doi:10.3969 / j.issn.1006 - 4931.2022.06.014

健脾益气摄血方对模型小鼠血小板减少性紫癜的改善作用*

万　敏,谭晶晶,周　林△

(湖北省武汉市中医医院检验科,湖北 武汉　430014)

摘要:目的　探讨健脾益气摄血方对模型小鼠血小板减少性紫癜(ITP)的改善作用。**方法**　将 60 只 BALB / c 小鼠随机分为空白对照组(等体积生理盐水)、模型组(等体积生理盐水)、醋酸泼尼松组(5 mg / kg)及健脾益气摄血方低、中、高剂量组(6. 96,13. 91,27. 82 g / kg),各 10 只。除空白对照组外,其余各组均采用豚鼠抗小鼠血小板血清腹腔注射,以复制小鼠 ITP 模型。建模成功后,各组小鼠均灌胃给予相应药物或生理盐水,每日 1 次,连续 14 d。各组小鼠给药后 7,14 d 时取眼眶静脉血,检测外周血血小板计数;苏木素 - 伊红(HE)染色,光镜下观察小鼠脾脏及肾脏组织病理形态学;采用流式细胞仪检测小鼠脾脏中辅助性 T 细胞 17(Th17) / 调节性 T 细胞(Treg)比例;小鼠眼球取血,采用酶联免疫吸附(ELISA)法检测小鼠血清中白细胞介素 17(IL - 17)、白细胞介素 6(IL - 6)、转化生长因子 - β_1(TGF - β_1)及白细胞介素 10(IL - 10)水平;采用实时定量聚合酶链反应法及 Western blot 法分别检测脾脏组织中叉头样转录因子 3(Foxp3)及孤独核受体(RORγt) mRNA 和蛋白的表达水平。**结果**　与模型组比较,各用药组小鼠外周血血小板计数均明显增多;光镜下脾脏中异常骨髓巨核细胞数量不同程度减少,且脾脏 Th17 细胞明显减少,Treg 细胞明显增多;血清 IL - 10 水平明显降低,IL - 17,IL - 6,TGF - β_1 水平均明显升高;脾脏组织中 RORγt mRNA 及蛋白表达水平均显著降低,Foxp3 mRNA 及蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$)。**结论**　健脾益气摄血方对模型小鼠 ITP 有明显改善作用,其作用机制可能与调节 Th17 / Treg 细胞免疫失衡有关。

关键词:健脾益气摄血方;血小板减少性紫癜;小鼠;辅助性 T 细胞 17;调节性 T 细胞;细胞免疫失衡

中图分类号:R932;R285.5　　**文献标志码:A**　　**文章编号:1006 - 4931(2022)06 - 0055 - 06**

Improvement Effect of Jianpi Yiqi Shexue Formula on Thrombocytopenic Purpura in Model Mice

WAN Min, TAN Jingjing, ZHOU Lin

(Department of Clinical Laboratory, Wuhan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan, Hubei, China　430014)

Abstract: Objective　To investigate the improvement effect of Jianpi Yiqi Shexue Formula on immune thrombocytopenic purpura (ITP) in model mice. **Methods**　60 BALB / c mice were randomly divided into blank control group (equal volume of normal saline), model group (equal volume of normal saline), prednisone acetate group (5 mg / kg), and Jianpi Yiqi Shexue Formula low - , medium - and high - dose groups (6. 96, 13. 91, 27. 82 g / kg), with 10 mice in each group. Except for those in the blank control group, the ITP model mice were established by intraperitoneal injection of guinea pig anti - mouse platelet serum (GP - APS). After successful modeling, mice in each group were given corresponding drugs or normal saline by gavaging once a day for 14 d. Blood was taken from orbital vein of mice at 7 d and 14 d after administration, and peripheral blood platelet count was measured. Hematoxylin - eosin (HE) staining was used to observe the histopathophology of spleen and kidney of mice under light microscope. The ratio of helper T cell 17 (Th17) / regulatory T (Treg) cell in the spleen of rats was detected by the flow cytometry. Blood samples were taken from the eyeballs of mice, and the levels of interleukin - 17 (IL - 17), interleukin - 6 (IL - 6), transforming growth factor β_1 (TGF - β_1) and interleukin - 10 (IL - 10) in serum were detected by enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA). The expression levels of forkhead like transcription factor 3 (Foxp3) and retinoic receptor - related orphan receptor (RORγt) mRNA and protein in spleen were detected by real - time quantitative polymerase chain reaction (RT - qPCR) and Western blot, respectively. **Results**　Compared with those in the model group, the number of platelets in peripheral blood of mice in each treatment group increased significantly, the number of abnormal bone marrow megakaryocytes in spleen decreased in different degrees under light microscope, the number of Th17 cells in spleen decreased significantly, the number of Treg cells increased significantly, the IL - 10 level of serum decreased significantly, the levels of IL - 17, IL - 6 and TGF - β_1 increased significantly, the expression levels of RORγt mRNA and protein in spleen tissue decreased significantly, while the expression levels of Foxp3 mRNA and protein increased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion**　Jianpi Yiqi Shexue Formula can significantly improve ITP in model mice, and its mechanism may be related to the regulation of Th17 / Treg cell immune imbalance.

Key words: Jianpi Yiqi Shexue Formula; immune thrombocytopenic purpura; mice; helper T cells 17; regulatory T cells; cell immune imbalance

*基金项目:湖北省武汉市医学科研项目[WZ19C37]。

第一作者:万敏,女,大学本科,主管技师,研究方向为临床检验,(电子信箱)609895589@qq. com。

△通信作者:周林,男,硕士,主管技师,研究方向为临床检验,(电子信箱)bear78646169@163. com。

免疫性血小板减少性紫癜(ITP)是以外周血血小板破坏过多、血小板数量显著减少、皮肤黏膜出血或伴有内脏出血倾向为主要特征的出血性疾病[1-2]。临床多以糖皮质激素及脾切除术治疗该病,但激素类药品不良反应较多,不适合长期应用,脾切除术造成的继发感染、败血症等术后并发症亦不可忽视[3]。中医辨证施治可有效缓解ITP患者的临床症状,调节机体免疫功能[4-5]。健脾益气摄血方以四君子汤为基础,增加黄芪、阿胶、茜草以固气止血,有健脾益气、养血止血功效,能提升血小板数量、改善出血,但具体作用机制尚不明晰[6-7]。辅助性T细胞17(Th17)/调节性T细胞(Treg)的平衡状态对于维持机体正常免疫功能及防止炎性反应具有重要意义,Th17/Treg细胞的免疫功能失衡是目前ITP机制研究的热点[8]。本研究中探讨了健脾益气摄血方对模型小鼠ITP的改善作用。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试药与动物

仪器:Fresco17型低温高速离心机(美国Thermo Fisher公司);7180型全自动生化分析仪(日本Hitachi公司);CX31型光学显微镜(日本Olympus公司);CytoFLEX型流式细胞仪(美国Beckman公司);Infinite F50型酶标仪(瑞士Tecan公司);EC3型凝胶电泳装置(美国Bio-Rad公司);HH-501型恒温水浴箱(浙江赛德仪器设备有限公司)。

试药:由健脾益气摄血方(本课题组从我院药房取各组方药材制备);醋酸泼尼松片(国药集团容生制药有限公司,批号为200220);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(生工生物工程<上海>有限公司,批号为0316S08);CD_4-PE,CD_{25}-PE,白细胞介素(IL)-17-FITC,Foxp3-FITC流式抗体(美国BD公司,批号分别为362041,362033,362045,362037);小鼠IL-17、IL-6、转化生长因子β_1(TGF-β_1)、IL-10酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号分别为20200521,20200510,20200528,20200604);孤独核受体(RORγt)、叉头样转录因子3(Foxp3)、β-actin一抗(美国RD公司,批号分别为223511,223413,223517)。

动物:SPF级BALB/c小鼠60只,雌雄各半,体质量18~22 g;SPF级豚鼠,雌性,6周龄,体质量300~400 g,均由湖北省实验动物研究中心提供,实验动物生产许可证号SCXK(鄂)2015-0018。自由饮食饮水,饲养于温度为22~25 ℃、相对湿度为52%~55%的SPF级实验动物房中。本研究经医院实验动物伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 豚鼠抗小鼠血小板血清(GP-APS)制备

抗原制备:小鼠摘眼球取血,使用乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na)抗凝,离心,分离血小板并洗涤,用生理盐水稀释血小板密度至10^9 L^{-1},随后与等量完全福氏佐剂和不完全福氏佐剂充分混合,即得抗原。

免疫:将含完全福氏佐剂的抗原于豚鼠足掌、背部及皮下6点注射,分别于注射后第1,2,4周取含不完全福氏佐剂的抗原,注射于豚鼠足掌、背部及皮下6点,豚鼠于末次注射后第6天取心脏不抗凝血,分离,即得GP-APS,-20 ℃贮存备用。

GP-APS稀释液制备:取GP-APS适量,置56 ℃水浴30 min灭活,以等量小鼠红细胞至少吸附2次,用生理盐水稀释至1∶4(*V*/*V*),备用。

1.2.2 建模、分组与给药

将60只小鼠随机分为空白对照组(等体积生理盐水)、模型组(等体积生理盐水)、醋酸泼尼松组(5 mg/kg)及健脾益气摄血方低、中、高剂量组(6.96,13.91,27.82 g/kg),各10只。除空白对照组外,其余各组小鼠分别于第1,3,5,7,9,11,13天腹腔注射GP-APS稀释液(每10 g体质量100 μL)以复制TIP模式,注射第6小时,血小板开始减少,第8小时降至最少,为建模成功。各组小鼠均从首次注射GP-APS后24 h时开始灌胃相应药物或生理盐水,每日1次,连续14 d。

1.3 观察指标

外周血血小板计数:分别于给药后7,14 d取眼眶静脉血10 μL,采用全自动血细胞分析仪测定小鼠外周血血小板并计数。

肾脏、脾脏组织病理形态学:末次给药后,小鼠眼球取血,处死,解剖后取部分肾脏、脾脏组织,于4%多聚甲醛溶液中固定24 h,梯度酒精脱水,石蜡包埋,切5 μm厚片,HE染色,中性树胶封片,200倍光镜下观察。

脾脏组织中Th17和Treg细胞比例:处死小鼠,取部分脾组织,剪碎,研磨,加入RPMI 1640培养液(含10%胎牛血清)中,过200目尼龙网,收集于无菌离心管,3 000 r/min离心5 min,取上清液,加入红细胞裂解液,3 000 r/min离心5 min,取上清液,磷酸盐缓冲液(PBS)洗3次,加入RPMI 1640培养液重悬,细胞培养箱中培养4 h,3 000 r/min离心5 min,取上清液,重悬细胞,制备脾脏淋巴细胞悬液。调整细胞密度为1×10^7 mL^{-1},取100 μL细胞悬液,分别加入FITC-CD_4与APC-CD_{25}单克隆抗体,4 ℃避光孵育30 min,固定液避光室温20 min,去上清,PBS洗涤2次,加入PE-IL-17及PE-Foxp3进行染色,4 ℃避光孵育30 min,PBS洗涤2次,采用流式细胞仪检测。

血清IL-17,IL-6,TGF-β_1,IL-10水平:于小鼠眼球取血,常温静置30 min,3 000 r/min离心15 min,分离,得血清,-20 ℃贮存。采用ELISA法检测,标准孔

加入不同浓度标准品，样品孔加入血清样品 10 μL，加入样品稀释液 40 μL，抗体 100 μL，同时设置空白孔，37 ℃孵育 1 h，洗涤 6 次，依次加入显色液 A 和 B 各 50 μL，37 ℃避光显色 15 min，加入终止液 50 μL，15 min 内于酶标仪 450 nm 波长处检测各反应孔的吸光度（*OD*）值，根据标准曲线计算样品浓度。

脾脏组织 RORγt 和 Foxp3 的 mRNA 表达水平：取小鼠部分脾脏组织，以 Trizol 提取组织总 RNA，测定总 RNA 浓度，取 2 μg RNA 逆转录为 cDNA，再进行 RT－PCR反应，以 β－actin 为内参。反应条件为 94 ℃预变性 10 s，退火温度 70 ℃ 20 s，72 ℃延伸 1 min，循环 30 次，最后 72 ℃延伸 1 min，结果以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析 mRNA 相对表达量。RORγt，正向，GCCGCGGAGCAGACACACTT，反向，GGAGGCCCCCTGGACCTCTG；Foxp3，正向，CAGGAGAAAGCGGATACCAAATG，反向，ATCTGTGAGGACTACCGAGCC；β－actin，正向，GCAGAAGGAGATTACTGCTCT，反向，GCTGATCCACATCTGCTGGAA。

脾脏组织 RORγt 和 Foxp3 的蛋白表达：取小鼠部分脾脏组织，匀浆后加入 RIPA 裂解液，提取组织总蛋白，以 BCA 法进行蛋白定量。取 10 μL 蛋白样品进行电泳分离，冰上转膜，脱脂奶粉室温封闭 2 h，加入一抗 4 ℃过夜，二抗室温结合 2 h，ECL 显色，凝胶图像分析系统拍照，以 β－actin 为内参，用 Image J 软件分析蛋白表达量。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计学软件分析。计量资料以 $\overline{X} \pm s$ 表示，组间比较采用单因素方差分析。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 外周血血小板计数

与空白对照组比较，模型组小鼠给药前及给药 7 d 和 14 d 时的血小板计数显著减少（$P < 0.01$）；与模型组比较，健脾益气摄血方低、中、高剂量组及醋酸泼尼松组治疗 7 d 和 14 d 时的血小板计数显著增多（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）。详见表 1。

表 1 各组小鼠外周血血小板计数比较（$\overline{X} \pm s$，$\times 10^9\ L^{-1}$，$n = 10$）

Tab. 1 Comparison of platelet count in peripheral blood of mice in each group（$\overline{X} \pm s$，$\times 10^9\ L^{-1}$，$n = 10$）

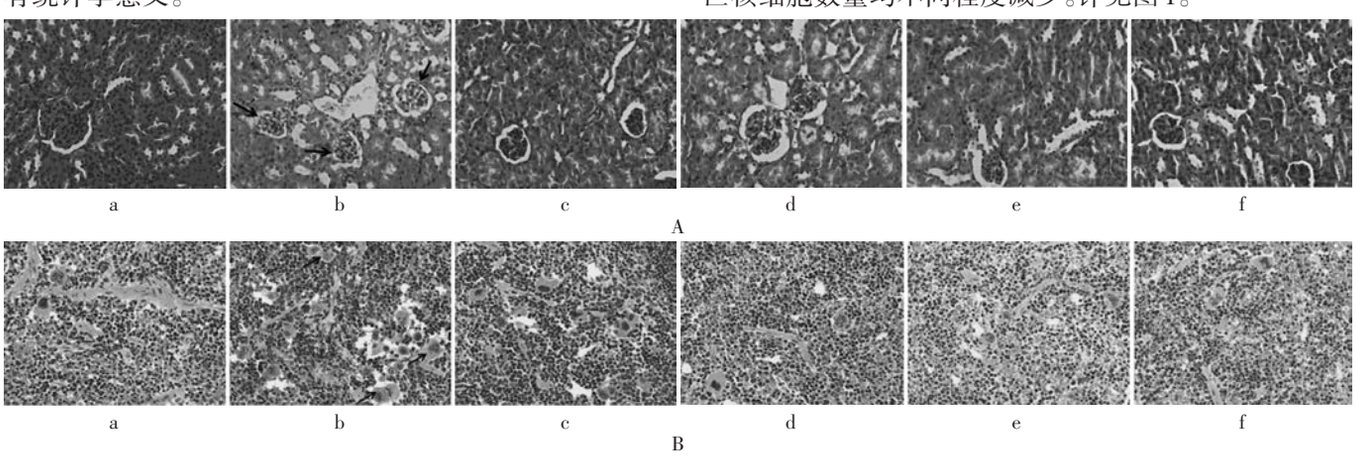
组别	剂量（mg/kg）	给药前	给药 7 d	给药 14 d
空白对照组		413.26 ± 72.13	405.28 ± 84.02	421.72 ± 67.15
模型组		77.29 ± 22.45*	74.52 ± 29.10*	79.64 ± 33.27*
醋酸泼尼松组	5	71.08 ± 26.71	240.54 ± 43.24##	309.80 ± 83.54##
健脾益气摄血方低剂量组	6 960	75.74 ± 18.36	121.65 ± 49.15#	168.95 ± 57.36##
健脾益气摄血方中剂量组	13 910	76.90 ± 25.07	197.89 ± 30.59##	240.43 ± 48.09##
健脾益气摄血方高剂量组	27 820	73.42 ± 19.05	216.37 ± 35.02##	278.97 ± 54.32##

注：与空白对照组比较，*$P < 0.01$；与模型组比较，#$P < 0.05$，##$P < 0.01$。表 2 至表 3，图 3 至图 4 同。

Note: Compared with those in the blank control group, *$P < 0.01$ (for Tab. 1－3 and Fig. 3－4); Compared with those in the model group, #$P < 0.05$, ##$P < 0.01$ (for Tab. 1－3 and Fig. 3－4).

2.2 肾脏、脾脏组织病理形态学

空白对照组小鼠肾脏及脾脏组织形态规则，胞浆丰富，细胞核清晰，细胞索排列整齐；模型组小鼠可见炎性细胞浸润，肾小管上皮细胞肿胀，肾小球扩张；脾脏内可见发育异常的骨髓巨核细胞大量增多，各用药组小鼠肾小球损伤、炎性浸润及肾小管上皮水肿情况减轻，肾组织损伤均不同程度改善，脾脏内的异常骨髓巨核细胞数量均不同程度减少。详见图 1。



a. 空白对照组 b. 模型组 c. 醋酸泼尼松组 d－f. 健脾益气摄血方低、中、高剂量组

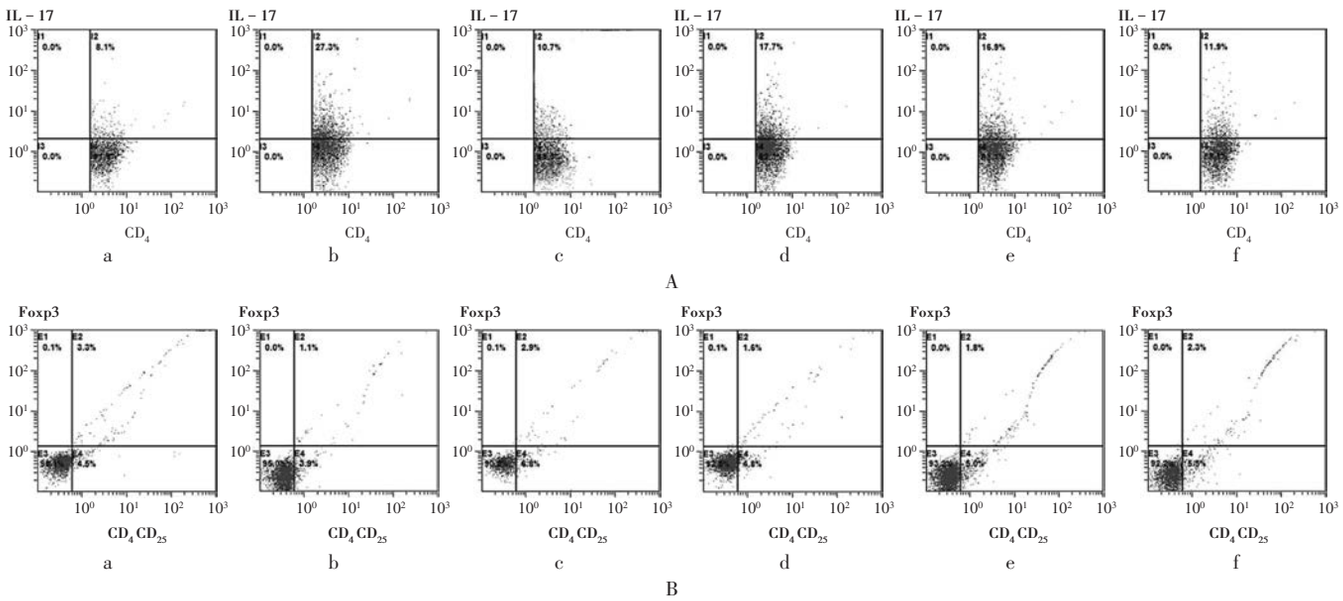
A. 肾脏组织 B. 脾脏组织

图 1 各组小鼠肾脏脾脏组织病理形态学（HE，× 200）

a. Blank control group b. Model group c. Prednisone acetate group d－f. Jianpi Yiqi Shexue Formula low－, medium－ and high－dose groups

A. Kidney tissue B. Spleen tissue

Fig. 1 Histopathophology of kidney and spleen tissue of mice in each group（HE staining, × 200）



a. 空白对照组 b. 模型组 c. 醋酸泼尼松组 d－f. 健脾益气摄血方低、中、高剂量组

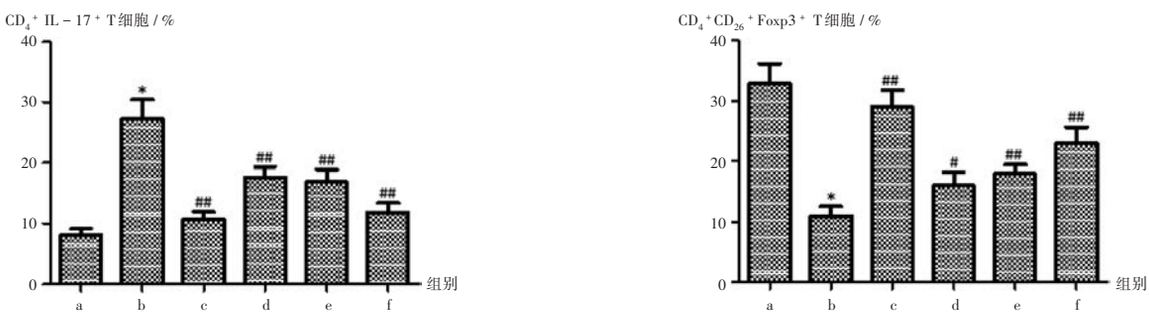
A. Th17 B. Treg

图2 各组小鼠流式细胞图

a. Blank control group b. Model group c. Prednisone acetate group d－f. Jianpi Yiqi Shexue Formula low－, medium－ and high－dose groups

A. Th17 B. Treg

Fig. 2 Flow cytometry of mice in each group



a. 空白对照组 b. 模型组 c. 醋酸泼尼松组 d－f. 健脾益气摄血方低、中、高剂量组

A. Th17 B. Treg

图3 各组小鼠外周血中Th17及Treg细胞比例

a. Blank control group b. Model group c. Prednisone acetate group d－f. Jianpi Yiqi Shexue Formula low－, medium－ and high－dose groups

A. Th17 B. Treg

Fig. 3 Proportion of Th17 and Treg cells in peripheral blood of mice in each group

2.3 脾脏组织中Th17及Treg细胞比例

与空白对照组比较，模型组小鼠脾脏中Th17（$CD_4^+IL-17^+$）细胞显著增多，Treg（$CD_4^+CD_{25}^+Foxp3^+$）细胞显著减少（$P<0.01$）；与模型组比较，各用药组小鼠脾脏中Th17细胞显著减少，Treg细胞显著增多（$P<0.05$或$P<0.01$），Th17/Treg细胞免疫失衡现象明显改善。详见图2、图3。

2.4 血清IL－17，IL－6，TGF－β_1，IL－10水平

与空白对照组比较，模型组小鼠血清中IL－17，IL－6，TGF－β_1水平显著升高，IL－10含量显著降低（$P<0.01$）；与模型组比较，各用药组小鼠血清IL－17，IL－6，TGF－β_1水平显著降低，IL－10水平显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$）。详见表2。

2.5 脾脏组织中RORγt和Foxp3的mRNA表达水平

与空白对照组比较，模型组小鼠脾脏组织RORγt mRNA表达水平显著升高，Foxp3 mRNA表达显著降低（$P<0.01$）；与模型组比较，各用药组小鼠脾脏组织RORγt mRNA表达水平显著降低，Foxp3 mRNA表达水平显著升高（$P<0.01$）。详见表3。

2.6 脾脏组织中RORγt和Foxp3的蛋白表达水平

与空白对照组比较，模型组小鼠脾脏组织中RORγt的蛋白表达水平显著升高，Foxp3的表达水平显著降低（$P<0.01$）；与模型组比较，各用药组小鼠脾脏组织RORγt蛋白表达水平显著降低，Foxp3蛋白表达水

表 2　各组小鼠血清中 IL－17，IL－6，IL－10，TGF－β_1 水平比较（$\overline{X} \pm s$，pg / mL，$n = 10$）

Tab. 2　Comparison of IL－17，IL－6，IL－10 and TGF－β_1 levels in serum of mice in each group（$\overline{X} \pm s$，pg / mL，$n = 10$）

组别	IL－17	IL－6	TGF－β_1	IL－10
空白对照组	37.51 ± 7.38	57.90 ± 11.17	63.78 ± 8.66	59.06 ± 6.25
模型组	69.34 ± 10.41*	96.59 ± 13.02*	131.50 ± 17.83*	30.54 ± 7.82*
醋酸泼尼松组	44.56 ± 7.29##	70.22 ± 10.54##	79.52 ± 10.54##	50.70 ± 9.43##
健脾益气摄血方低剂量组	56.56 ± 9.75#	83.61 ± 9.05#	98.38 ± 19.52##	37.59 ± 6.12#
健脾益气摄血方中剂量组	52.17 ± 8.62##	76.52 ± 10.27##	90.40 ± 17.95##	41.62 ± 9.53#
健脾益气摄血方高剂量组	48.35 ± 9.30##	72.34 ± 8.64##	84.76 ± 18.50##	45.31 ± 6.07##

表 3　各组小鼠脾脏组织 RORγt 和 Foxp3 的 mRNA 表达水平比较（$\overline{X} \pm s$，$n = 10$）

Tab. 3　Comparison of RORγt and Foxp3 mRNA expression levels in spleen tissue of mice in each group（$\overline{X} \pm s$，$n = 10$）

组别	RORγt mRNA	Foxp3 mRNA
空白对照组	0.24 ± 0.05	0.93 ± 0.10
模型组	0.72 ± 0.06*	0.44 ± 0.06*
醋酸泼尼松组	0.45 ± 0.04##	0.76 ± 0.07##
健脾益气摄血方低剂量组	0.64 ± 0.07##	0.58 ± 0.04##
健脾益气摄血方中剂量组	0.56 ± 0.06##	0.62 ± 0.06##
健脾益气摄血方高剂量组	0.49 ± 0.03##	0.70 ± 0.05##

平显著升高（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）。详见图 4。

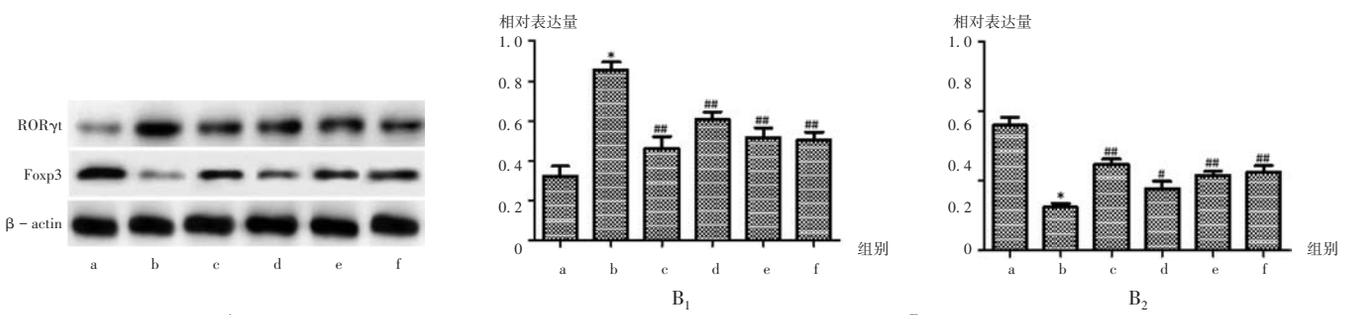
3　讨论

ITP 是由于机体细胞免疫及体液免疫失衡导致外周血中血小板减少，约占出血性疾病总数的 30%，以血小板计数偏低、皮肤黏膜及内脏出血倾向、骨髓巨核细胞成熟障碍等为主要特征[1－2]。现代医学对该病仍缺乏有效的治疗方法，糖皮质激素为首选治疗药物，但长期大量应用药品不良反应较大，部分患者可产生药物依赖或抗药性；采用脾切除术亦有继发感染、败血症等并发症风险[3]。中医临床针对本病本虚标实的主要病机，根据“急则治其标，缓则治其本”的原则辨证施治，不仅能有效改善出血症状，还可调节机体的免疫功能，减轻血小板的破坏程度，恢复血小板计数的正常水平[4－5]。

根据 ITP 的临床表现，中医将其归入“血证”“发斑”“葡萄疫”等范畴，认为病机总属本虚标实，虚多实少，实证常见热毒、瘀血，虚证多为脾气亏虚、气不摄血[9]。脾为后天之本，气血生化之源，《血证论》云：“治血者，必以脾为主，乃为有要。至于治气，亦宜以脾为主。”[10] 脾气健旺则气血充足，脾主统血功能正常则血液能正常循行脉中而不致溢于脉外；脾气亏虚，不能固摄血液则血不循经，导致出血倾向[11]，可见 ITP 的治疗应以健脾益气为主要原则。

健脾益气摄血方在补气基础方四君子汤基础上增加止血药物，方中黄芪性温味甘，有益气健脾、升举下陷、固气摄脱功效，常用治气不摄血、气血两虚证，为君药；党参性平味甘，有补中益气、健脾益肺功效，茯苓性平味甘淡，有健脾和胃、利水渗湿、宁心安神功效，白术性温味苦，有健脾益气、燥湿利水功效，三药共为臣药；阿胶补血摄血、滋阴润燥，茜草逐瘀通经、凉血止血，二药一清一补，配伍使用可使止血疗效大增，共为佐药；炙甘草益气和中，缓和药性，为使药。诸药合用，共奏健脾益气、养血止血功效。临床实践证明，健脾益气摄血方能有效提升 ITP 患者的血小板计数，改善临床症状，且药品不良反应少，具有较高的应用价值[6－7]。

细胞免疫及体液免疫紊乱是 ITP 的主要发病机制，其中 Th17 及 Treg 免疫功能失衡是目前 ITP 机制研究的热点[8]。Th17 细胞是近年发现的 CD_4^+ T 淋巴细胞亚群，能特异性地分泌 IL－17，参与机体的炎性反应及造成免疫紊乱，其介导的自身免疫性损伤可能是 ITP 发生的



A　　B_1　　B_2

a. 空白对照组　b. 模型组　c. 醋酸泼尼松组　d－f. 健脾益气摄血方低、中、高剂量组

A. 电泳图　B. 统计数据（B_1. RORγt；B_2. Foxp3）

图 4　各组小鼠脾脏组织中 RORγt 和 Foxp3 的蛋白表达水平

a. Blank control group　b. Model group　c. Prednisone acetate group　d－f. Jianpi Yiqi Shexue Formula low－, medium－ and high－dose groups

A. Electrophoretogram　B. Statistical data（B_1. RORγt；B_2. Foxp3）

Fig. 4　Expression of RORγt and Foxp3 protein in spleen tissue of mice in each group

重要机制。Treg属具有免疫调节功能的T细胞亚群，其特异性胞内转录因子Foxp3的上调可促进IL－10等抑炎细胞因子表达，减轻机体过度免疫和炎性反应[12－14]。Th17与Treg在功能上相互制约，其平衡状态对于维持机体正常免疫功能、防止炎性及自身免疫性疾病至关重要[15－16]。

本研究结果表明，健脾益气摄血方能明显升高ITP模型小鼠外周血血小板计数，减轻肾脏及脾脏组织损伤，改善骨髓巨核细胞成熟障碍，且具有剂量依赖性，以高剂量改善更明显。流式细胞仪检测结果显示，经健脾益气摄血方处理后，脾脏中Th17（CD_4^+IL－17$^+$）细胞比例较模型组显著减少，Treg（$CD_4^+CD_{25}^+$Foxp3$^+$）细胞比例明显增加，提示该方明显改善了ITP模型小鼠Th17/Treg细胞免疫失衡现象。TGF－β_1和IL－6是诱导Th17分化的关键细胞因子，能通过刺激初始T细胞、激活Th17特异性转录因子RORγt来诱导Th17细胞分化[17－18]。与空白对照组比较，模型组小鼠血清中IL－17，IL－6，TGF－β_1水平均明显升高，IL－10水平明显降低，脾脏组织RORγt蛋白及mRNA的表达水平明显升高，Foxp3则明显降低。提示IL－6和TGF－β_1水平均升高，激活RORγt信号转导通路，促进Th17细胞分化及IL－17过表达，同时抑制Treg细胞功能，导致Treg/Th7细胞免疫失衡，可能是ITP的重要发病机制。与模型组比较，各用药组小鼠血清中IL－17，IL－6，TGF－β_1水平均明显降低，IL－10水平明显升高，脾脏组织中RORγt的蛋白及mRNA的表达水平均明显降低，Foxp3则明显升高，表明该方可能通过降低RORγt及Th17细胞因子的表达抑制Th17细胞增殖，同时通过上调Foxp3表达，恢复Treg细胞功能，从而改善Th17/Treg细胞免疫失衡，减轻模型小鼠血小板的持续降低及脾肾组织的损伤，发挥对ITP的改善作用。

综上所述，健脾益气摄血方对模型小鼠的ITP有明显改善作用，其机制可能与调节Th17/Treg细胞免疫失衡有关。

参考文献

[1] ONISÂI M, VLĂDĂREANU AM, SPÎNU A, et al. Idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) －new era for an old disease[J]. Rom J Intern Med, 2019, 57(4): 273－283.

[2] WU SC, LIN SF, FANG CW, et al. Immune thrombocytopenic purpura increased risk of subsequent pancreatitis: a nationwide population cohort study[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 16923.

[3] LAMBERT MP, GERNSHEIMER TB. Clinical updates in adult immune thrombocytopenia[J]. Blood, 2017, 129(21): 2829－2835.

[4] 蒋占平. 中医药治疗免疫性血小板减少性紫癜的概况[J]. 中华针灸电子杂志, 2018, 7(2): 85－88.

[5] 夏小军, 段　赟. 中医药治疗免疫性血小板减少性紫癜的思路与方法[J]. 西部中医药, 2016, 29(3): 41－44.

[6] 林建锋, 易仕青, 杨志远, 等. 健脾益气摄血方联合吗替麦考酚酯治疗原发性免疫性血小板减少症疗效观察[J]. 现代中西医结合杂志, 2016, 25(35): 3931－3933.

[7] 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.

[8] ZHANG GY, ZHANG P, LIU HY, et al. Assessment of Th17/Treg cells and Th cytokines in an improved immune thrombocytopenia mouse model[J]. Hematology, 2017, 22(8): 493－500.

[9] 陈晓娟. 免疫性血小板减少性紫癜中医证候分析[J]. 临床医药文献杂志, 2015, 2(26): 5407－5408.

[10] 王　寒, 陈　斌. 从《血证论》探讨免疫性血小板减少性紫癜的中医治疗[J]. 中西医结合研究, 2020, 12(1): 58－60.

[11] 杨莹莹, 王天芳, 赵丽红. 脾不统血证的研究进展[J]. 中医药导报, 2019, 25(18): 108－111.

[12] HAO YT, LI HY, LI Y, et al. Decreased TLR4 expression on monocytes may cause regulatory T cells abnormality in patients with primary immune thrombocytopenia[J]. Autoimmunity, 2017, 50(5): 283－292.

[13] ZHOU LY, XU F, CHANG CK, et al. Interleukin－17－producing CD_4^+ T lymphocytes are increased in patients with primary immune thrombocytopenia[J]. Blood Coagul Fibrinolysis, 2016, 27(3): 301－307.

[14] YU S, LIU CF, LI LH, et al. Inactivation of Notch signaling reverses the Th17/Treg imbalance in cells from patients with immune thrombocytopenia[J]. Lab Invest, 2015, 95(2): 157－167.

[15] LEE GR. The Balance of Th17 versus Treg Cells in Autoimmunity[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(3): 730.

[16] FASCHING P, STRADNER M, GRANINGER W, et al. Therapeutic Potential of Targeting the Th17/Treg Axis in Autoimmune Disorders[J]. Molecules, 2017, 22(1): 134.

[17] LEI L, ZHAO C, QIN F, et al. Th17 cells and IL－17 promote the skin and lung inflammation and fibrosis process in a bleomycin－induced murine model of systemic sclerosis[J]. Clin Exp Rheumatol, 2016, 100(5): 14－22.

[18] 王　潇, 周郁鸿, 陈小红, 等. Th17细胞在特发性血小板减少性紫癜发病中的作用和意义[J]. 中国实验血液学杂志, 2016, 24(6): 1833－1836.

（收稿日期：2021－03－11；修回日期：2021－09－20）