 的病毒滴度检测

根据文献[4]腺病毒滴度测定采用 TCID₅₀ 法。有限稀释法稀释病毒,从 10^{-1} ~ 10^{-12} ,以下式计算所测样本病毒的滴度: $T=10^{S+0.8}$ PFU/ml,S=阳性比率之和(从第一个稀释度算起)。

1.7 Ad-TSHR289/6xHis 腺病毒免疫 BALB/c 小鼠

将 6~8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠随机分为 Ad-TSHR289/6xHis 腺病毒实验组 10 只、Ad-eGFP 空载腺病毒对照组 10 只,正常组 5 只,每只每次胫前肌肉注射滴度 1×10^9 PFU 的腺病毒,正常组不做任何处理。1、4、7 周各免疫 1 次,共 3 次。第 10 周检测血清 T4 及 TRAb 水平,剥离甲状腺组织做 HE 染色。

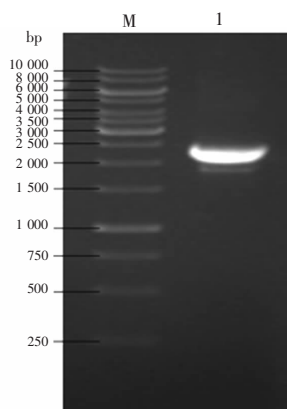
1.8 统计学处理

数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,运用 SPSS 11.5 统计软件进行单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t*,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 PCR 融合扩增 attB1-K-TSHR289/6xHis/IRES/eGFP-attB2

该 PCR 产物条带理论大小为 2 260 bp,对琼脂糖凝胶电泳中相应大小的条带进行切胶回收(图 1)。



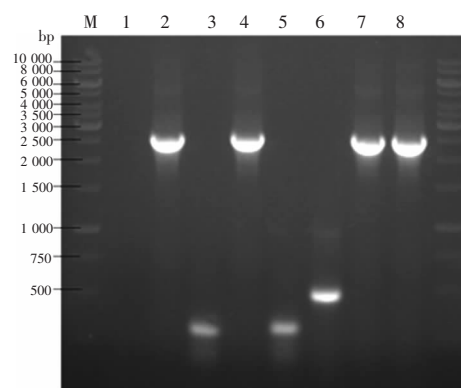
M. DNA Ladder; 1. attB1-K-TSHR289/6xHis/IRES/eGFP-attB2 质粒

图 1 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of PCR products

2.2 菌落 PCR 筛选和序列测定结果

pDown-TSHR289/6xHis/IRES/eGFP 质粒 PCR 产物条带理论大小为 2 466 bp,与目的条带大小相符的克隆(2、4、7、8 条带)即为阳性克隆(图 2)。pAV.EX1d-TSHR289/6xHis/IRES/eGFP 质粒 PCR 产物条带理论大小为 2 395 bp,2~8 条带为阳性克隆(图 3)。测序结果与目的序列一致。

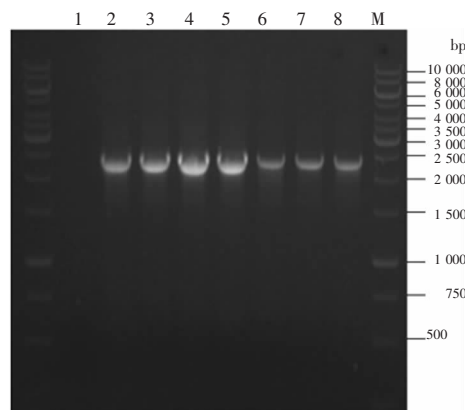


M. DNA Ladder; 1. 阴性对照;

2~8. pDown-TSHR289/6xHis/IRES/eGFP

图 2 菌落 PCR 产物电泳图

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of PCR products of bacterial colony



M. DNA Ladder; 1. 阴性对照;

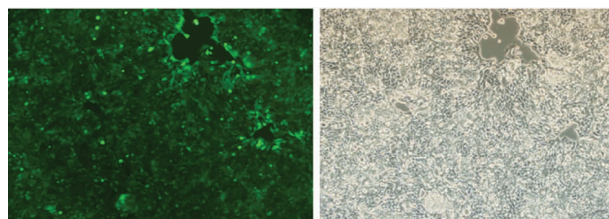
2~8. pAV.EX1d-TSHR289/6xHis/IRES/eGFP

图 3 菌落 PCR 产物电泳图

Fig.3 Agarose gel electrophoresis of PCR products of bacterial colony

2.3 荧光显微镜观察腺病毒感染的 HEK293A 细胞

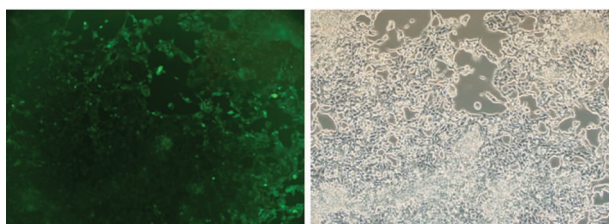
Ad-TSHR289/6xHis 转染 HEK293A 包装细胞 2~3 d 后,光镜下开始出现细胞病变,细胞变圆、肿胀、脱壁,细胞核变大等,表达 eGFP 基因的细胞发出明亮的绿色荧光(图 4)。空载腺病毒 Ad-eGFP 转染细胞(图 5)。



左为荧光照片,右为同一视野下明场照片,100 $\times$

图 4 Ad-TSHR289/6xHis 转染 HEK293A 图

Fig.4 HEK293A transfected with Ad-TSHR289/6xHis



左为荧光照片,右为同一视野下明场照片,100 ×

图 5 Ad-eGFP 转染 HEK293A 图

Fig.5 HEK293A transfected with Ad-eGFP

2.4 Real-time PCR 检测 TSHR289 基因表达

Ad-TSHR289/6xHis 感染的 HEK293A 细胞中 TSHR289 的 mRNA 明显过表达,其相对表达量(285.73 ± 22.00)是未经感染(1.01 ± 0.18)的 285.73 倍($P=0.000$),有统计学差异($P<0.01$)。而 Ad-eGFP 空载腺病毒组(0.69 ± 0.07)与未经感染组间无统计学差异($P>0.05$)(图 6)。

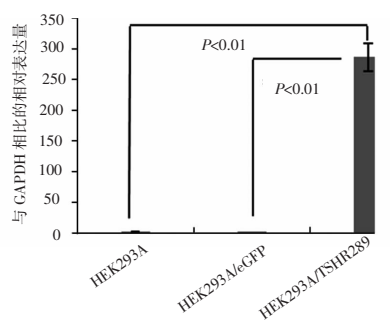


图 6 TSHR289 mRNA 相对表达量

Fig.6 Relative mRNA expression of TSHR289

2.5 重组腺病毒滴度

实验结果: $S=10/10+10/10+10/10+10/10+10/10+10/10+10/10+10/10+10/10+10/10+10/10+7/10+4/10+1/10=9.2$

$$T=10^{S+0.8}=10^{9.2+0.8}=10^{10}=1 \times 10^{10} \text{ PFU/ml}$$

2.6 Ad-TSHR289/6xHis 腺病毒免疫 BALB/c 小鼠

免疫第 10 周摘眼球取血,检测血清 TRAb、T4,以>正常组 $\bar{x}+3s$ 为判断阳性标准,实验组 TRAb、T4 阳性率为 7/10,实验组 TRAb (39.10 ± 47.50)与对照组 (3.99 ± 2.12)、正常组 (2.60 ± 2.64)比较,均有统计学差异($P<0.05$),对照组与正常组间 TRAb 无统计学差异($P>0.05$)(图 7);实验组 T4 (98.66 ± 22.08)与对照组 (78.19 ± 29.13)比较,有统计学差异($P<0.05$),实验组、对照组与正常组 (75.94 ± 3.14)比较,T4 均无统计学差异($P>0.05$)(图 8)。

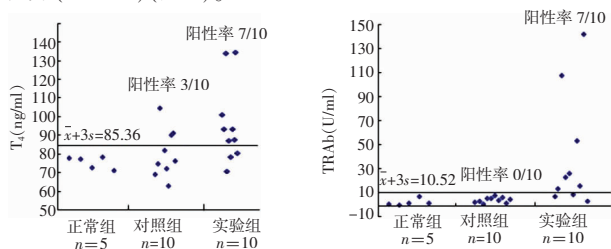
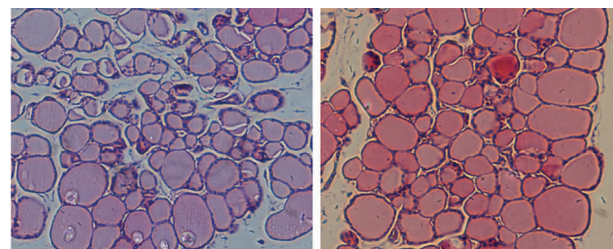


图 7 Ad-TSHR289 腺病毒免疫 BALB/c 小鼠甲状腺激素 T4、TRAb 测定

Fig.7 T4, TRAb measurement of Ad-TSHR289 immunized BALB/c mice



A. 正常组

B. 实验组

图 8 甲状腺组织 HE 染色 (100 ×)

Fig.8 HE staining of thyroid tissues (100 ×)

3 讨论

3.1 基因转染载体的选择

目前,应用于基因治疗最主要的病毒载体有逆转录病毒载体、腺病毒载体以及慢病毒载体。相对于其他 2 种载体,腺病毒载体有更高的感染效率,宿主范围广,能感染处于分裂或不分裂的细胞及原代细胞,并且不整合到宿主细胞基因组,具有更高的安全性,缺点是构建和包装的操作相对复杂^[6-7]。另外,腺病毒载体还具有病毒滴度高和装载容量大等特点,已被美国食品药品监督管理局批准作为基因治疗载体应用于临床试验。所以本研究选择构建重组腺病毒载体来过表达目的基因 TSHR289,并希望通过其高感染效率,使 BALB/C 小鼠产生 TRAb,从而引起 GD。

3.2 Ad-TSHR289 重组腺病毒构建方法的优化

实验中采用的 5 型复制缺陷型腺病毒表达载体缺失了腺病毒复制相关的 E1 基因,保留 ITR 和转殖基因,降低了腺病毒特异性的细胞免疫反应^[8]。Gateway[®]技术,利用位点特异性重组,在构建入门载体后,不需使用限制性内切酶、连接酶,就可多次使用入门克隆将目的基因转殖入多个目的载体,仅需要 BP、LR 两步反应,大大地简化了传统基因克隆步骤且克隆效率可高达 95%以上^[9]。

3.3 Ad-TSHR289 重组腺病毒包装及鉴定方法的选择

为了验证重组腺病毒是否含有目的基因,以及病毒的免疫原性,进行了以下实验:①对 pDown-TSHR289/6xHis/IRES/eGFP 和 pAd-TSHR289/6xHis 菌落筛选阳性克隆,DNA 双向测序,证实了目的基因 TSHR289 正确插入到质粒;②质粒构建中插入 eGFP 绿色荧光标签,应用荧光显微镜观察 pAd-TSHR289/6xHis 转导 HEK293A 后,细胞发出绿色

荧光,并逐渐停止生长、空斑形成;③RT-PCR 证实 Ad-TSHR289/6xHis 感染的细胞发生了 TSHR289 mRNA 过表达;④动物免疫实验证明 Ad-TSHR289/6xHis 具有免疫原性,可以诱发 BALB/c 小鼠产生 TRAb 抗体。

3.4 Ad-TSHR289/6xHis 诱导 BALB/c 雌性小鼠 GD 模型机制类似人 GD 的发生机制

GD 是一种常见的器官特异性自身免疫性疾病 (autoimmune thyroid disease, AITD),在应激状态(严重的精神创伤)、环境(细菌、病毒感染)、药物、遗传等因素共同作用下,一定程度的免疫调控缺陷,抗原特异性功能降低,机体产生了针对甲状腺自身抗原的细胞或体液免疫反应,甲状腺内淋巴细胞浸润,抗原递呈细胞进一步分化增殖,产生了针对甲状腺细胞上 TSHR 的自身抗体 (TRAb),使甲状腺激素合成和分泌功能紊乱,出现甲亢^[10-11]。TSHR 表达在甲状腺上皮细胞表面,它被认为是自身免疫性甲状腺疾病的主要自身抗原和重要因素^[12]。TSHR 是 G-蛋白偶联受体家族的一种,由 744 个氨基酸组成,其结构特征是 7 个跨膜肽段在胞内、跨膜、胞外形成 3 个部分,胞外区是 TSH 或 TSAb 识别和结合的部位。生理情况下 TSH 与 TSHR 结合后经 G-蛋白激活以实现生物学效应,而 TRAb 则可竞争性模拟 TSH 与 TSHR 结合,通过腺苷酸环化酶-cAMP 和或磷脂酰肌醇-Ca²⁺信号传导途径产生 TSH 的生物学效应,是导致 GD 的直接致病原因^[13]。未经治疗的 GD 患者血清 TRAb 阳性率可达 80%~100%,因此诱导 TRAb 的产生是建立 GD 动物模型的关键。GD 动物模型目前主要有核酸免疫、腺病毒免疫、细胞免疫、转基因等制备方法^[14-17]。本实验中采用 Gateway® 技术,5 型复制缺陷型腺病毒载体,构建出过表达人 TSHR289 目的基因的重组腺病毒,成功的诱导 BALB/c 小鼠血清内 TRAb、T4 的升高,甲亢发生率与文献等^[2,18]报道接近。因此应用该动物模型对研究人类 GD 的治疗有着积极的意义,腺病毒的成功构建为进一步研究中药复方治疗 GD 作用机制提供了条件。

参 考 文 献

[1] 陆再英,钟南山,谢毅,等.内科学[M].北京:人民卫生出版社,2008:712.

- [2] Chen CR, Aliesky H, Pichurin PN, et al. Susceptibility rather than resistance to hyperthyroidism is dominant in a thyrotropin receptor adenovirus-induced animal model of Graves' disease as revealed by BALB/c-C57BL/6 hybrid mice[J]. *Endocrinology*, 2004, 145(11): 4927-4933.
- [3] Pichurin PN, Chen CR, Chazenbalk GD, et al. Targeted expression of the human thyrotropin receptor A-subunit to the mouse thyroid: insight into overcoming the lack of response to A-subunit adenovirus immunization[J]. *J Immunol*, 2006, 176(1): 668-676.
- [4] 孙鹏宇, 张艳玲, 荆玉明, 等. 腺病毒滴度不同测定方法比较[J]. *南方医科大学学报*, 2011, 31(2): 234-238.
- [5] Ye F, Hou P, Wu X, et al. The significance of immune-related molecule expression profiles in an animal model of Graves' disease[J]. *Autoimmunity*, 2012, 45(2): 143-152.
- [6] 邵岩, 孙茂盛. 腺病毒载体的研究进展及其在轮状病毒疫苗研究中的应用[J]. *中国生物制品学杂志*, 2012, 25(3): 378-382.
- [7] 李爱玲. 腺病毒载体在基因治疗研究中的应用[J]. *陕西农业科学*, 2012(5): 103-104.
- [8] 付远辉, 何金生, 洪涛. 呼吸道合胞病毒载体疫苗研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2012, 32(1): 92-96.
- [9] Hartley JL, Temple GF, Brasch MA. DNA cloning using invitro site-specific recombination[J]. *Genome Research*, 2000, 10(11): 1788-1795.
- [10] Ponto KA, Kahaly GJ. Autoimmune thyrotoxicosis: diagnostic challenges[J]. *Am J Med*, 2012, 125(9): S1.
- [11] Rapoport B, Chazenbalk GD, Jaume JC, et al. The thyrotropin (TSH) receptor: interaction with TSH and autoantibodies[J]. *Endocr Rev*, 1998, 19(6): 673-716.
- [12] Liu L, Wu HQ, Wang Q, et al. Association between thyroid stimulating hormone receptor gene intron polymorphisms and autoimmune thyroid disease in a Chinese Han population[J]. *Endocr J*, 2012, 59(8): 717-723.
- [13] Orgiazzi J. Thyroid autoimmunity[J]. *Presse Med*, 2012, 41(12Pt2): e611-625.
- [14] 高亚芹, 刘喜明. Graves 病动物模型建立研究进展[J]. *新乡医学院学报*, 2012, 29(2): 139-141.
- [15] Ludgate M. Animal models of Graves' disease[J]. *Eur J Endocrinol*, 2000, 142(1): 1-8.
- [16] Flynn JC, Gilbert JA, Meroueh C, et al. Chronic exposure in vivo to thyrotropin receptor stimulating monoclonal antibodies sustains high thyroxine levels and thyroid hyperplasia in thyroid autoimmunity-prone HLA-DRB1*0301 transgenic mice[J]. *Immunology*, 2007, 122(2): 261-267.
- [17] McLachlan SM, Aliesky HA, Pichurin PN, et al. Shared and unique susceptibility genes in a mouse model of Graves' disease determined in BXH and CXB recombinant inbred mice[J]. *Endocrinology*, 2008, 149(4): 2001-2009.
- [18] Misharin A, Hewison M, Chen CR, et al. Vitamin D deficiency modulates Graves hyperthyroidism induced in BALB/c mice by thyrotropin receptor immunization[J]. *Endocrinology*, 2009, 150(2): 1051-1060.

(责任编辑:关蕴良)