

疏风凉血补肾方对 ITP 模型小鼠免疫调控的影响

唐志宇^{1*}, 陈志雄², 于天启²

(1. 广州中医药大学, 广州 510405; 2. 广州中医药大学第三临床医学院, 广州 510405)

[摘要] 目的:观察疏风凉血补肾方对免疫性血小板减少性紫癜(ITP)模型小鼠外周血血小板(PLT),干扰素 γ (IFN- γ),CD80,CD86 及程序性细胞死亡基因(PD-1)的表达变化的影响。方法:制备豚鼠抗小鼠血小板血清(APS),连续注射小鼠,复制小鼠 ITP 模型,疏风凉血补肾方高、中、低剂量灌胃给药(112.5,75,37.5 g·kg⁻¹·d⁻¹),强的松组灌胃强的松(10 mg·kg⁻¹·d⁻¹),对照组、模型组给予生理盐水,连续给药 7 d。应用血细胞分析仪测定 PLT,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测细胞因子 IFN- γ ,流式细胞仪检测外周血淋巴细胞 CD80,CD86 及 PD-1 的表达。结果:模型小鼠外周血 PLT 数持续减低,IFN- γ ,CD80,CD86 及 PD-1 明显增高,给予疏风凉血补肾方治疗后模型小鼠外周血 PLT 数明显增高($P<0.05$),IFN- γ ,CD80,CD86,PD-1 明显降低($P<0.05$)。结论:疏风凉血补肾方能升高 ITP 模型小鼠 PLT,降低 IFN- γ ,CD80,CD86 及 PD-1 的表达,改善细胞免疫的失衡,达到治疗 ITP 的作用。

[关键词] 疏风凉血补肾方; 免疫性血小板减少性紫癜; 协同刺激分子; 细胞因子; 免疫调控
[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)22-0279-04

Immune Regulation of Shufeng Liangxue Decoction
on Immune Thrombocytopenic Purpura Model in Mice

TANG Zhi-yu^{1*}, CHEN Zhi-xiong², YU Tian-qi²

(1. Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;

2. the Third Clinical Medical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the impact influence of Shufeng Liangxue decoction of on platelet count, interferon- γ (IFN- γ), CD80, CD86 and programmed cell death gene (PD-1) of the model mousein of peripheral blood in disease of immune thrombocytopenic purpura (ITP) model mice in peripheral blood on treatment with Shufeng Liangxue decoction. **Method:** It was designed to use guinea pig anti-mouse guinea pig platelet serum (APS) was injected into mice continuously in order to induce the immune thrombocytopenic purpura mouse models. Then mice of Shufeng Liangxue treatment groups, positive group, model group and control group were administered orally with Shufeng Liangxue decoction (112.5, 75, 37.5 g·kg⁻¹·d⁻¹) of large, medium and small doses prednisone (10 mg·kg⁻¹·d⁻¹) and saline respectively, and all groups were maintained its treatment for continuel 7 days. The blood cell counter was used to detect platelet count, The the levels of cytokine IFN- γ was detected by enzyme linked immunosorbentassay (ELISA), CD80, CD86 and PD-1 were detected by flow cytometry. **Result:** Platelet count reduced and IFN- γ , TCD80, CD86 and PD-1 increased significantly in model group mice. Platelet count increased significantly ($P<0.05$) and IFN- γ , TCD80, CD86 and PD-1 significantly decreased ($P<0.05$) in Shufeng Liangxue decoction group mice. **Conclusion:** The Shufeng Liangxue decoction could enhance platelet count decrease IFN- γ , CD80, CD86 and PD-1express, improve unbalance of cellular immunity function in ITP model miceto to treat ITP.

[Key words] Shufeng Liangxue decoction; immune thrombocytopenic purpura; costimulatory molecules; cytokine; immune regulation

[收稿日期] 20120306(002)
[通讯作者] *唐志宇,博士研究生,主治中医师,从事中医血证的临床研究,Tel:13632437251,E-mail:tzycy@tom.com

免疫性血小板减少性紫癜 (immune thrombocytopenic purpura, ITP), 是一种免疫介导的以血小板减少和皮肤黏膜出血, 骨髓巨核细胞数正常或增多伴成熟障碍为特征的自身免疫性疾病。ITP 发病与免疫功能密切相关, 但确切机制仍未阐明。随着研究的深入, 传统体液免疫理论在 ITP 发病过程中起决定性作用的观点受到挑战。目前普遍认为 ITP 发病具有明显的异质性, 是体液免疫、细胞免疫、巨核细胞等调控异常和人类白细胞抗原遗传多态性等多方面综合作用的结果, 尤其细胞免疫功能失调在 ITP 发病中的作用越来越受重视。大量研究表明 ITP 发病时正性协同刺激分子 (CD80, CD86) 表达异常, 发生共刺激信号过度激活。然而负性协同刺激分子 (PD-1) 在 ITP 发病中的作用机制目前尚未见报道。疏风凉血补肾方即是陈志雄教授根据“伏风”假说, 在临床治疗 ITP 的经验所得, 临床疗效明显。本研究设计在复制 ITP 小鼠模型的基础上, 观察正性协同刺激分子 CD80, CD86 和负性协同刺激分子 PD-1 及细胞因子 IFN- γ 的表达情况, 以及疏风凉血补肾方对其表达的影响, 探讨正性 (CD80, CD86) 和负性 (PD-1) 协同刺激分子在 ITP 自身免疫中的作用, 为疏风凉血补肾 (法) 方临床推广应用与新药研发提供实验依据, 并为 ITP 的单克隆抗体治疗提供理论支持。

1 材料

1.1 动物 SPF 级健康 BALB/c 小鼠, 体重 18 ~ 22 g, 雌雄各半, 由广东省医学实验动物中心提供, 动物许可证号 SYXK (粤) 2008-0001。

1.2 药品和试剂 疏风凉血补肾方由防风、蝉蜕、苍耳子、黄芪、田七片、生地黄、水牛角、赤芍、补骨脂、黄精、巴戟天、乌梅、甘草等组成, 生药加水煎 2 次, 每次 2 h, 合并药液, 过滤浓缩, 给药时以蒸馏水调整质量浓度至 1 kg·L⁻¹ (生药量), 由广州中医药大学第一附属医院制剂室制备。豚鼠抗小鼠血小板血清 (下称 APS, 动物造模用), 由广东省医学实验动物中心制备。直标单克隆荧光抗体: Rat anti mouse CD80-FITC, Ebioscience 公司, 批号 12-0114; Rat anti mouse CD86-PE, Ebioscience 公司, 批号 11-5322; Rat anti mouse PD-1-PE, Ebioscience 公司, 批号 11-0862; 小鼠 γ 干扰素 (IFN- γ) ELISA 试剂盒, RD 公司, 批号 DTA00C。以上试剂均由广州外显子生物有限公司提供。

2 方法

2.1 分组及给药剂量 选取 BALB/C 小鼠 100 只,

雌雄各半, 随机选取 12 只作为对照组, 剩下 88 只造模, 造模成功后随机选取 60 只, 分为 5 组: 模型组、强的松组、疏风凉血补肾方高、中、低剂量组, 每组 12 只。每日按 20 mL·kg⁻¹ 体重灌胃, 1 次/d。其中对照组, 模型组灌胃生理盐水, 强的松组以强的松 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 灌胃, 疏风凉血补肾方高、中、低剂量组分别按 112.5, 75, 37.5 g·kg⁻¹·d⁻¹ 灌胃。

2.2 造模方法 分别在第 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 天于小鼠腹腔内注射 1:4 稀释的豚鼠抗小鼠血小板血清 (APS), 每次按照 5 mL·kg⁻¹ 的标准, 在首次注射 APS 后 6 h, 小鼠血小板降低至原水平的 47.6%, 8 h 降低至原水平的 21.5% 时, 反复注射 APS 使血小板在停止注射 APS 3 d 内维持原水平的 11% ~ 25%, 即为成功模型^[1-3] (本实验造模成功率为 71.5%), 正常对照组注射 0.1 mL 蒸馏水。于造模第 7 天起开始灌胃, 连续灌胃 7 d, 至造模后第 15 天取材检测。

2.3 检测指标

2.3.1 血小板计数 实验结束后 (实验第 15 天), 用摘眼球法取血 80 μ L, 加入带有 EDTA-Na 固体抗凝剂的试管, 使血液充分与抗凝剂混合后, 全自动血细胞计数仪检测血小板计数。

2.3.2 CD80, CD86 及 PD-1 的表达率检测 实验结束后 (实验第 15 天), 用摘眼球法取血抗凝。单克隆抗体标记 分别取 100 μ L 抗凝血放入 4 支实验管和 1 支对照管, 实验管分别加 20 μ L CD80-FITC, CD86-PE, PD-1-PE, 对照管加 20 μ L 鼠抗人 IgG1-PE, 室温避光孵育 30 min, 加入细胞裂解液 2 mL 混匀, 静置 8 min, 300 $\times$ g 离心 5 min。弃上清, 加入 PBS 缓冲液, 混匀 200 $\times$ g 离心 5 min。弃上清, 每管加入 250 μ L 鞘液, 重悬细胞, 上流式细胞仪检测。协同刺激分子的检测, 用流式细胞仪双色分析系统分析 CD80, CD86 及 PD-1 的表达率。

2.3.3 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测小鼠外周血 IFN- γ 。

2.4 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 Tukey 法, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对外周血 PLT 的影响 如表 1 所示, 对照组与模型组有极显著差异 ($P < 0.01$); 各给药组与模型组相比, PLT 均升高, 有显著差异 ($P < 0.05$)。疏风凉血补肾方高、中、低剂量组无明显差异, 说明疏风凉血补肾方高、中、低各药组对于 PLT 恢复都起到了正向作用。

表 1 疏风凉血补肾方对 PLT 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	PLT/ $\times 10^9/\text{L}$
对照	—	$793.70 \pm 152.42^{1)}$
模型	—	429.67 ± 110.39
疏风凉血补肾方	112.5	$650.69 \pm 124.47^{2)}$
	75	$696.27 \pm 127.65^{2)}$
	37.5	$647.85 \pm 70.68^{2)}$
强的松	0.01	$595.20 \pm 119.35^{2)}$

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ (表 2 ~ 3 同)。

表 2 疏风凉血补肾方对 CD80,CD86,PD-1 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	CD80/%	CD86/%	PD-1/%
对照	—	$4.17 \pm 1.83^{1)}$	$10.14 \pm 2.70^{1)}$	$4.37 \pm 1.30^{1)}$
模型	—	7.91 ± 1.71	15.72 ± 1.83	9.12 ± 4.38
疏风凉血补肾方	112.5	6.43 ± 1.06	13.47 ± 4.65	6.11 ± 1.49
	75	7.24 ± 1.61	12.84 ± 1.80	6.50 ± 2.80
	37.5	$4.72 \pm 1.95^{2)}$	$10.27 \pm 0.40^{2)}$	$4.35 \pm 1.41^{2)}$
强的松	0.01	$4.20 \pm 0.58^{2)}$	$10.05 \pm 0.55^{2)}$	$4.08 \pm 1.06^{2)}$

表 3 疏风凉血补肾方对 IFN- γ 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	IFN- $\gamma/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
对照	—	$78.77 \pm 49.13^{1)}$
模型	—	117.71 ± 21.85
疏风凉血补肾方	112.5	89.58 ± 8.39
	75	91.13 ± 16.38
	37.5	$80.78 \pm 20.99^{2)}$
强的松	0.01	$82.73 \pm 11.06^{2)}$

4 讨论

ITP 属于中医学“血证”的范畴。ITP 急性发作前,患者多有外感风邪史,常为发病诱因,病情即出现反复或症状加重。风邪袭表后,常兼他邪入里化热,动血耗血,伤及气阴,损及真阳^[4],根据“阳虚易治,阴虚难调”的中医理论,这些患者中医辨证多属“阴虚血热型”。此为 ITP 发病的一般病机及病情演变特点,从 ITP 临床表现看,其出血或为大小不一的瘀点、瘀斑,转而即发展为成片的瘀块血肿,或为鼻衄、齿衄、月经过多,旋即出现颅脑、内脏出血而危及生命,这种发病部位不定、症状变化多端、病情演变迅速的特点与风邪善行数变的特征相一致,对于 ITP 属慢性难治者,其病机除具以上共性外,陈志雄教授还根据多年临证经验及中医学伏邪理论,提出了“伏风”假说,认为 CITP 多由内伤正虚,风邪乘虚侵袭,或急性期余邪未清,风邪蕴伏于肌肤经隧,日久难以清疏,郁而化火,耗气动血;或时由外邪及情

3.2 对外周血 CD80,CD86,PD-1 的影响 如表 2 所示,与模型组比较,对照组和疏风凉血补肾方高剂量组 CD80,CD86,PD-1 表达率均明显降低,有明显差异($P < 0.05$),其余各组则无明显差异,但有降低趋势,见表 2。

3.3 对外周血 IFN- γ 的影响 如表 3 所示,与模型组比较,对照组、强的松组和疏风凉血补肾方高剂量 IFN- γ 表达率均明显降低,有明显差异($P < 0.05$),其余各组则无明显差异,但有降低趋势,见表 3。

志引发,内外风火相合,扰血妄行,致使病情反复,缠绵难愈;而临床上 CITP 的紫癜时轻时重、或隐或现,病症经久不愈,也正是其伏风熄伏不定、稽留难除的表现^[5]。据此所立的疏风凉血补肾方在临床治疗 CITP 临床疗效明显,亦验证了“伏风”假说的正确性。

模型小鼠经过灌胃疏风凉血补肾方,各组 PLT 均有不同程度升高,说明该药有升高 PLT 的作用,疗效确切。选择能够反应 ITP 临床特征的小鼠外周血 PLT 数、协同刺激分子 CD80,CD86,PD-1,IFN- γ 等实验室检测和观察指标作为疏风凉血补肾方对 ITP 小鼠治疗效应的判断标准。结果表明疏风凉血补肾方能通过降低 IFN- γ ,CD80,CD86 及 PD-1 的表达,改善细胞免疫的失衡,提升 PLT 计数达到治疗 ITP 的作用。杨晓红等运用益气通阳汤对 ITP 小鼠模型进行治疗,实验结果发现亦能改善 T 淋巴细胞的失衡,达到治疗作用^[6]。

PD-1 是由 288 个氨基酸组成的免疫球蛋白超家族 I 型跨膜糖蛋白,被认为与细胞凋亡相关而命名为程序性死亡分子-1(programmed death-1,PD-1)^[7],是新近发现的负性协同刺激分子,通过抑制 T 细胞的活化和增殖来负调控免疫应答^[8]。PD-L1 和 PD-L2 是 PD-1 的两个配体,大量的研究表明,PD-L1 与活化的 T 细胞上 PD-1 相互作用可显著抑制效应性 T、B 细胞的生物学功能,使 T 细胞活化增殖受抑,PD-L1,PD-L2 与 PD-1 相互作用后可导致细胞周

期停滞于 G_0/G_1 期,致使 T 细胞不能持续增殖^[9],同时减少细胞因子 IL-2,IL-10 和 IFN- γ 的分泌^[10]。PD-1,PD-L1 或 PD-L2 的表达改变导致 PD-1/PD-L 抑制途径发生异常,进而机体发生免疫功能亢进或低下性疾病^[11]。

MocizukiK 等^[12]研究表明 ITP 发病时分子对 (CD28/CD80 和 CD28/CD86) 协同刺激通路异常,发生共刺激信号过度激活。然而负性协同刺激途径在 ITP 发病中的作用机制目前尚未见报道。本实验结果显示 C1TP 模型小鼠外周血淋巴细胞正性协同刺激分子 CD80,CD86 的表达均高于正常组和治疗组,与以往的实验结果相符,同时也首次发现负性协同刺激分子 PD-1 的表达均明显高于正常组和治疗组,并且与正性协同刺激分子 CD80,CD86 的表达呈正相关。同时发现,IFN- γ 在 C1TP 模型小鼠中与 PD-1 的表达亦呈正相关,给予疏风凉血补肾方干预后,随着 PLT 的上升,二者表达均下调。这种效应在强的松组和疏风凉血补肾方高剂量组中尤为明显,与模型组比较有明显差异 ($P < 0.05$),但在疏风凉血补肾方低、中剂量组中虽有差异的趋势,但不太明显 ($P > 0.05$),这可能与中药干预的合理靶效浓度有关,需要在今后的实验中进一步探索最佳的药物浓度。

本实验中 PD-1 在 C1TP 模型小鼠外周血呈高表达,强的松组和疏风凉血补肾方高剂量组病情缓解后表达下调,亦再次证明了过度的免疫应答在 ITP 发病机制中的作用。今后的研究需要进一步探讨 PD-1 的两个配体 PD-L1 和 PD-L2 在 ITP 外周血中的表达情况,明确 PD-1 和 PD-L1,PD-L2 三者的表达关系,PD-L1,PD-L2 是否也在 ITP 的发病中起到了重要作用,以及 PD-1/PD-L 抑制途径异常与正性协同刺激分子 CD80,CD86 及其配体 CD28 途径异常两者在 ITP 发病中的主次地位,它们对细胞网络中相关细胞因子 (IL-2,IL-4,IL-6,IFN- γ) 的影响如何,是否对细胞周期有影响,正负性协同刺激分子 (通路)怎样才能达到相对平衡以使免疫应答适时开启又能恰当终止,而使 ITP 的病情得以缓解。

本实验结果表明 C1TP 模型小鼠予以强的松和大剂量疏风凉血补肾方治疗后与模型组比较有显著差异,PLT 计数明显上升,IFN- γ ,CD80,CD86,PD-1 明显下降,显示出大剂量疏风凉血补肾方对 C1TP 模型小鼠具有良好的治疗作用,因此在需要长期服用

强的松维持治疗的患者中可以考虑用疏风凉血补肾方替代或减量强的松从而减少激素引起的相关副作用。

[参考文献]

[1] 杨宇飞,周霭祥,麻柔. 免疫性血小板减少性紫癜动物模型的建立[J]. 中华血液学杂志,1994,15(3):160.

[2] 富琦,范颖,王家辉,等. 免疫性血小板减少性紫癜病证结合动物模型建立与评价[J]. 中国中医基础医学杂志,2004,10(2):30.

[3] 曲道炜,林庶茹,范颖. 免疫法建立特发性血小板减少性紫癜动物模型过程的改进及其体会[J]. 中医药学刊,2005,23(5):928.

[4] 胡明辉,朱文伟,周永明,等. 中西医结合治疗阴虚血热型特发性血小板减少性紫癜临床观察[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(6):72.

[5] 曾英坚,于天启,陈志雄. 陈志雄教授运用祛风法治难治性血小板减少性紫癜经验介绍[J]. 新中医 2008,40(4):11.

[6] 杨晓红,苏根元,许勇钢,等. 益气通阳汤对血小板减少性紫癜小鼠模型的作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(14):148.

[7] Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, et al. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death[J]. EMBO, 1992,11(11):3887.

[8] Greenwald R J, Freeman G J, Sharpe A H. The B7 family revisited [J]. Annu Rev Immunol, 2005, 23(1):515.

[9] Latchman Y, Wood C R, Chernova T, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation [J]. Nat Immunol, 2001, 2(3): 261.

[10] Freeman G J, Long A J, Iwai Y, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation[J]. J Exp Med, 2000; 192(7): 1027.

[11] Latchman Y, Wood C R, Chernova T, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation [J]. Nat Immunol. 2001, 2(3): 261.

[12] Mocizuki K, Hayashi N, Katayama K,et al. B7 /BB-1 expression and hepatitis activity in liver tissues of patientswith chronic hepatitis C [J]. Hepato, 1997, 25(3): 713.

[责任编辑 李玉洁]