

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00042

腺病毒介导 MHC II 类分子反式激活因子突变体基因治疗小鼠实验性自身免疫性甲状腺炎

龙宪连,管政,张军,方超平,张薇薇,张倩,沈茜*

第二军医大学长海医院实验诊断科,上海 200433

[摘要] **目的:**观察腺病毒介导 MHC II 类分子(major histocompatibility complex class II molecules)反式激活因子突变体(CII TAm)基因治疗小鼠实验性自身免疫性甲状腺炎(experimental autoimmune thyroiditis, EAT)的效果,并探讨其可能的作用机制。**方法:**31 只健康雌性 CBA/J 小鼠随机分成 EAT 模型组($n=8$)、CII TAm 治疗组($n=9$)、GFP 对照组($n=9$)和正常对照组($n=5$)。除正常对照组不作特殊处理外,其余 3 组均以猪甲状腺球蛋白(porcine thyroglobulin, pTg)+弗氏佐剂(complete or incomplete Freund adjuvant, CFA/IFA)建立 EAT 小鼠模型,CII TAm 治疗组和 GFP 对照组分别静脉注射重组腺病毒 Ad-CMV-CII TAm 及 Ad-GFP 进行治疗,EAT 模型组注射等量生理盐水。首次免疫后第 29 日处死小鼠,进行 H-E 染色观察甲状腺病理形态;免疫组织化学染色测定甲状腺 MHC II 类分子表达;分析 pTg 刺激下脾脏淋巴细胞的增殖及其上清液中 IFN- γ 的分泌水平;ELISA 法检测血浆中抗-pTg 自身抗体滴度;流式细胞术分析外周血和脾脏淋巴细胞中 CD4⁺T 淋巴细胞上可诱导共刺激分子(inducible costimulator, ICOS)的表达水平。**结果:**H-E 染色结果表明,CII TAm 治疗组甲状腺淋巴细胞浸润指数(0.3 ± 0.5)低于 EAT 模型组(1.4 ± 0.4)和 GFP 对照组(1.5 ± 0.2 , $P<0.01$)。免疫组化结果显示,EAT 模型组和 GFP 对照组甲状腺组织有弥漫性 MHC II 类分子表达,而 CII TAm 治疗组未见明显表达,正常对照组表达呈阴性。80 $\mu\text{g/ml}$ pTg 刺激下,CII TAm 治疗组小鼠淋巴细胞刺激指数(SI)明显低于 EAT 模型组或 GFP 对照组($P<0.05$);培养上清各组 IFN- γ 分泌水平与 SI 结果类似($P<0.01$)。CII TAm 治疗组血浆抗-pTg 自身抗体滴度显著低于 EAT 模型组或 GFP 对照组($P<0.01$);CII TAm 治疗组外周血和脾脏 CD4⁺T 细胞 ICOS 分子阳性表达率亦显著低于 EAT 模型组或 GFP 对照组($P<0.01$)。**结论:**重组腺病毒 Ad-CMV-CII TAm 能抑制 EAT 小鼠甲状腺组织 MHC II 类分子表达,抑制自身反应性 T 细胞增殖,减轻甲状腺炎性细胞浸润,降低自身抗体滴度,对 EAT 有一定的治疗作用。

[关键词] MHC II 类分子反式激活因子突变体;腺病毒科;自身免疫性甲状腺炎;基因疗法

[中图分类号] R 581.4; R 593.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)01-0042-06

Adenovirus-mediated MHC class II transactivator mutant in gene therapy of mouse experimental autoimmune thyroiditis

LONG Xian-lian, GUAN Zheng, ZHANG Jun, FANG Chao-ping, ZHANG Wei-wei, ZHANG Qian, SHEN Qian*

Department of Laboratory Medicine, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[ABSTRACT] **Objective:** To observe the therapeutic effect of major histocompatibility complex (MHC) class II transactivator mutant (CII TAm) for gene therapy of mouse experimental autoimmune thyroiditis (EAT) and explore the possible mechanisms. **Methods:** Thirty-one healthy female CBA/J mice were randomly divided into 4 groups, namely EAT model group ($n=8$), CII TAm therapy group ($n=9$), GFP control group ($n=9$), and normal control group ($n=5$). Animals in the first 3 groups were immunized with porcine thyroglobulin (pTg) and complete or incomplete Freud's adjuvant (CFA/IFA) to establish EAT model; mice in the CII TAm therapy group and GFP control group were also treated by intravenous recombinant adenovirus Ad-CMV-CII TAm and Ad-GFP, respectively, while those in the EAT model group were injected with equal volume of normal saline. Mice in the normal control group received no special treatment. All mice were sacrificed on the 29th day after the first immunization. The thyroid pathological changes were examined using H-E staining; the expression of MHC II molecules in the thyroid was examined using immunohistochemical staining; the spleen lymphocyte proliferation and IFN- γ secretion stimulated by pTg were examined in their culture supernatant; the titer of plasma anti-pTg autoantibody was assayed by ELISA; and the

[收稿日期] 2007-10-10 **[接受日期]** 2007-12-18

[基金项目] 上海市科委联合利华研究与发展基金(200305). Supported by Shanghai-Unilever Research & Development Fund(200305).

[作者简介] 龙宪连,博士. E-mail: longxianlian1970@sina.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-25070648, E-mail: msminli@hotmail.com

expression of inducible costimulator (ICOS) on CD4⁺ T cells in both peripheral blood and spleen was analyzed by flow cytometry. **Results:** H-E staining showed that the infiltration index of thyroid lymphocyte in the C II TAm therapy group (0.3 ± 0.5) was significantly lower than that in the EAT model group (1.4 ± 0.4) and the GFP control group (1.5 ± 0.2 , both $P < 0.01$). Immunohistochemical staining showed diffused expression of MHC II molecules in the thyroid of the EAT model group and GFP control group, compared to very weak expression in the C II TAm therapy group and the negative expression in the normal control group. The lymphocyte stimulation index (SI) against 80 $\mu\text{g/ml}$ pTg in the C II TAm therapy group was significantly lower than that in the EAT model group and the GFP control group ($P < 0.05$). The IFN- γ secretion in the culture supernatants showed a similar difference as SI in all the groups ($P < 0.01$). The titer of plasma anti-pTg autoantibody in the C II TAm therapy group was significantly lower than those in the EAT model group and the GFP control group (both $P < 0.01$). The positive rate of ICOS on CD4⁺ T cells in the C II TAm therapy group was significantly lower than that in the EAT model group and the GFP control group (both $P < 0.01$). **Conclusion:** Ad-CMV-C II TAm recombinant adenovirus can inhibit the MHC II molecule expression in the thyroid of EAT mouse and the proliferation of self-reactive T cells, attenuate the inflammatory cells infiltration in the thyroid, and decrease the titer of plasma anti-pTg autoantibody, indicating that C II TA mutants might have therapeutic effect for EAT.

[KEY WORDS] MHC class II transactivator mutant; adenoviridae; autoimmune thyroiditis; gene therapy

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(1): 42-47]

实验性自身免疫性甲状腺炎 (experimental autoimmune thyroiditis, EAT) 是人桥本甲状腺炎 (Hashimoto's thyroiditis, HT) 的动物模型, 其特征是出现特异性的自身抗体以及甲状腺被淋巴细胞和其他单个核细胞浸润^[1]。EAT 被认为是一种由 CD4⁺ T 细胞介导的器官特异性自身免疫病, 但自身反应性 CD4⁺ T 细胞如何产生以及以何种机制引起甲状腺损伤, 目前仍不完全清楚。研究发现 HT 患者甲状腺上皮细胞异常表达 MHC II 类分子 (major histocompatibility complex class II molecules)^[2-3], 而且表达 MHC II 类分子的甲状腺上皮细胞具有抗原递呈功能^[4], 因此推测其可能为自身反应性 T 细胞的活化提供第一信号, 引发甲状腺损伤。这提示抑制甲状腺 MHC II 类分子表达可能对 EAT 有治疗作用。MHC II 类分子反式激活因子 (class II transactivator, C II TA) 是调控 MHC II 类分子表达的最关键因子之一, 在转录水平上控制着 MHC II 类分子的表达, 从而影响与 MHC II 类分子相关的免疫功能^[5], 是干预 MHC II 类分子功能的理想靶点。因此, Cai 等^[6] 尝试应用腺病毒介导的 C II TA 反义 RNA 治疗实验性自身免疫性心肌炎, 并取得较好的治疗效果。

我们前期成功构建了 C II TA 缺失型突变体 (C II TAm) 及其重组腺病毒 Ad-CMV-C II TAm^[7], 并且证实其在体外能有效抑制 MHC II 类分子的表达^[8]。本研究进一步将 Ad-CMV-C II TAm 重组腺病毒应用于治疗 EAT 模型小鼠, 观察其对自身免疫性甲状腺炎的治疗效果, 并探讨其可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂 Ad-CMV-C II TAm 重组腺病毒和

Ad-GFP 对照腺病毒由本实验室构建、保存并扩增纯化^[7], 猪甲状腺球蛋白 (porcine thyroglobulin, pTg)、弗氏佐剂 (complete or incomplete Freund adjuvant, CFA/IFA) 和刀豆蛋白 A (concanavalin A, ConA) 购自 Sigma 公司, 淋巴细胞分离液 (Ficoll) 购自上海试剂二厂, ³H-TdR 购自中科院原子能研究所, 大鼠抗小鼠 MHC II 单克隆抗体购自 NeoMarker 公司, HRP-羊抗大鼠 IgG 单克隆抗体购自 SBA 公司, 小鼠细胞因子 ELISA 测定试剂盒及流式细胞术所用标记抗体购自 eBioscience 公司。

1.2 动物分组及处理 CBA/J (H-2^k) 小鼠, 雌性, 6~8 周龄, 体质量 (20 ± 5) g, 购于中国科学院上海实验动物中心。小鼠随机分为 EAT 模型组 ($n=8$)、C II TAm 治疗组 ($n=9$)、GFP 对照组 ($n=9$) 和正常对照组 ($n=5$)。EAT 模型组、C II TAm 治疗组及 GFP 对照组小鼠采用 pTg+CFA/IFA 的方法建立 EAT 模型^[9]: 于第 1 日皮下多点注射 0.1 mg pTg 与 100 μl CFA 混合的乳化抗原, 于第 8 日皮下多点注射 0.1 mg pTg 与 100 μl IFA 混合的乳化抗原。于第 15~17 日分别尾静脉注射生理盐水、Ad-CMV-C II TAm、Ad-GFP。每只小鼠注射病毒的单次剂量均为 5×10^9 viral particles (vp), 1 次/d, 连续 3 d。第 29 日处死小鼠。

1.3 甲状腺组织 H-E 及免疫组织化学检查 取甲状腺立即制备冰冻病理切片备用。取甲状腺冰冻病理切片, H-E 染色后检查甲状腺组织病理改变, 参照文献^[9] 将甲状腺淋巴细胞浸润指数评为 0~4 分 (0: 无炎细胞浸润; 1: 炎细胞分布于 2 个或多个滤泡; 2: 1~2 个炎性细胞灶达 1 个滤泡大小; 3: 炎性细胞取代了 10%~40% 的甲状腺; 4: 炎性细胞取

代了 40% 以上的甲状腺)。取甲状腺冰冻病理切片,按免疫组化试剂说明书检测 MHC II 类分子(I-A^k)的表达,DAB 显色,苏木精复染,细胞膜或细胞质呈棕黄色着色为阳性。

1.4 脾脏淋巴细胞增殖试验及其培养上清中 IFN- γ 的测定

1.4.1 淋巴细胞增殖试验 取小鼠脾脏组织,无菌挤压制成细胞悬液,用 Ficoll 液分离单个核细胞。将单个核细胞悬液细胞密度调整至 5×10^6 /ml 后铺板,分为 3 组,分别以 80 μ g/ml pTg、2 μ g/ml ConA 及等体积的完全 RPMI 1640 培养基刺激,37 $^{\circ}$ C、CO₂ 体积分数 5% 培养 48 h 后加入 ³H-TdR,继续培养 16~20 h,收集细胞至玻璃纤维膜上并烘干,加入液闪液,测定放射性活度,以 RPMI 1640 组为对照管计算刺激指数(stimulation index, SI),即测定管放射性活度与对照管放射性活度的比值。

1.4.2 培养上清中 IFN- γ 测定 分离脾脏单个核细胞,密度调整至 5×10^6 /ml 后铺种到 96 孔板,用 80 μ g/ml pTg 刺激下,37 $^{\circ}$ C、CO₂ 体积分数 5% 条件下培养 48 h 后收集细胞培养上清液,采用 ELISA 双抗体夹心法检测 IFN- γ 的表达。以 450 nm 波长在酶标仪上比色,绘制标准曲线,测定具体浓度。

1.5 血浆抗-pTg 自身抗体检测 各组小鼠眼球后取血抗凝并分离血浆。以 5 μ g/ml pTg 包被 96 孔反应板,用 PBS 将血浆稀释成 1 : 3 200,用 ELISA 法检测血浆中抗-pTg 自身抗体滴度,以 450 nm 波

长在酶标仪上比色。

1.6 T 淋巴细胞上可诱导共刺激分子(inducible costimulator, ICOS)的检测 取小鼠外周血 50 μ l 和约 10^6 个脾脏单个核细胞,以 PE-anti-mouse ICOS、APC-anti-mouse CD3 和 PE/CY5-anti-mouse CD4 共 3 种抗体进行标记。操作步骤按抗体试剂盒说明书进行,流式细胞仪(Calibur, BD)检测,CellQuest 软件分析 T 细胞上 ICOS 的表达。

1.7 统计学处理 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行单因素方差分析及均值多重比较分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 甲状腺组织病理改变 正常对照组甲状腺滤泡呈圆形或椭圆形,上皮细胞呈低柱状,无淋巴细胞浸润;EAT 模型组与 GFP 对照组病理改变极为相似,上皮细胞肿胀,体积增大,胞质嗜酸性,甲状腺组织中有灶性或弥漫性淋巴细胞浸润,伴甲状腺滤泡萎缩;C II TAm 治疗组甲状腺炎细胞浸润明显减轻(图 1)。EAT 模型组、C II TAm 治疗组、GFP 对照组及正常对照组淋巴细胞浸润指数分别为 1.4 ± 0.4 、 0.3 ± 0.5 、 1.5 ± 0.2 和 0。EAT 模型组和 GFP 对照组病理改变重于正常对照组,差异具有统计学意义($P < 0.01$),而 C II TAm 治疗组病理损伤较 EAT 模型组和 GFP 对照组显著减轻,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

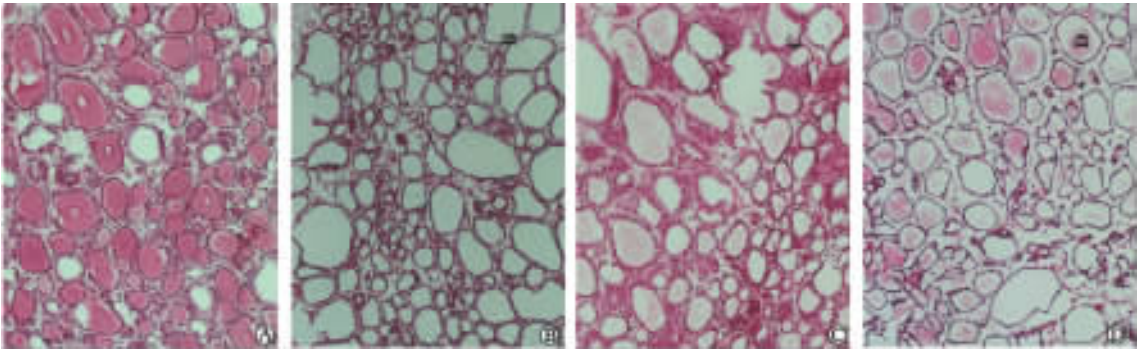


图 1 EAT 模型组(A)、C II TAm 治疗组(B)、GFP 对照组(C)及正常对照组(D)小鼠甲状腺组织 H-E 染色结果
Fig 1 Pathologic changes in thyroid of EAT model group(A), C II TAm therapy group(B), GFP control group(C) and normal control group(D)
H-E, Original magnification: $\times 100$

2.2 甲状腺细胞 MHC II 类分子的表达结果 正常对照组甲状腺几乎没有 MHC II 类分子表达;而 EAT 模型组和 GFP 对照组甲状腺内甲状腺滤泡上

皮细胞和浸润的淋巴细胞均有弥漫性 MHC II 类分子表达;C II TAm 治疗组小鼠甲状腺组织未见 MHC II 类分子明显表达(图 2)。

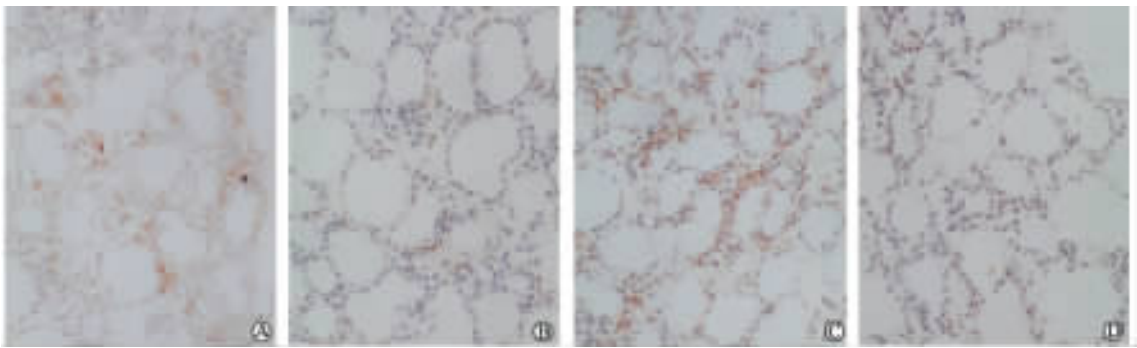


图 2 EAT 模型组(A)、CⅡ TAm 治疗组(B)、GFP 对照组(C)及正常对照组(D)小鼠甲状腺组织中 MHC II 类分子的表达

Fig 2 MHC II molecule expression in thyroid of EAT model group(A) ,CⅡ TAm therapy group(B) , GFP control group (C) and normal control group (D)

Immunohistochemistry,Original magnification:×200

2.3 脾脏淋巴细胞的增殖 80 μg/ml pTg 刺激下,与正常对照组相比,EAT 模型组和 GFP 对照组小鼠淋巴细胞的刺激指数(SI)均显著升高,差异具有统计学意义($P<0.01$);CⅡ TAm 治疗组比 EAT 模型组或 GFP 对照组显著下降,差异具有统计学意义($P<0.05$),而与正常对照组无统计学差异。2 μg/ml ConA 刺激下,各组间 SI 没有统计学差异。详见表 1。

表 1 各组小鼠脾脏淋巴细胞在 pTg(80 μg/ml)或 ConA(2 μg/ml)刺激下的刺激指数

Tab 1 Stimulation index (SI) of spleen lymphocytes with pTg (80 μg/ml) or ConA (2 μg/ml) in different groups

($\bar{x}\pm s$)

Group	n	pTg	ConA
EAT model	8	3.42±0.35**△	42.1±6.7
CⅡ TAm therapy	9	1.84±0.25	41.5±9.4
GFP control	9	3.45±0.56**△	42.8±10.4
Normal control	5	0.95±0.22	37.4±6.6

** $P<0.01$ vs normal control group; △ $P<0.05$ vs CⅡ TAm therapy group

2.4 淋巴细胞培养上清中 IFN-γ 表达 80 μg/ml pTg 刺激后,与正常对照组相比,其余各组小鼠脾脏淋巴细胞培养上清中 IFN-γ 水平(pg/ml)均显著升高,差异具有统计学意义($P<0.05$ 或 0.01);且 EAT 模型组、GFP 对照组明显高于 CⅡ TAm 治疗组,差异具有统计学意义($P<0.01$)。详见表 2。

2.5 血浆抗-pTg 自身抗体滴度测定结果比较 在 1:3 200 稀释度条件下,EAT 模型组、CⅡ TAm 治疗组、GFP 对照组小鼠血浆中抗-pTg 自身抗体滴度(D_{450})比正常对照组显著升高($P<0.01$);且 EAT 模型组、GFP 对照组明显高于 CⅡ TAm 治疗组,差异具有统计学意义($P<0.01$)。详见表 2。

2.6 $CD4^{+}T$ 淋巴细胞 ICOS 分子的表达 无论外周血还是脾脏,EAT 模型组、CⅡ TAm 治疗组、GFP 对照组 $CD4^{+}T$ 淋巴细胞 ICOS 分子表达的阳性率均明显高于正常对照组,差异具有统计学差异($P<0.01$);且 EAT 模型组、GFP 对照组明显高于 CⅡ TAm 治疗组,具有统计学差异($P<0.01$);而 EAT 模型组和 GFP 对照组之间无统计学差异。详见表 2。

表 2 小鼠脾脏淋巴细胞培养上清中 IFN-γ 水平、血浆抗-pTg 自身抗体滴度及 $CD4^{+}T$ 淋巴细胞 ICOS 阳性表达率的测定结果

Tab 2 IFN-γ secretion in supernants of spleen lymphocytes,titer of plasma anti-pTg autoantibody, and positive rate of ICOS on $CD4^{+}T$ cells in both peripheral blood and spleen

($\bar{x}\pm s$)

Group	n	IFN-γ $\rho_B/(pg\cdot ml^{-1})$	Titer of anti-pTg autoantibody(D_{450})	ICOS positive rate(%)	
				Peripheral blood	Spleen
EAT model	8	665±156**△△	0.635±0.104**△△	16.4±1.4**△△	7.4±0.6**△△
CⅡTAm therapy	9	346±84*	0.412±0.142**	11.4±1.8**	6.0±1.2**
GFP control	9	692±159**△△	0.584±0.056**△△	16.7±0.9**△△	7.7±0.9**△△
Normal control	5	186±40	0.170±0.041	5.4±1.2	3.6±0.8

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs normal control group; △△ $P<0.01$ vs CⅡTAm therapy group

3 讨论

CII TA 是调控 MHC II 类分子表达的最主要转录分子之一,决定着 MHC II 类分子表达的有无和高低。氨基酸结构根据组成及功能特点,常可分为 4 个区域:氨基端富含酸性氨基酸区域,具有强烈的反式激活作用;富含脯氨酸、丝氨酸和苏氨酸区域,具有辅助激活活性;GTP 结合区域,能与 GTP 结合;羧基端富含亮氨酸区域,含核定位序列^[5]。我们前期^[7]构建的 CII TA 突变体(CII TAm)仅在反式激活功能区缺失了部分氨基酸,而保留了其他区域特别是 GTP 结合区和羧基端富含亮氨酸区域。因为这两个区域对 CII TAm 在细胞质表达后进入细胞核内行使竞争抑制功能至关重要^[10-11]。在体外实验中,重组腺病毒 Ad-CMV-CII TAm 能抑制细胞上 MHC II 类分子的表达^[8],但它对 EAT 的治疗效果尚不可知。

本研究结果表明,经 Ad-CMV-CII TAm 处理的 EAT 小鼠甲状腺组织中炎性细胞浸润减轻,血浆中自身抗体滴度下降。这说明 Ad-CMV-CII TAm 可以抑制 EAT 小鼠的甲状腺炎症反应和自身免疫应答,具有治疗作用。进一步应用免疫组化的方法对甲状腺组织 MHC II 类分子的表达水平进行了检测,结果发现正常对照组小鼠甲状腺 MHC II 类分子表达呈阴性,而 EAT 模型和 GFP 对照组甲状腺组织呈明显阳性表达。这与人类 HT 患者的检测结果相似^[2-3]。Wu 等^[4]认为,MHC II 类分子的异常表达使甲状腺上皮细胞变成抗原递呈细胞,将甲状腺过氧化物酶(TPO)等自身抗原递呈给 CD4⁺ T 细胞,从而引起或加重自身免疫反应乃至免疫损伤。Kimura 等^[12]研究证实,MHC II 类分子高表达会加重 EAT 症状。本研究结果发现,CII TAm 治疗组小鼠甲状腺 MHC II 类分子表达明显减轻,也进一步支持了上述观点。

MHC II 类分子最重要的功能就是把抗原递呈给 CD4⁺ T 细胞并使后者活化。本研究的淋巴细胞增殖试验和 ICOS 分子表达的检测结果显示:经自身抗原 pTg 刺激, EAT 模型组和 GFP 对照组小鼠脾脏淋巴细胞的增殖明显强于正常对照组;二者外周血和脾脏淋巴细胞中 CD4⁺ ICOS⁺ T 细胞比例显著升高。由于 CD4⁺ T 细胞的 ICOS 分子表达只出现于该细胞活化之后^[13],以上结果表明,在 EAT 发病过程中 T 细胞的活化增强了,同时自身反应性 T 细胞也发生了明显增殖,导致进一步免疫损伤的产生。经过 Ad-CMV-C

II TAm 治疗后,上述指标都表现出显著下降,这提示 Ad-CMV-CII TAm 可能通过下调 MHC II 类分子的表达,抑制了 EAT 小鼠自身反应性 CD4⁺ T 细胞的活化和增殖。

体内上皮细胞和内皮细胞上 MHC II 类分子的表达需要依赖 IFN- γ 诱导^[5]。本实验结果显示,EAT 模型组和 GFP 对照组小鼠脾脏淋巴细胞分泌 IFN- γ 水平明显高于正常组和 CII TAm 治疗组。国外研究^[14-15]表明,HT 患者甲状腺组织中浸润的淋巴细胞以及外周血淋巴细胞主要是分泌 IFN- γ 的 Th1 细胞。Yu 等^[16]还发现,甲状腺上皮细胞能否对 IFN- γ 产生应答对易感小鼠是否能自发产生淋巴细胞性自身免疫性甲状腺炎十分关键。本研究结果发现 Ad-CMV-CII TAm 腺病毒下调了 EAT 小鼠脾脏淋巴细胞的 IFN- γ 分泌,一方面可能会导致 IFN- γ 对甲状腺上皮细胞 MHC II 类分子表达的诱导作用减弱,从而减轻自身抗原的递呈以及 T 细胞的活化,进而减轻炎症反应^[17];另一方面也可能导致 IFN- γ 对巨噬细胞的激活作用减弱,使致炎细胞因子 IL-1、IFN- γ 的分泌减少,减轻炎症反应^[18]。

综上所述,本研究证实重组腺病毒 Ad-CMV-CII TAm 能抑制 EAT 小鼠甲状腺组织中 MHC II 类分子表达,降低自身反应性 T 细胞的活化、增殖和 IFN- γ 分泌水平,从而减轻甲状腺炎性细胞浸润,降低自身抗体滴度,对 EAT 有一定的治疗作用,但具体作用机制仍有待进一步的研究探讨。

[参考文献]

- [1] Ciháková D, Sharma R B, Fairweather D, Afanasyeva M, Rose N R. Animal models for autoimmune myocarditis and autoimmune thyroiditis[J]. *Methods Mol Med*, 2004, 102:175-193.
- [2] Turesson C. Endothelial expression of MHC class II molecules in autoimmune disease[J]. *Curr Pharm Des*, 2004, 10:129-143.
- [3] Yu M, Xu M, Savas L, Khan A. Discordant expression of Ii and HLA-DR in thyrocytes; a possible pathogenetic factor in Hashimoto's thyroiditis[J]. *Endocr Pathol*, 1998, 9:201-208.
- [4] Wu Z, Biro P A, Mirakian R, Hammond L, Curcio F, Ambesi-Impimbato F S, et al. HLA-DMB expression by thyrocytes; indication of the antigen-processing and possible presenting capability of thyroid cells[J]. *Clin Exp Immunol*, 1999, 116:62-69.
- [5] Reith W, Leibundgut-Landmann S, Waldburger J M. Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator[J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5:793-806.
- [6] Cai G, Zhang J, Liu L, Shen Q. Successful treatment of experimental autoimmune myocarditis by adenovirus-mediated gene transfer of antisense CII TA[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2005, 38:593-605.

[7] 管 政,沈 茜.用优化的 OE-PCR 法构建 CIIITA 中间缺失突变体[J]. 第二军医大学学报,2006,27:1014-1017.

[8] 管 政,张 军,沈 茜.腺病毒介导 CIIITA 突变体基因转移抑制 MHCII类分子表达的体外研究[J]. 中国免疫学杂志,2007,23:872-877.

[9] Zhang Z L,Lin B,Yu L Y,Guo L H. CMV-hFasL transgenic mice prevent from experimental autoimmune thyroiditis[J]. Chin Med J (Engl),2005,118:1087-1092.

[10] Raval A,Weissman J D,Howcroft T K,Singer D S. The GTP-binding domain of class II transactivator regulates its nuclear export[J]. J Immunol,2003,170:922-930.

[11] Camacho-Carvajal M M,Klingler S,Schnappauf F,Hake S B,Steimle V. Importance of class II transactivator leucine-rich repeats for dominant-negative function and nucleo-cytoplasmic transport[J]. Int Immunol,2004,16:65-75.

[12] Kimura H,Kimura M,Tzou S C,Chen Y C,Suzuki K,Rose N R,et al. Expression of class II major histocompatibility complex molecules on thyrocytes does not cause spontaneous thyroiditis but mildly increases its severity after immunization[J]. Endocrinology, 2005, 146:1154-1162.

[13] Beier K C,Hutloff A,Dittrich A M,Heuck C,Rauch A,Buchner K,et al. Induction, binding specificity and function of human ICOS[J]. Eur J Immunol,2000,30:3707-3717.

[14] Roura-Mir C,Catálfamo M,Sospedra M,Alcalde L,Pujol-Borrell R, Jaraquemada D. Single-cell analysis of intrathyroidal lymphocytes shows differential cytokine expression in Hashimoto's and Graves' disease[J]. Eur J Immunol,1997,27:3290-3302.

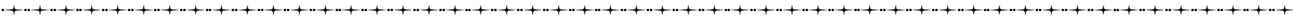
[15] Colin I M,Isaac J,Dupret P,Ledant T,D'Hautcourt J L. Functional lymphocyte subset assessment of the Th1/Th2 profile in patients with autoimmune thyroiditis by flowcytometric analysis of peripheral lymphocytes[J]. J Biol Regul Homeost Agents,2004,18:72-76.

[16] Yu S,Sharp G C,Braley-Mullen H. Thyrocytes responding to IFN-gamma are essential for development of lymphocytic spontaneous autoimmune thyroiditis and inhibition of thyrocyte hyperplasia[J]. J Immunol,2006,176:1259-1265.

[17] Tsai Y C,Hsieh H J,Liao F,Ni C W,Chao Y J,Hsieh C Y,et al. Laminar flow attenuates interferon-induced inflammatory responses in endothelial cells[J]. Cardiovasc Res,2007,74:497-505.

[18] Chen K,Wei Y,Sharp G C,Braley-Mullen H. Decreasing TNF-alpha results in less fibrosis and earlier resolution of granulomatous experimental autoimmune thyroiditis[J]. J Leukoc Biol, 2007,81:306-314.

[本文编辑] 贾泽军



• 书 讯 •

《2008 药师(药剂士)职称考试强化训练习题集》已出版

本书由陶文明、孙华君等主编,第二军医大学出版社出版,ISBN 978-7-8106-0812-1,16 开,定价 80.00 元。

本书根据卫生部考试中心编写的考试大纲和考试指南,由多名多年从事考前辅导的专家根据多年辅导经验,结合近年来的考试题型和内容精心编写的。主要包含药物化学、天然药物化学、药剂学、生物药剂学、药物分析、临床药理学、药事管理与法规等七部分内容。每个部分包含有考试中的基础知识、相关专业知识、专业知识和专业实践能力四个部分,旨在指导复习,有助于读者在晋升药师(药剂士)的考试中取得好成绩。

本书题量大,范围广,根据考试题型,主要分为 A 型、B 型、X 型题三大类。A 型题为最佳选择题,每题只有一个标准参考答案;B 型题即配伍题,指若干组考题共同使用五个备选参考答案,从中选择一个最佳答案;X 型题即多项选择题,每道试题有多个参考答案。每章节末备有参考答案,以便读者检验复习情况。供参加药师(药剂士)考试的备考者使用。

本书由第二军医大学出版社发行科发行,全国各大新华书店均有销售。

通讯地址:上海市翔殷路 800 号,邮编:200433

邮购电话:021-65344595,65493093

<http://www.smmup.com>