

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2022.04.014

健脾益气摄血方对原发免疫性血小板减少症模型小鼠肠道免疫的影响

黄子明¹, 侯丽¹, 郎海燕², 何昊³, 王冲¹, 南梦蝶¹, 谢美雯¹, 张雅月¹✉

1. 北京中医药大学东直门医院, 北京市东城区海运仓5号, 100700; 2. 北京中医药大学东方医院; 3. 陕西省西安医学院

[摘要] **目的** 探讨健脾益气摄血方治疗原发免疫性血小板减少症 (ITP) 的可能效应机制。**方法** 30 只 BALB/c 小鼠随机分为正常组, 模型组, 强的松组和健脾益气摄血中、高剂量组, 每组 6 只。除正常组外, 其余各组小鼠使用豚鼠抗小鼠血小板血清 (GP-APS) 注射法建立 ITP 小鼠模型。造模成功后第 8 天, 正常组、模型组均予 0.1 ml/10 g 生理盐水灌胃, 强的松组给予浓度为 2 mg/ml 强的松溶液 0.1 ml/10 g 灌胃, 健脾益气摄血组中、高剂量组分别给予健脾益气摄血方颗粒剂 4.1、8.2 mg/g 灌胃。各组均每日 1 次, 共灌胃 8 天。使用免疫浊度法检测小鼠肠黏液中分泌型免疫球蛋白 A (sIgA) 含量, 免疫组化法检测小鼠肠系膜淋巴结淋巴细胞 P53 蛋白表达, TUNEL 法检测小鼠肠系膜淋巴结淋巴细胞凋亡率, 流式细胞术观察小鼠肠系膜淋巴结淋巴细胞周期的变化。**结果** 与正常组比较, 模型组小鼠肠黏液中 sIgA 含量降低, 肠系膜淋巴结淋巴细胞 P53 蛋白表达升高, 淋巴细胞凋亡率升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 强的松组及健脾益气摄血中、高剂量组 sIgA 均升高, p53 蛋白表达降低, 淋巴细胞凋亡率均显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 健脾益气摄血高剂量组 sIgA 含量明显高于健脾益气摄血中剂量组和强的松组 ($P < 0.01$), 健脾益气摄血高剂量组和强的松组淋巴细胞凋亡率均低于健脾益气摄血中剂量组 ($P < 0.01$); 各组小鼠淋巴细胞周期分布差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 健脾益气摄血方治疗 ITP 效应机制可能与调控肠黏液中 sIgA 含量及肠系膜淋巴结淋巴细胞中 P53 蛋白表达, 降低淋巴细胞凋亡率, 改善肠道免疫功能有关, 且具有一定的量效关系。

[关键词] 原发免疫性血小板减少症; 健脾益气摄血方; 肠道免疫; 免疫球蛋白; P53 蛋白; 淋巴细胞; 细胞凋亡; 细胞周期

原发免疫性血小板减少症 (primary immune thrombocytopenia, ITP) 是一种原因不明的获得性自身免疫性疾病, 以无明确诱因的孤立性外周血血小板计数减少为主要特点, 是临床上最常见的出血性疾病^[1]。ITP 的确切发病机制尚未明确, 目前普遍认为, 其主要发病机制为血小板自身抗原免疫耐受性丢失, 导致体液和细胞免疫异常活化, 共同介导血小板破坏加速及巨核细胞产生血小板不足^[2]。基于中医理论我们认为, ITP 发病与脾气亏虚、脾不统血关系密切, 以健脾益气摄血为治疗原则拟定健脾益气摄血方。前期研究显示, 健脾益气摄血方

在提高 ITP 治愈率、改善出血症状、提升血小板数值方面表现较好^[3], 可能与调控 β -内啡肽、血管活性肠肽、5-羟色胺等血液神经递质相关^[4]。肠道是人体最大的免疫器官, 人体内 70%~80% 免疫细胞分布于肠道, 肠相关淋巴组织是肠淋巴组织及淋巴细胞聚集区, 参与免疫应答的启动及免疫耐受的诱导^[5], 因此调控肠道免疫功能可在防治 ITP 中发挥作用。本研究从肠道免疫功能失调角度探讨健脾益气摄血方治疗 ITP 的可能效应机制, 为 ITP 的中医药临床治疗提供依据。本研究经过陕西省西安医学院动物伦理委员会批准, 编号: XYLS2019069。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级 BALB/c 小鼠 36 只, 雌雄各半, 体质量

基金项目: 国家自然科学基金 (81703903); 北京中医药大学东直门医院育苗人才培养计划 (DZMYS-201807)

✉ 通讯作者: yayuezhang@126.com, 13811061696

18~22 g, 8 周龄, 购于空军军医大学实验动物中心, 实验动物许可证号: SCXK (陕) 2014-002, 在西安医学院 SPF 级实验室 IVC 鼠笼中饲养。豚鼠 10 只, 3 月龄, 雌性, 体质量 240~260 g, 购于兴平市天瑞实验动物养殖场, 实验动物许可证号: SCXK (陕) 2012-001, 普通环境饲养。

1.2 药物

健脾益气摄血方组成: 黄芪 20 g, 党参 15 g, 茯苓 15 g, 白术 10 g, 阿胶 15 g, 茜草 10 g, 炙甘草 6 g。成方颗粒剂由西安兴化药物研究所制备并提供 (批号: 20140322)。强的松 (上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 规格: 1 g/片, 批号: 28778)。

1.3 主要试剂与仪器

完全弗氏佐剂 (批号 SLBF2619V)、不完全弗氏佐剂 (批号 SLBH7317V), 美国 Sigma-Aldrich 公司; PBS 磷酸盐缓冲液 (批号 ZLI-9062)、山羊抗兔工作液 (批号 SP-9001)、浓缩型 DAB 试剂盒 (批号 K135925C), 北京中杉金桥生物有限公司; DAPI 染色液 (北京雷根生物有限公司, 批号 DA0001); 苏木素 (北京百灵威科技有限公司, 批号 LM10N13); 小鼠免疫球蛋白检测试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司, 批号 SEKM-0094); 兔抗 P53 多克隆抗体 (ABclonal 公司, 批号 A3185); TUNEL 试剂盒 (瑞士 Roche Group 公司, 批号 11684795910); 细胞周期检测试剂盒 (江苏凯基生物科技股份有限公司, 批号 20200610)。

XFA6130 型全自动动物血液分析仪 (中国普朗医疗集团); TSJ-Ⅱ 型全自动封闭式组织脱水机、PHY-Ⅲ 型病理组织漂烘仪 (中国常州市中威电子仪器有限公司); BMJ-Ⅲ 型包埋机 (中国常州市中威电子仪器有限公司); Panoramic 250 型数字切片扫描仪 (中国济南丹吉尔电子有限公司); TDZ4-WS 型台式低速离心机 (中国长沙湘仪离心机仪器有限公司); BA400 型数码三目摄像显微镜 (麦克奥迪实业集团有限公司); Multiskan GO 型全波长酶标仪 (美国 Thermo Fisher 公司); Cytotflex 型流式细胞仪 (美国 Beckman 公司)。

1.4 分组与模型制备

实验前先将 18 只雄性小鼠从 1 到 18 编号, 然后通过 Excel 2016 随机数函数公式产生 18 个随机数与小鼠一一对应, 按从小到大排列, 剔除其中排第 6、12、18 的 3 只小鼠。雌性小鼠以相同方法剔除, 最终得到 30 只小鼠进行实验。30 只小鼠尾静脉取血, 用全自动血液分析仪检测血小板数, 按照血小

板计数采用区间分组法随机分组, 分为正常组, 模型组, 强的松组和健脾益气摄血中、高剂量组, 每组 6 只, 雌雄各 3 只。小鼠各按血小板计数从小到大排列, 顺序分成 3 个区, 在每个区中, 使用 Excel 2016 产生随机数字, 对应每组血小板计数, 将区内随机数字排序, 从小到大分别标注为 1、2、3、4、5, 1 号为正常组, 2 号为模型组, 3 号为强的松组, 4 号为健脾益气摄血中剂量组, 5 号为健脾益气摄血高剂量组。

除正常组外, 其余各组小鼠使用豚鼠抗小鼠血小板血清 (GP-APS) 注射法建立 ITP 小鼠模型^[6], 方法如下: 将剩余 6 只 BALB/c 小鼠麻醉取抗凝全血, 梯度离心 (常温 1100 r/min 离心 10 min, 3000 r/min 离心 10 min, 离心半径 6 cm) 得到血小板, 用 PBS 调整浓度至 $2.5 \times 10^6/\text{ml}$, 分别与等量完全弗氏佐剂和不完全弗氏佐剂混匀作为抗原, 于造模第 0 周注射含完全弗氏佐剂抗原于豚鼠足掌、背及腹部皮下, 共 5 点, 合计 1 ml; 分别于造模第 1、2、4 周按上述相同部位与点数注射含不完全弗氏佐剂抗原 1 次。造模第 5 周从豚鼠心脏取不抗凝全血, 离心 (常温 1000 r/min 离心 10 min, 离心半径 6 cm) 取上清, 即得 GP-APS。56 °C 水浴灭活补体, 红细胞吸附, 最后用生理盐水稀释成 1:4 浓度 GP-APS 备用。然后除正常组按 100 μl /20 g 腹腔注射生理盐水外, 其余各组均按 100 μl /20 g 剂量隔日向小鼠腹腔内注射 GP-APS, 重复注射至造模结束, 共注射 8 次。依据病证结合模型辨识标准^[6]判定造模是否成功。

1.5 给药方法

造模成功后第 8 天, 正常组、模型组小鼠予生理盐水 0.1 ml/10 g 体积灌胃, 强的松组给予浓度为 2 mg/ml 强的松溶液 0.1 ml/10 g 灌胃, 健脾益气摄血中剂量组小鼠给予健脾益气摄血方颗粒剂 4.1 mg/g (相当于体重 70 kg 成人健脾益气摄血方 1 剂的药量) 灌胃, 健脾益气摄血方高剂量组给予成人剂量的 2 倍, 即 8.2 mg/g。各组均每日灌胃 1 次, 共 8 天。

1.6 观察指标与方法

1.6.1 免疫浊度法检测肠黏液中分泌型免疫球蛋白 A (sIgA) 含量 最后一次给药 24 h 后, 麻醉小鼠后解剖取完整小肠, 平铺于冰面滤纸上纵行剖开, 用 PBS 反复冲洗肠腔面除去杂质。用玻片轻刮肠腔表面, 滴管定量吸取刮取物 0.1 ml, 加入 1.5 ml 的 PBS 充分混匀, 反复低温离心, 取上清, 加反应

试剂后用酶标仪 340 nm 波长处测定其吸光度，用吸光度表示免疫球蛋白含量。

1.6.2 免疫组化法检测肠系膜淋巴结淋巴细胞 P53 蛋白表达 小鼠解剖后分离出肠系膜淋巴结组织，4% 多聚甲醛固定。固定组织经全自动脱水机脱水，包埋，切片，脱蜡；PBS 洗 3 次后加入柠檬酸盐缓冲液进行抗原修复，随后滴加山羊血清封闭 20 min；滴加一抗（浓度 1:50），4℃过夜；滴加生物素化二抗（浓度 1:200），37℃温箱静置 30 min；PBS 洗涤 3 次，加入 DAB 显色；蒸馏水冲洗，使用苏木素轻度复染，脱水，中性树胶封片。置于显微镜下进行图像采集，测定图像的光密度和面积，计算每张图像的平均光密度。

1.6.3 TUNEL 法检测肠系膜淋巴结淋巴细胞凋亡率 将淋巴组织切片常规脱蜡至水，用柠檬酸微波修复 8 min，然后 PBS 洗 3 次；暗处配制荧光 TUNEL 孵育液 37℃孵育 1 h；PBS 洗 3 次后加 DAPI 染核 15 min，PBS 冲洗后，甘油明胶封片，-20℃保存；最后采用数字切片扫描仪进行图像采集，并测定图像的光密度和面积，细胞凋亡率=全部图像的光密度/面积×100%。

1.6.4 流式细胞术观察肠系膜淋巴结淋巴细胞周期的变化 将淋巴结组织置于玻璃平皿中漂洗干净后，用眼科剪剪成小块，用研磨器轻轻研磨，收集细胞悬液用 200 目细胞筛过滤，离心弃上清，用 PBS 洗涤 2 次，离心收集细胞沉淀备用。加入 75% 冰乙醇溶液重悬细胞，-20℃固定过夜。PBS 洗涤，离心弃上清，获得细胞沉淀。根据细胞周期检测试剂盒步骤进行，使用流式细胞仪检测。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件处理数据，计量资料均符合正态分布，以均数±标准差（ $\bar{x}\pm s$ ）表示，多组比较采用单因素方差分析，组间两两比较用 LSD 检验。以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠肠黏液中 sIgA 含量比较

表 1 示，模型组小鼠肠黏液中 sIgA 含量明显低于正常组（ $P<0.01$ ）；强的松组和健脾益气摄血中、高剂量组 sIgA 含量较模型组均明显升高（ $P<0.01$ ）；健脾益气摄血高剂量组 sIgA 含量明显高于健脾益气摄血中剂量组和强的松组（ $P<0.01$ ）；健脾益气摄血中剂量组与强的松组之间 sIgA 含量差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）。

表 1 各组小鼠肠黏液中 sIgA 含量比较（吸光度值， $\bar{x}\pm s$ ）

组别	鼠数	sIgA 含量
正常组	6	0.516±0.043
模型组	6	0.243±0.022 ^{a)}
强的松组	6	0.346±0.033 ^{b)}
健脾益气摄血中剂量组	6	0.325±0.024 ^{b)}
健脾益气摄血高剂量组	6	0.419±0.016 ^{b) c) d)}

注：sIgA，分泌型免疫球蛋白 A。

a) 与正常组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与强的松组比较， $P<0.01$ ；d) 与健脾益气摄血中剂量组比较， $P<0.01$ 。

2.2 各组小鼠肠系膜淋巴结淋巴细胞 P53 蛋白表达比较

图 1（彩图请扫描本文二维码获取）示，阴性细胞呈蓝色，底物呈白色，阳性细胞呈黄色或棕黄色，P53 阳性产物主要分布在细胞核、细胞质及细胞间质。正常组阳性产物表达较少，模型组阳性产物表达较多，强的松组和健脾益气摄血中、高剂量组阳性产物表达均较模型组减少。表 2 示，与正常组比较，模型组肠系膜淋巴结淋巴细胞 P53 蛋白表达明显升高（ $P<0.01$ ）；与模型组比较，强的松组和健脾益气摄血中、高剂量组小鼠肠系膜淋巴结淋巴细胞 P53 蛋白表达明显降低（ $P<0.05$ 或 $P<$

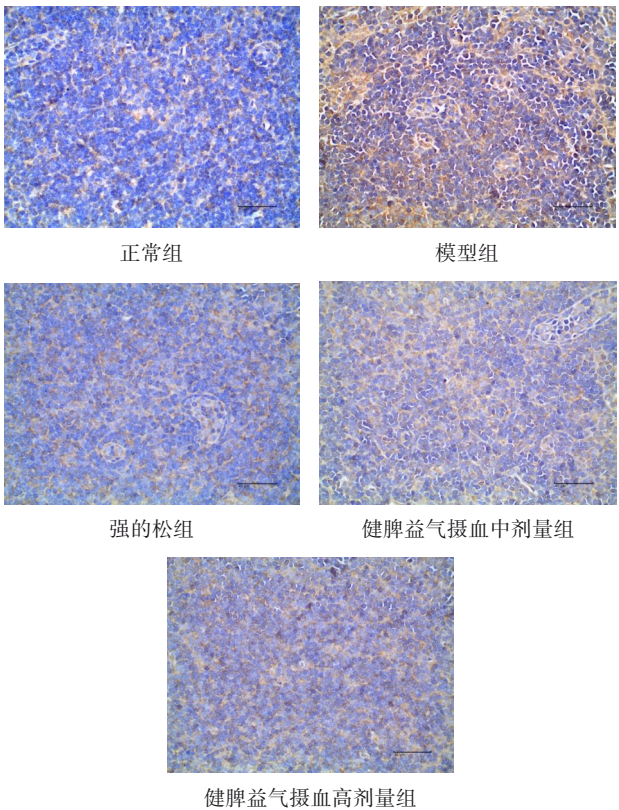


图 1 各组小鼠肠系膜淋巴结淋巴细胞 P53 蛋白表达（×400）

0.01); 各药物干预组之间 P53 蛋白表达差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

表2 各组小鼠肠系膜淋巴结淋巴细胞 P53 蛋白表达比较
(平均光密度值, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	P53 蛋白
正常组	6	0.2089 $\pm$ 0.0087
模型组	6	0.2515 $\pm$ 0.0275 ^{a)}
强的松组	6	0.2187 $\pm$ 0.0253 ^{b)}
健脾益气摄血中剂量组	6	0.2266 $\pm$ 0.0136 ^{c)}
健脾益气摄血高剂量组	6	0.2250 $\pm$ 0.0173 ^{c)}

注: a) 与正常组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$; c) 与模型组比较, $P<0.05$ 。

2.3 各组小鼠肠系膜淋巴结淋巴细胞凋亡率比较

图2(彩图请扫描本文二维码获取)示, 凋亡细胞核显绿光, 正常细胞核显蓝光。正常组几乎未见凋亡的细胞, 模型组可见一定数量的凋亡细胞, 强的松组和健脾益气摄血中、高剂量组可见少数凋亡细胞。表3示, 模型组小鼠肠系膜淋巴结淋巴细胞凋亡率明显高于正常组 ($P<0.01$); 与模型组比较, 强的松组和健脾益气摄血中、高剂量组淋巴细胞凋亡率明显下降 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 且健脾益气

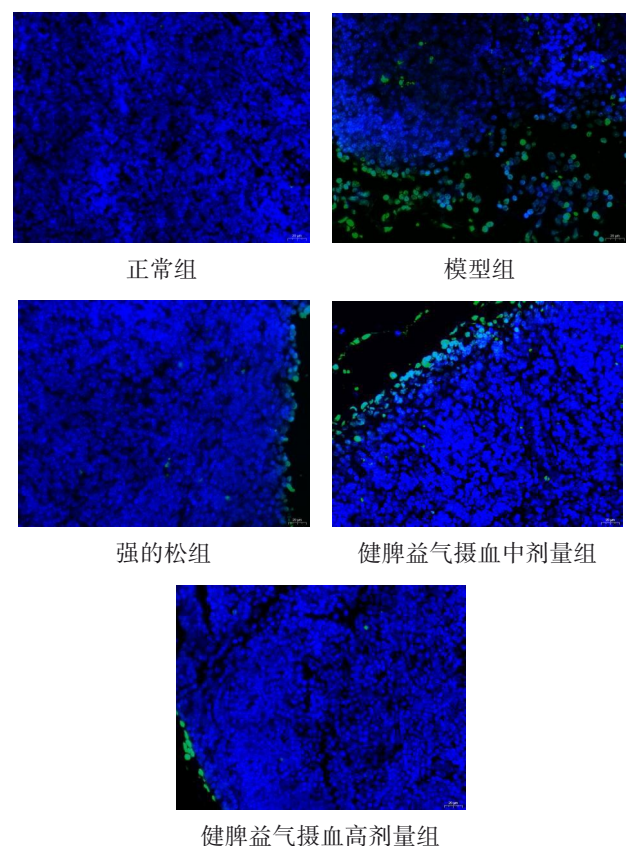


图2 各组小鼠肠系膜淋巴结淋巴细胞凋亡显微图像 ($\times 400$)

摄血高剂量组和强的松组淋巴细胞凋亡率均低于健脾益气摄血中剂量组 ($P<0.01$); 健脾益气摄血高剂量组与强的松组差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表3 各组小鼠肠系膜淋巴结淋巴细胞凋亡率比较
(%, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	细胞凋亡率
正常组	6	0.67 $\pm$ 0.43
模型组	6	21.69 $\pm$ 5.38 ^{a)}
强的松组	6	5.56 $\pm$ 2.07 ^{b) d)}
健脾益气摄血中剂量组	6	11.52 $\pm$ 2.84 ^{c)}
健脾益气摄血高剂量组	6	3.64 $\pm$ 0.86 ^{b) d)}

注: a) 与正常组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$; c) 与模型组比较, $P<0.05$; d) 与健脾益气摄血中剂量组比较, $P<0.01$ 。

2.4 各组小鼠肠系膜淋巴结淋巴细胞周期比较

表4示, 各组小鼠肠系膜淋巴结淋巴细胞的各细胞周期比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

表4 各组小鼠肠系膜淋巴结淋巴细胞的细胞周期变化比较
(%, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	G1 期	G2 期	S 期
正常组	6	51.19 $\pm$ 11.25	28.13 $\pm$ 7.56	20.69 $\pm$ 6.48
模型组	6	52.80 $\pm$ 5.46	30.07 $\pm$ 5.37	17.13 $\pm$ 8.70
强的松组	6	45.07 $\pm$ 9.47	35.50 $\pm$ 7.74	19.44 $\pm$ 4.35
健脾益气摄血中剂量组	6	45.48 $\pm$ 7.73	36.43 $\pm$ 5.06	18.10 $\pm$ 5.57
健脾益气摄血低剂量组	6	42.11 $\pm$ 7.16	36.64 $\pm$ 5.89	21.26 $\pm$ 6.97

注: G1 期, DNA 合成前期; S 期, DNA 合成期; G2 期, DNA 合成后期。

3 讨论

ITP 的发病机制与自身免疫关系密切^[7], 而肠道是人体最大的免疫器官, 人体内大多数免疫细胞分布于肠道。有研究^[8]发现, ITP 发病可能与幽门螺杆菌感染有关, ITP 患者联合抗感染治疗后, 免疫功能恢复, 临床症状相应改善, 表明胃肠道功能可影响 ITP 的发生发展。

ITP 的中医病名统称为“紫癜病”。在 ITP 临床研究和实践过程中, 中医药的辅助治疗或支撑治疗显示出独特优势^[9-11]。中医脾在功能上具有系统整体性, 调控着神经-内分泌-免疫生理网络, 维持脾脏的运化、统血功能正常, 有利于维持机体免疫微环境稳定^[12]。我们以健脾益气摄血为治疗原则, 并拟定健脾益气摄血方。方中黄芪甘温, 有补气升阳固表之效, 善治诸气虚, 为君药; 党参补气健脾, 白术燥湿健运, 茯苓渗湿健脾, 共为臣药; 阿胶补血止血, 滋阴润燥, 茜草祛瘀通经, 凉血止血, 共为佐药; 炙甘草调和诸药, 为使药。诸药合

用,共奏健脾益气摄血之功。强的松具有良好的抗炎、免疫抑制作用,是 ITP 的一线治疗用药,故选择强的松作为阳性对照。

sIgA 是构成肠道黏膜免疫的重要组成成分,是抵御病原体及有害物质入侵,维持肠道黏膜稳态的第一道防线^[13]。有研究^[14]发现,ITP 小鼠存在 sIgA 水平异常。本研究中经强的松、健脾益气摄血方干预后 ITP 小鼠 sIgA 含量较模型组上升,且中剂量的健脾益气摄血方能起到与强的松相似的效果,而健脾益气摄血方高剂量组的疗效优于健脾益气摄血中剂量组,提示在调节 sIgA 时存在一定的量效依赖关系。

P53 蛋白是一种转录因子,主要分布于细胞核内,可通过多种途径调节细胞的增殖周期、分化、凋亡等^[15]。在 ITP 小鼠中,存在 P53 蛋白的异常上调^[16]。本研究中 ITP 模型小鼠肠系膜淋巴结淋巴细胞 P53 蛋白表达较正常小鼠明显升高,而强的松、健脾益气摄血方干预后,淋巴细胞 P53 含量明显降低。另外,本研究发现,ITP 模型小鼠肠系膜淋巴结淋巴细胞凋亡率异常升高,强的松、健脾益气摄血方干预后能显著降低淋巴细胞凋亡率,且健脾益气摄血方存在明显的浓度依赖性。

细胞分裂周期可分为 DNA 合成前期(G1 期)、DNA 合成期(S 期)、DNA 合成后期(G2 期)、细胞分裂期(M 期)。正常人淋巴细胞处于 G1 期为主,S 期及 G2/M 期细胞较少。研究表明,ITP 患者存在淋巴细胞过度增殖,以 S 期、G2 期细胞为主^[17]。本研究中,各组淋巴细胞周期分布无明显差异,仅表现出一定的趋势,可能与本研究样本量较少有关,需要进一步验证。

综上所述,健脾益气摄血方可通过升高 ITP 模型小鼠肠黏液 sIgA 含量、降低肠系膜淋巴结淋巴细胞 P53 蛋白含量和淋巴细胞凋亡率,从而在一定程度上恢复 ITP 小鼠肠道免疫功能,且健脾益气摄血方对肠道免疫的调控存在量效依赖关系。但本研究样本量较少,后续将扩大样本量进行验证;另外本研究初步探索了健脾益气摄血方对肠道免疫的影响,其调控机制有待进一步深入研究。

参考文献

[1]中华医学会血液学分会血栓与止血学组.成人原发免疫性血小板减少症诊断与治疗中国指南(2020 年版)[J].中华血液学杂志,2020,41(8):617-623.
[2]ANNE Z, RICK K, JOHN S. Pathogenesis and therapeutic

mechanisms in immune thrombocytopenia (ITP)[J]. J Clin Med, 2017, 6(2): 16.
[3]张玲,陈科,张雅月,等.健脾益气摄血方治疗免疫性血小板减少症临床疗效及其机制研究[J].北京中医药大学学报,2020,43(4):343-352.
[4]陈科,戴欣媛,赵宁,等.脾不统血证相关疾病与血液神经递质变化关系研究[J].辽宁中医杂志,2018,45(2):245-248.
[5]REIS BS, MUCIDA D. The role of the intestinal context in the generation of tolerance and inflammation [J]. Clin Develop Immunol, 2012, 2012: 157948. doi: 10.1155/2012/157948.
[6]郎海燕,褚雨霏,马薇,等.免疫性血小板减少症病证结合动物模型研究[J].中医药信息,2017,34(1):39-43.
[7]WEN R, WANG Y, HONG Y, et al. Cellular immune dysregulation in the pathogenesis of immune thrombocytopenia [J]. Blood Coagul Fibrinol, 2020, 31(2): 113-120.
[8]周颖,周莉,袁韵.抗幽门螺旋杆菌联合重组人血小板生成素对难治性特发性血小板减少性紫癜 Th1/Th2 细胞因子的影响[J].中国临床研究,2020,33(12):1624-1627.
[9]王珺,张蕴,张玲,等.健脾益气摄血颗粒治疗免疫性血小板减少症临床疗效观察[J].中华中医药杂志,2018,33(12):5700-5704.
[10]钟新林,蔡江龙,杨立芳,等.健脾生血汤治疗气不摄血型慢性特发性血小板减少性紫癜的临床研究[J].湖南中医药大学学报,2019,39(1):99-103.
[11]李朗,俞繁华,俞庆宏,等.周郁鸿从营卫论治免疫性血小板减少症经验[J].中医杂志,2021,62(14):1210-1213.
[12]汪永锋,杨丽霞,康开彪,等.基于现代医学理论剖析中医脾的解剖位置及脏腑功能[J].中医研究,2016,29(2):1-3.
[13]PIETRZAK B, TOMELA K, OLEJNIK-SCHMIDT A, et al. Secretory IgA in intestinal mucosal secretions as an adaptive barrier against microbial cells [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(23):9254.
[14]何昊,徐玥,郑蕾,等.健脾益气摄血方对 ITP 模型小鼠血清 SIgA 和 β -EP 影响研究[J].中医药信息,2015,32(5):47-49.
[15]XIONG G, ZHANG J, ZHANG Y, et al. Circular RNA_0074027 participates in cell proliferation, apoptosis and metastasis of colorectal cancer cells through regulation of miR-525-3p[J]. Mol Med Rep, 2021, 23(5):324.
[16]YANAN W, JIAMIN Z, YAN S, et al. miRNA-98-5p targeting IGF2BP1 induces mesenchymal stem cell apop-

tosis by modulating PI3K/Akt and p53 in immune thrombocytopenia [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2020, 20: 764-776. doi: 10.1016/j.omtn.2020.04.013.

[17]王宇, 高清平, 王琼玉, 等. 特发性血小板减少性紫癜患者 T 细胞周期和促凋亡蛋白 Caspase-3 表达的变化 [J]. 武汉大学学报(医学版), 2008, 29(5): 694-696.

Effect of *Jianpi Yiqi Shexue Formula* (健脾益气摄血方) on Intestinal Immunity in Primary Immune Thrombocytopenia Model Mice

HUANG Ziming¹, HOU Li¹, LANG Haiyan², HE Hao³, WANG Chong¹, NAN Mengdie¹, XIE Meiwen¹, ZHANG Yayue¹

1. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100700; 2. Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine; 3. Xi'an Medical University

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Jianpi Yiqi Shexue Formula* (健脾益气摄血方, JYSF) in the treatment of primary immune thrombocytopenia (ITP). **Methods** Thirty BALB/c mice were randomly divided into control group, model group, prednisone group, JYSF moderate-dose and high-dose groups, with six mice in each group. Except for the normal group, mice were injected with guinea pig anti-mouse platelet serum (GP-APS) to establish the ITP model. On the 8th day after successful modelling, the control group and the model group were given 0.1 ml/10 g of normal saline by gavage; the prednisone group was given 0.1 ml/10 g of prednisone solution with a 2 mg/ml concentration by gavage; and the JYSF moderate-dose and high-dose groups were given 4.1 mg/g and 8.2 mg/g JYSF granules by gavage, respectively. All the groups were administered once daily for eight days. The content of secretory immunoglobulin A (sIgA) in mouse intestinal mucus was detected by immunoturbidimetry; P53 protein expression in mouse mesenteric lymph node lymphocytes was detected by immunohistochemistry; the apoptosis rate of the mesenteric lymph node lymphocytes was detected by TUNEL; and the change of lymphocyte cycle in mesenteric lymph node was detected by flow cytometry. **Results** Compared to the normal group, the model group significantly decreased the content of sIgA in intestinal mucus, increased the expression of P53 protein in mesenteric lymph node lymphocytes, and increased the lymphocyte apoptosis rate ($P < 0.01$). Compared to the model group, the other three groups significantly increased the sIgA content ($P < 0.01$), as well as decreased the expression of p53 protein and the lymphocyte apoptosis rate ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). When compared among the prednisone group and the JYSF groups, it was found that the sIgA content was highest in the JYSF high-dose group ($P < 0.01$), and the lymphocyte apoptosis rate was highest in the JYSF moderate-dose group ($P < 0.01$). There was no significant difference among the groups in lymphocyte cycle ($P > 0.05$). **Conclusion** The mechanism of JYSF in the treatment of ITP may be related to regulating the content of sIgA in the intestinal mucus and the expression of P53 protein in mesenteric lymph node lymphocytes, as well as reducing the lymphocyte apoptosis rate and improving the intestinal immune function; and there may be a certain dose-response relationship.

Keywords primary immune thrombocytopenia; *Jianpi Yiqi Shexue Formula* (健脾益气摄血方); intestinal immunity; immunoglobulin; P53 protein; lymphocytes; apoptosis; cell cycle

(收稿日期: 2021-08-30; 修回日期: 2021-10-21)

[编辑: 邓 媛]