

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2023.21.006  
文章编号: 1005-8982 (2023) 21-0033-08

实验研究·论著

## 基于VIP/PACAP介导的肠道免疫功能失调探讨 强的松治疗免疫性血小板减少症的效应机制\*

车明璐<sup>1</sup>, 严香<sup>1</sup>, 王冬雨<sup>1</sup>, 孙叙敏<sup>2</sup>, 郎海燕<sup>1</sup>, 黄子明<sup>1</sup>, 何昊<sup>3</sup>, 赵倩<sup>1</sup>, 张雅月<sup>1</sup>

(1.北京中医药大学东直门医院, 北京 100700; 2.应急总医院, 北京 100028;  
3.陕西省西安医学院, 陕西 西安 710021)

**摘要:** **目的** 通过检测脑、结肠、血清中血管活性肠肽(VIP)、垂体腺苷酸环化酶激活多肽(PACAP)水平,探讨强的松治疗免疫性血小板减少症(ITP)的潜在机制。**方法** BALB/c小鼠18只,SPF级,体重18~22g,雌雄各半,采用全自动血细胞计数仪检测血小板计数,依据血小板计数采用区间分组法随机分为正常组、模型组及强的松组,每组6只。正常组注射生理盐水,模型组和强的松组注射抗小鼠血小板血清(APS)复制ITP动物模型。强的松组在模型复制第8天起开始强的松干预,正常组和模型组则予以生理盐水;注射APS前、注射后第4天、实验第8天(给药第1天)、实验第12天(给药第5天)、实验第15天(给药第8天)动态检测血小板计数;实验结束后采用酶联免疫吸附试验(ELISA)分别检测小鼠脑、结肠、血清中VIP、PACAP含量;用免疫组织化学法观察小鼠肠系膜淋巴结淋巴细胞P53蛋白表达的变化;原位末端转移酶标记法(TUNEL)检测小鼠肠系膜淋巴结淋巴细胞凋亡率的变化。采用ELISA检测小鼠脾脏中 $\gamma$ 干扰素(IFN- $\gamma$ )、白细胞介素-4(IL-4)、白细胞介素-10(IL-10)、白细胞介素-17A(IL-17A)的水平。**结果** 与正常组比较,模型组及强的松组注射APS后,小鼠生命活力明显减弱,并于实验第8天出现皮肤渗血等现象;强的松组经药物干预后,小鼠进食量和体重均增加,毛色恢复光亮,渗血点减少。实验各组小鼠注射APS前、注射后第4天、实验第8天(给药第1天)、实验第12天(给药第5天)、实验第15天(给药第8天)不同时间点的外周血小板计数比较:①不同时间点的外周血小板计数有差异( $F=20.618, P=0.000$ );②3组的外周血小板计数有差异( $F=59.621, P=0.000$ );③3组的外周血小板计数随时间变化趋势有差异( $F=7.072, P=0.000$ )。与正常组比较,模型组小鼠肠系膜淋巴结淋巴细胞P53蛋白表达升高( $P<0.05$ ),淋巴细胞凋亡率升高( $P<0.05$ )。与模型组比较,强的松组小鼠肠系膜淋巴结淋巴细胞P53蛋白表达降低( $P<0.05$ ),淋巴细胞凋亡率降低( $P<0.05$ )。与正常组比较,模型组小鼠在脑、结肠、血清中VIP、PACAP水平均下降( $P<0.05$ );与模型组比较,强的松组小鼠在脑、结肠、血清中VIP水平均升高( $P<0.05$ );强的松组小鼠在脑、结肠中PACAP水平均升高( $P<0.05$ )。与正常组比较,模型组小鼠脾脏中IFN- $\gamma$ 、IL-17A水平均升高( $P<0.05$ ),IL-4、IL-10水平均下降( $P<0.05$ );与模型组比较,强的松组小鼠脾脏中IFN- $\gamma$ 、IL-17A水平均下降( $P<0.05$ ),IL-4、IL-10水平均上升( $P<0.05$ )。**结论** 基于VIP/PACAP调节肠道免疫功能可能是强的松治疗ITP的潜在机制之一。

**关键词:** 免疫性血小板减少症;血管活性肠肽;肠道免疫;强的松

**中图分类号:** R558.2

**文献标识码:** A

## Investigation of the mechanisms of high-dose methylprednisolone treatment for immune thrombocytopenia based on VIP/PACAP-mediated intestinal immune dysfunction\*

收稿日期: 2023-04-12

\* 基金项目: 国家自然科学基金青年基金(No:81703903)

[通信作者] 张雅月, E-mail: yayuezhang@126.com

Che Ming-lu<sup>1</sup>, Yan Xiang<sup>1</sup>, Wang Dong-yu<sup>1</sup>, Sun Xu-min<sup>2</sup>, Lang Hai-yan<sup>1</sup>,  
Huang Zi-ming<sup>1</sup>, He Hao<sup>3</sup>, Zhao Qian<sup>1</sup>, Zhang Ya-yue<sup>1</sup>

(1. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China; 2. Emergency General Hospital, Beijing 100028, China; 3. Xi'an Medical University, Xi'an, Shaanxi 710021, China)

**Abstract: Objective** To investigate the potential mechanisms of high-dose methylprednisolone treatment for immune thrombocytopenia (ITP) by assessing the levels of vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the brain, colon, and serum. **Methods** A total of 18 BALB/c mice, SPF grade, weighing 18-22 g, with an equal distribution of males and females, were utilized. Blood platelet counts were measured using an automatic hematology analyzer. Based on platelet counts, the mice were randomly divided into three groups: a normal group, a model group, and a high-dose methylprednisolone group, each consisting of 6 mice. The normal group received injections of physiological saline, while the model and high-dose methylprednisolone groups were injected with anti-mouse platelet serum (APS) to replicate an ITP animal model. High-dose methylprednisolone treatment began in the high-dose methylprednisolone group on the 8th day after model induction, while the normal and model groups received physiological saline. Peripheral blood platelet counts were monitored at different time points: before APS injection, 4 days after injection, the 8th day of the experiment (day 1 of treatment), the 12th day of the experiment (day 5 of treatment), and the 15th day of the experiment (day 8 of treatment). Following the experiment, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to measure the levels of VIP and PACAP in the brain, colon, and serum. Immunohistochemistry was employed to observe changes in P53 protein expression in lymphocytes of the mesenteric lymph nodes of mice, and the terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL) method was used to assess the apoptosis rate of lymphocytes in mesenteric lymph nodes. ELISA was also conducted to evaluate the levels of IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, and IL-17A in the spleen of mice. **Results** Compared to the normal group, both the model group and the high-dose methylprednisolone group exhibited reduced vitality and developed symptoms such as skin hemorrhage after APS injection. High-dose methylprednisolone treatment in the high-dose methylprednisolone group led to increased food intake, body weight, and improved coat condition, with reduced bleeding spots. Comparing platelet counts at various time points among the groups: (1) Platelet counts at different time points showed significant differences ( $F = 20.618$ ,  $P = 0.000$ ); (2) Platelet counts differed among the three groups ( $F = 59.621$ ,  $P = 0.000$ ); (3) Platelet counts displayed different trends over time among the three groups ( $F = 7.072$ ,  $P = 0.000$ ). Compared to the normal group, the model group exhibited elevated P53 protein expression in lymphocytes of the mesenteric lymph nodes ( $P < 0.05$ ) and an increased rate of lymphocyte apoptosis ( $P < 0.05$ ). When compared to the model group, the high-dose methylprednisolone group showed decreased P53 protein expression in lymphocytes of the mesenteric lymph nodes ( $P < 0.05$ ) and reduced lymphocyte apoptosis ( $P < 0.05$ ). Furthermore, compared to the normal group, the model group displayed decreased levels of VIP and PACAP in the brain, colon, and serum ( $P < 0.05$ ). In comparison to the model group, the high-dose methylprednisolone group showed elevated VIP levels in the brain, colon, and serum ( $P < 0.05$ ), as well as increased PACAP levels in the brain and colon ( $P < 0.05$ ). Finally, when compared to the normal group, the model group had higher levels of IFN- $\gamma$  and IL-17A in the spleen ( $P < 0.05$ ) and lower levels of IL-4 and IL-10 ( $P < 0.05$ ). In contrast, the high-dose methylprednisolone group had lower levels of IFN- $\gamma$  and IL-17A ( $P < 0.05$ ) and higher levels of IL-4 and IL-10 in the spleen ( $P < 0.05$ ) compared to the model group. **Conclusion** The modulation of intestinal immune function via VIP/PACAP signaling pathways may represent one of the potential mechanisms underlying the effectiveness of high-dose methylprednisolone treatment for ITP.

**Keywords:** immune thrombocytopenia; vasoactive intestinal peptide; intestinal immunity; high-dose methylprednisolone

免疫性血小板减少症 (immune thrombocytopenia, ITP) 是一种自身免疫性疾病, 据美国血液学会<sup>[1]</sup> (American Society of Hematology, ASH) 指出, 成人 ITP 年发病率为 0.02% ~ 0.05%。发病机制尚未明确, 目

前认为 ITP 的发生是由于体液免疫和细胞免疫介导的血小板过度破坏, 以及巨核细胞数量和质量异常, 导致血小板生成不足<sup>[2]</sup>。强的松作为 ITP 的一线治疗<sup>[1]</sup>, 在临床治疗中疗效显著, 但其作用机制尚不

明确,因此,针对目前 ITP 机制研究的关键在于免疫机制的失衡和调控。

北京中医药大学东直门医院血液肿瘤科研究团队前期研究发现,强的松治疗 ITP 止血机制与对血管活性物质,如血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)、5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)水平的调控有一定关联性<sup>[3]</sup>。其中,VIP 作为脑肠轴中一种重要的神经递质,具有扩张血管、传递信息及调节免疫的作用等<sup>[4]</sup>。垂体腺苷酸环化酶激活多肽(pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, PACAP)与 VIP 相似,也是一种脑肠肽,可以被作为中枢或肠道的肽能神经所释放的神经递质或调节介质起到调节组织或器官的生理作用<sup>[5]</sup>。近年来,随着脑肠轴学说的深入,越来越多的研究证实 VIP/PACAP 参与免疫功能调节<sup>[6-7]</sup>。因此,本研究提出强的松治疗 ITP 机制可能与 VIP/PACAP 及其介导的肠道免疫相关的假设。目前少有相关实验室研究对这一假设提供数据佐证。为验证该假设,本研究通过复制 ITP 模型小鼠,以 VIP、PACAP 介导肠道免疫调控为主线,观察 ITP 发生与 VIP、PACAP 表达水平及肠道免疫失调的相关性,检测小鼠肠系膜淋巴结淋巴细胞 P53 蛋白表达、淋巴细胞凋亡率的变化,不同组织中 VIP、PACAP 的含量,以及脾脏中  $\gamma$  干扰素(Interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )、白细胞介素-4(Interleukin-4, IL-4)、白细胞介素-10(Interleukin-10, IL-10)、白细胞介素-17A(Interleukin-17A, IL-17A)水平,探讨强的松治疗 ITP 的潜在作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

SPF 级 BALB/c 小鼠,28 只,雌雄各半,体重 18~22 g,8 周龄,购于空军军医大学实验动物中心,于无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级实验室 IVC 鼠笼中饲养,室温 20~25 °C,相对湿度 50%~60%。豚鼠,10 只,雌性,3 月龄,体重 240~250 g,购于兴平市天瑞实验动物养殖场,于普通环境下饲养,室温 20~25 °C,相对湿度 50%~60%,实验动物生产许可证号:SCXK(陕)2012-001,于 SPF 级实验室饲养。实验动物生产许可证号:SCXK(陕)2014-002,实验动物使用许可证号:SYXK(陕)2017-004。

本研究经陕西省西安医学院动物伦理委员会审批(伦理审批号:XYLS2019069)。

### 1.2 主要药物、试剂与仪器

强的松(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,规格:1 g,批号:28778)。完全弗氏佐剂(Sigma-Aldrich,美国,批号:SLBF2619V),不完全弗氏佐剂(Sigma-Aldrich,美国,批号:SLBH7317V),磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered saline, PBS)(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号:ZLI-9062),小鼠 VIP 酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号:ml001911),小鼠 PACAP ELISA 检测试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号:ml002234),小鼠 IFN- $\gamma$  ELISA 检测试剂盒(Proteintech Group,美国,批号:KE10001),小鼠 IL-4 ELISA 检测试剂盒(Proteintech Group,美国,批号:KE10010),小鼠 IL-10 ELISA 检测试剂盒(Proteintech Group,美国,批号:KE10008),小鼠 IL-17A ELISA 检测试剂盒(Proteintech Group,美国,批号:KE10020),DAPI 染色液(北京雷根生物技术有限公司,批号 DA0001);兔抗 P53 多克隆抗体(武汉爱博泰克生物科技有限公司,批号 A3185),山羊抗兔工作液(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 SP-9001),浓缩型 DAB 试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 K135925C),TUNEL 试剂盒(Roche Group,瑞士,批号 11684795910)。

微量高速离心机(湖南长沙湘仪检测设备有限公司,型号:H1650-W),全波长酶标仪(美国赛默飞科技公司,型号:Multiskan GO no. 51119300),全自动动物血液分析仪(北京普朗新技术有限公司,型号:XFA6130),TSJ-II 型全自动封闭式组织脱水机(中国常州市中威电子仪器有限公司),BMJ-III 型包埋机(常州郊区中威电子仪器厂),PHY-III 型病理组织漂烘仪(常州市中威电子仪器有限公司),Pannoramic 250 型数字切片扫描仪(济南丹吉尔电子有限公司),TDZ4-WS 型台式低速离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司),BA400 型数码三目摄像显微镜(厦门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),cytoflex 型流式细胞仪(美国 Beckman 公司)。

### 1.3 分组与模型复制

实验前从 28 只 BALB/c 小鼠中取 18 只尾静脉取血, 采用全自动血细胞计数仪检测血小板数, 按照血小板计数采用区间分组法随机分组, 分别为正常组、模型组、强的松组, 每组 6 只小鼠。除正常组外, 其余两组小鼠使用豚鼠抗小鼠血小板血清 APS 注射法复制免疫性 ITP 模型小鼠, 步骤如下: 取剩余 10 只 BALB/c 小鼠麻醉取抗凝全血, 梯度离心(常温 1 100 r/min 离心 10 min, 3 000 r/min 离心 10 min, 离心半径 6 cm)得到血小板, 用 PBS 调整浓度至  $2.5 \times 10^6$  个/mL, 分别与等量完全弗氏佐剂和不完全弗氏佐剂混匀作抗原, 于模型复制开始注射含完全弗氏佐剂抗原于豚鼠足掌、背及皮下, 共 5 个点, 合计 1 mL; 分别于模型复制第 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。模型复制第 5 周从豚鼠心脏取不抗凝全血, 离心(常温 1 000 r/min 离心 10 min, 离心半径 6 cm)取上清液, 即得豚鼠抗小鼠血小板血清(GP-APS)。置于 56 °C 水浴 30 min 灭活补体, 用等量 BALB/c 小鼠红细胞吸附至少 2 次, 最后用生理盐水稀释成 1:4 浓度 APS 备用。之后除正常组按 100  $\mu$ L/20 g 剂量腹腔注射生理盐水外, 其余两组均按 100  $\mu$ L/20 g 剂量隔日向小鼠腹腔内注射 APS, 重复注射至实验结束, 共注射 8 次。依据病证结合模型辨识标准<sup>[8]</sup>判定模型复制是否成功。APS 血清组光密度(optical density, OD)平均为 0.300, 空白孔 OD 值平均为 0.163, 相差约 2 倍, 模型复制成功。

### 1.4 给药方法

第 8 天模型复制成功后, 实验各组开始给药。根据《中国成人重症患者血小板减少诊疗专家共识》<sup>[9]</sup>指出, 使用糖皮质激素治疗 ITP 通常推荐口服给药, 可使用泼尼松 1 mg/(kg·d)。按照人鼠用药量换算公式计算得出, 各组均按 0.1 mL/10 g 体积药物灌胃干预, 1 次/d, 共给药 8 d。正常组、模型组均予生理盐水; 强的松组给予强的松按 2 mg/mL 配制<sup>[10-11]</sup>。

### 1.5 指标检测与方法

**1.5.1 全自动血液分析仪检测血小板计数** 分别于注射 APS 前、注射后第 4 天、实验第 8 天(给药第 1 天)、实验第 12 天(给药第 5 天)、实验第 15 天(给药第 8 天), 各组 6 只小鼠分别尾静脉取血, 采用全

自动血液凝固分析仪检测外周血小板计数。

**1.5.2 ELISA 检测脑组织、结肠及血清中 VIP、PACAP 含量** ①标本制备: 实验结束后, 处死各组小鼠, 取脑、结肠组织及腹主动脉血, PBS 冲洗脑、结肠组织, 按 1:9 比例加入预冷的 PBS 研磨匀浆脑、结肠组织, 4 °C 离心, 5 000 r/min, 15 min, 收集上清液。保存过程中如有沉淀形成, 再次离心收集上清液。②检测方法: 按照小鼠 VIP 和 PACAP ELISA 检测试剂盒使用说明书步骤, 应用双抗体夹心法测定标本中小鼠脑组织、结肠及血清中 VIP、PACAP 水平。用纯化的小鼠 VIP、PACAP 抗体包被微孔板, 制成固相抗体, 往包被单抗的微孔中依次加入 VIP、PACAP, 再与 HRP 标记的 VIP、PACAP 抗体结合, 形成抗体-抗原-酶标抗体复合物, 经过彻底洗涤后加底物 TMB 显色。TMB 在 HRP 酶的催化下转化为蓝色, 并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的 VIP、PACAP 水平呈正相关。用酶标仪在 450 nm 波长下测定 OD 值, 通过标准曲线计算样品中小鼠脑组织、结肠及血清中 VIP、PACAP 浓度。

### 1.5.3 ELISA 检测脾脏淋巴细胞相关细胞因子表达

①标本制备: 实验结束后, 处死各组小鼠, 取脾组织, PBS 冲洗脾组织, 按 1:9 比例加入预冷的 PBS 研磨匀浆脾组织, 4 °C 下 5 000 r/min 离心 15 min, 收集脾组织上清液。保存过程中如有沉淀形成, 再次离心收集上清液。②检测方法: 按照 IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-10、IL-17A ELISA 检测试剂盒使用说明书, 应用双抗体夹心法检测标本中小鼠脾脏中 IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-10、IL-17A 水平。用纯化的小鼠 IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-10、IL-17A 抗体包被微孔板, 制成固相抗体, 往包被单抗的微孔中依次加入 IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-10、IL-17A, 再与 HRP 标记的 IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-10、IL-17A 抗体结合, 形成抗体-抗原-酶标抗体复合物, 经过彻底洗涤后加底物 TMB 显色。TMB 在 HRP 酶的催化下转化为蓝色, 并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的 IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-10、IL-17A 水平呈正相关。用酶标仪在 450 nm 波长下测定 OD 值, 通过标准曲线计算样品中小鼠脾脏中 IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-10、IL-17A 蛋白水平。

**1.5.4 免疫组织化学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 次后将加入柠檬酸盐缓冲液进行抗原修复, 随后滴加山羊血清进行封闭 20 min; 滴加一抗(浓度 1:50), 4 °C 过夜; 滴加生物素化二抗(浓度 1:200), 37 °C 温箱静置 30 min; PBS 洗涤 3 次, 加入 DAB 显色; 蒸馏水冲洗, 使用苏木精轻度复染, 脱水, 中性树胶封片。置于显微镜下进行图像采集, 计算图像的 OD 值和面积, 计算每张图像的平均 OD 值。

**1.5.5 原位末端转移酶标记法(TUNEL)检测肠系膜淋巴结淋巴细胞凋亡率** 将淋巴结切片常规脱蜡至水, 用柠檬酸微波修复 8 min, 然后 PBS 洗 3 次; 暗处配制 TUNEL 孵育液(A:B=1:30), 37 °C 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, 置入 -20 °C 冰箱冷冻保存; 最后采用数字切片扫描仪进行图像采集, 并测定图像的 OD 值和面积, 计算细胞凋亡百分比(细胞凋亡率=全部图像的 OD 值/面积 × 100%)。

## 1.6 统计学方法

数据分析采用 SPSS 26.0 统计软件。计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 比较用单因素方差

分析或重复测量设计的方差分析, 两两比较用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 小鼠一般情况

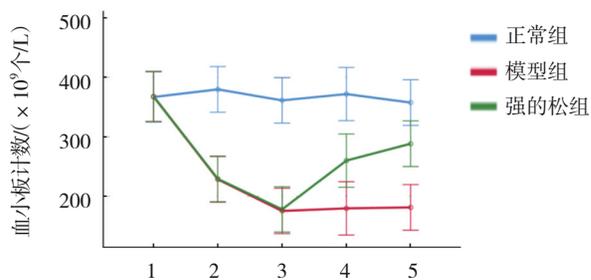
正常组小鼠反应灵活, 毛色光亮, 无渗血点; 模型组及强的松组注射 APS 后第 4 天, 小鼠反应迟钝, 皮毛干枯, 活力明显减弱。实验第 8 天, 模型组及强的松组动物体重均低于正常组, 出现进食量下降、皮肤渗血等现象。实验第 15 天, 强的松组经药物干预后, 小鼠进食量和体重明显增加, 毛色恢复光亮, 渗血点明显减少。

### 2.2 外周血小板计数比较

实验各组小鼠注射 APS 前、注射后第 4 天、实验第 8 天(给药第 1 天)、实验第 12 天(给药第 5 天)、实验第 15 天(给药第 8 天)不同时间点的外周血小板计数比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点外周血小板计数有差异( $F = 20.618$ ,  $P = 0.000$ ); ②3 组外周血小板计数有差异( $F = 59.621$ ,  $P = 0.000$ ); ③3 组外周血小板计数随时间变化趋势有差异( $F = 7.072$ ,  $P = 0.000$ )。见表 1 和图 1。

表 1 正常组、模型组和强的松组不同时间点的外周血小板计数比较 ( $n = 6$ ,  $\times 10^9/L$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	注射 APS 前	注射后第 4 天	实验第 8 天	实验第 12 天	实验第 15 天
正常组	366.83 ± 50.67	379.67 ± 39.40	361.17 ± 43.75	371.83 ± 45.30	357.50 ± 44.02
模型组	367.83 ± 46.42	228.50 ± 51.64	175.33 ± 35.60	179.67 ± 61.55	181.33 ± 47.56
强的松组	367.50 ± 48.22	229.17 ± 40.31	178.00 ± 50.65	260.00 ± 45.59	288.33 ± 40.37



1: 注射 APS 前; 2: 注射后第 4 天; 3: 实验第 8 天; 4: 实验第 12 天; 5: 实验第 15 天。

图 1 各组小鼠外周血小板时间变化趋势图

### 2.3 肠系膜淋巴结淋巴细胞 P53 蛋白表达的变化

实验结束后, 小鼠解剖分离出肠系膜淋巴结组织, 用免疫组织化学法观察肠系膜淋巴结淋巴细胞 P53 蛋白表达的变化; TUNEL 法检测小鼠肠系

膜淋巴结淋巴细胞凋亡率的变化。正常组、模型组、强的松组 3 组小鼠肠系膜淋巴结淋巴细胞 P53 蛋白表达水平分别为 ( $0.208 \pm 0.009$ )、( $0.252 \pm 0.028$ )、( $0.219 \pm 0.025$ ), 经方差分析, 差异有统计学意义( $F = 3.834$ ,  $P = 0.015$ )。与正常组比较, 模型组小鼠肠系膜淋巴结淋巴细胞 P53 蛋白表达升高( $P < 0.05$ )。正常组、模型组、强的松组 3 组小鼠肠系膜淋巴结细胞凋亡率分别为 ( $0.67 \pm 0.43$ )%、( $21.69 \pm 5.38$ )%、( $5.56 \pm 2.07$ )%, 经方差分析, 差异有统计学意义( $F = 65.107$ ,  $P = 0.000$ ); 模型组小鼠肠系膜淋巴结细胞凋亡率高于正常组( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 强的松组细胞凋亡率下降( $P < 0.05$ )。各组小鼠 P53 肠系膜淋巴结显微图像显示, 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, 强的松组阳性产物较模型组少 (见图 2)。各组小鼠淋巴细胞凋亡图像

中凋亡细胞显核绿光, 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, 强的松组可见少数凋亡细胞 (见图 3)。

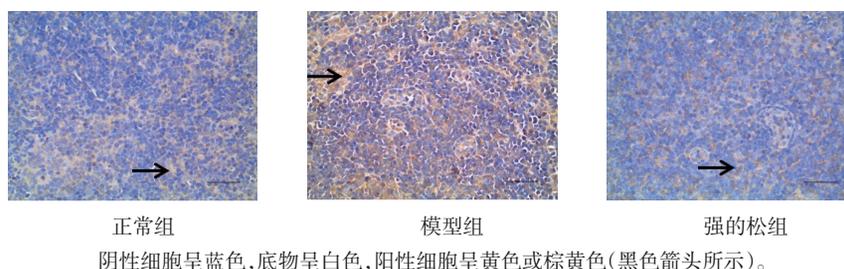


图 2 各组小鼠 P53 肠系膜淋巴结显微图像 (×400)

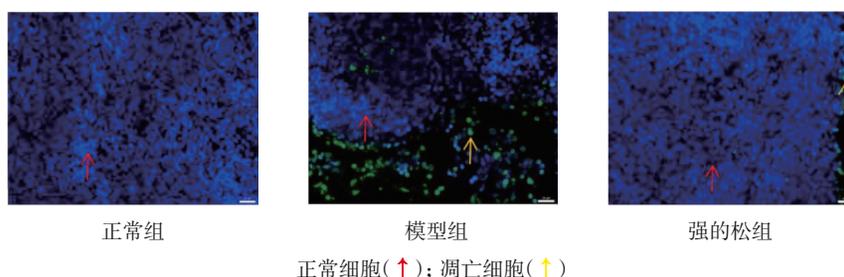


图 3 各组小鼠淋巴细胞凋亡图像 (TUNEL×400)

### 2.4 脑、结肠、血清中 VIP、PACAP 比较

正常组、模型组、强的松组 3 组小鼠脑、结肠、血清中 VIP、PACAP 表达水平比较, 经方差分析, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与正常组比较, 模型组小鼠脑、结肠、血清中 VIP、PACAP 水平均下降 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 强的松组小鼠脑、结肠、血清中 VIP 水平均升高 ( $P < 0.05$ ); 强的松组小鼠脑、结肠中 PACAP 水平均升高 ( $P < 0.05$ ), 但强的松组小鼠血清 PACAP 水平与模型组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 2、3。

表 2 各组小鼠脑、结肠、血清中 VIP 表达水平比较 ( $n=6, \text{pg/mL}, \bar{x} \pm s$ )

组别	脑	结肠	血清
正常组	28.75 ± 3.58	16.40 ± 2.49	13.82 ± 1.95
模型组	12.08 ± 1.82 <sup>①</sup>	8.67 ± 1.41 <sup>①</sup>	8.64 ± 1.13 <sup>①</sup>
强的松组	22.30 ± 3.16 <sup>②</sup>	13.56 ± 1.48 <sup>②</sup>	11.57 ± 1.62 <sup>②</sup>
F 值	48.655	26.511	15.706
P 值	0.000	0.000	0.000

注: ①正常组比较,  $P < 0.05$ ; ②与模型组比较,  $P < 0.05$ 。

表 3 各组脑、结肠、血清中 PACAP 表达水平比较 ( $n=6, \text{pg/mL}, \bar{x} \pm s$ )

组别	脑	结肠	血清
正常组	45.23 ± 3.74	31.53 ± 2.83	42.51 ± 3.61
模型组	22.93 ± 3.43 <sup>①</sup>	11.87 ± 2.56 <sup>①</sup>	16.26 ± 4.54 <sup>①</sup>
强的松组	32.05 ± 2.30 <sup>②</sup>	20.69 ± 2.97 <sup>②</sup>	20.26 ± 2.41
F 值	72.964	74.655	91.164
P 值	0.000	0.000	0.000

注: ①正常组比较,  $P < 0.05$ ; ②与模型组比较,  $P < 0.05$ 。

### 2.5 各组小鼠脾脏中各细胞因子水平比较

实验结束后 ELISA 检测结果显示, 正常组、模型组、强的松组小鼠脾脏中 IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-10、IL-17A 水平比较, 经方差分析, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与正常组比较, 模型组脾脏中 IFN- $\gamma$ 、IL-17A 水平均升高 ( $P < 0.05$ ), IL-4、IL-10 水平均下降 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 强的松组脾脏中 IFN- $\gamma$ 、IL-17A 水平均下降 ( $P < 0.05$ ), IL-4、IL-10 水平均上升 ( $P < 0.05$ )。见表 4。

表 4 各组脾脏中各细胞因子水平比较 ( $n=6$ , pg/mL,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	IFN- $\gamma$	IL-4	IL-10	IL-17A
正常组	91.63 $\pm$ 16.40	234.98 $\pm$ 12.03	32.02 $\pm$ 5.04	60.04 $\pm$ 4.45
模型组	163.91 $\pm$ 28.74 <sup>①</sup>	140.64 $\pm$ 21.58 <sup>①</sup>	17.09 $\pm$ 3.46 <sup>①</sup>	85.33 $\pm$ 6.11 <sup>①</sup>
强的松组	122.16 $\pm$ 9.69 <sup>②</sup>	190.87 $\pm$ 30.02 <sup>②</sup>	36.04 $\pm$ 3.10 <sup>②</sup>	78.35 $\pm$ 7.82 <sup>②</sup>
F 值	19.939	26.532	38.170	25.958
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注: ①正常组比较,  $P < 0.05$ ; ②与模型组比较,  $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

强的松作为 ITP 的一线治疗用药, 治疗 ITP 的主要作用机制是抑制体液和细胞介导的免疫反应, 减少血小板自身抗体的生成及减轻抗原抗体反应<sup>[12]</sup>; 抑制单核-巨噬细胞系统的吞噬作用, 减少对血小板的破坏, 从而升高血小板<sup>[13]</sup>。本研究通过 APS 复制 ITP 模型小鼠, 结果证实, 强的松能够提高 ITP 小鼠血小板计数, 给药第 5 天强的松组血小板计数明显恢复, 给药后第 8 天血小板计数持续上升。

VIP 是广泛分布于全身各器官系统中的一种舒血管因子和神经递质, 广泛存在于中枢神经和肠神经系统中<sup>[4]</sup>。VIP 由神经元和免疫细胞共同释放。各种类型的细胞, 包括免疫细胞, 均表达 VIP 受体<sup>[5]</sup>。VIP 作为神经递质、免疫调节剂、血管扩张剂和促分泌剂具有多效性作用。目前研究证明, VIP 与许多临床疾病的发生、发展、转归、治疗及预后相关。其中, 与胃肠动力紊乱性疾病、血管功能活动、慢性阻塞性肺病、肝胆疾病关系极为密切<sup>[14-16]</sup>。PACAP 与促胰液素和 VIP 一起发挥作用<sup>[6]</sup>。VIP 通过促进靶细胞合成一氧化氮而使平滑肌舒张。其主要作用是扩张血管、传递信息、调节免疫等, 如 VIP 和 PACAP 在免疫细胞损伤和/或出现炎症后, 可以发挥强大体内免疫调节行为<sup>[10]</sup>。神经和免疫系统通过多个器官中的 VIP/PACAP 等神经肽参与复杂的双向调节。本实验结果发现, 与正常小鼠比较, 模型组小鼠脑、结肠、血清中 VIP、PACAP 水平降低, 提示 VIP、PACAP 可能是 ITP 发病机制的重要一环。而在强的松干预后, 除血清 PACAP 以外, 两者水平较模型组上升, 提示强的松对 VIP、PACAP 有调控作用。

肠道黏膜是人体最大的免疫系统, 是与外界

接触的最大区域。肠道包含管腔微生物群和上皮、黏膜固有层和淋巴滤泡中的大量免疫细胞, 包括 Th1、Th2、Th17 和 Treg 细胞<sup>[17-18]</sup>。目前有研究发现一种新的 VIP/PACAP 免疫调节机制, 该机制通过诱导耐受性树突状细胞产生 Treg, 从而表达低水平 IFN- $\gamma$ , 以及高水平 IL-10<sup>[4, 6]</sup>。同时, IL-10 是 Bregs 的关键介导因子, 在适当的刺激下, Bregs 表达 IL-10<sup>[19-20]</sup>。SUN 等<sup>[21]</sup>证实, VIP 对 Bregs 中 IL-10 mRNA 的稳定起着重要作用, 并能有效地抑制小鼠的实验性炎症反应。另外, VIP/PACAP 作为参与炎症和自身免疫疾病的调节剂, 能直接影响免疫细胞, 调节 Th1/Th2、Th17/Treg 细胞失衡<sup>[7, 22-23]</sup>。

ITP 模型小鼠肠系膜淋巴结淋巴细胞存在 P53 蛋白表达的异常上调。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, 强的松干预后能显著降低淋巴细胞凋亡率。由此证实强的松能够改善肠道免疫, 降低淋巴细胞凋亡; 同时, 模型组小鼠 P53 蛋白表达较正常组小鼠明显升高, 在强的松干预后, 淋巴细胞 P53 表达明显降低, 提示强的松能够降低 P53 蛋白表达; 同时, 通过分析实验中相关细胞因子水平的变化, 发现在模型组 ITP 小鼠脾脏中 IFN- $\gamma$ 、IL-17A 升高, IL-4、IL-10 降低。而在强的松干预后, 随 VIP/PACAP 表达上调, 这些细胞因子水平出现逆转, 证实强的松可以通过影响 VIP、PACAP 表达来调节肠道免疫功能, 维持免疫稳态, 从而发挥治疗 ITP 的作用。

综上所述, 肠系膜淋巴结淋巴细胞 P53 蛋白表达及细胞凋亡率异常上升, 模型组 ITP 小鼠脑、结肠、血清中 VIP 和 PACAP 水平下降, 且出现 IFN- $\gamma$  升高、IL-4 和 IL-10 降低、IL-17A 升高等细胞因子改变。在强的松干预后, VIP 水平在脑、结肠、血清中均升高, PACAP 水平在脑、结肠中均升高;

P53 蛋白表达、淋巴细胞凋亡率均降低,同时相关细胞因子水平出现逆转。因此,笔者推测基于 VIP/PACAP 调节肠道免疫功能可能是强的松治疗 ITP 的潜在机制。本研究再次证明 VIP/PACAP 是 ITP 发病的重要一环,本研究为今后针对 VIP/PACAP 介导肠道免疫功能的 ITP 靶向治疗研究提供前期实验支持。当然,这些机制还需要更多的研究来进一步解释这个过程。

#### 参 考 文 献 :

- [1] NEUNERT C, TERRELL D R, ARNOLD D M, et al. American Society of Hematology 2019 guidelines for immune thrombocytopenia[J]. *Blood Adv*, 2019, 3(23): 3829-3866.
- [2] COOPER N, GHANIMA W. Immune thrombocytopenia[J]. *N Engl J Med*, 2019, 381(10): 945-955.
- [3] ZHANG L, CHEN K, LI T T, et al. Prednisone provokes serum and vasoactive substances in a mice model of immune thrombocytopenia[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2016, 19(9): 1010-1015.
- [4] DELGADO M, GANEA D. Vasoactive intestinal peptide: a neuropeptide with pleiotropic immune functions[J]. *Amino Acids*, 2013, 45(1): 25-39.
- [5] HARMAR A J, FAHRENKRUG J, GOZES I, et al. Pharmacology and functions of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: IUPHAR review 1[J]. *Br J Pharmacol*, 2012, 166(1): 4-17.
- [6] FIGUEIREDO C A, DÜSEDAU H P, STEFFEN J, et al. Immunomodulatory effects of the neuropeptide pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in acute toxoplasmosis[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2019, 9: 154.
- [7] GANEA D, HOOPER K M, KONG W. The neuropeptide vasoactive intestinal peptide: direct effects on immune cells and involvement in inflammatory and autoimmune diseases[J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2015, 213(2): 442-452.
- [8] 郎海燕, 褚雨霆, 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.
- [9] 宋景春, 刘树元, 朱峰, 等. 中国成人重症患者血小板减少诊疗专家共识[J]. *解放军医学杂志*, 2020, 45(5): 457-474.
- [10] 祁烁, 李天天, 何昊, 等. 强的松对 ITP 模型小鼠血管活性物质调节作用研究[J]. *现代生物医学进展*, 2017, 17(34): 6601-6606.
- [11] 严香, 赵倩, 陈信义, 等. 健脾益气摄血方对原发免疫性血小板减少症模型小鼠凝血功能的影响[J]. *世界中医药*, 2022, 17(24): 3481-3484.
- [12] 何昊, 徐玥, 郑蕾, 等. 健脾益气摄血方对 ITP 模型小鼠血清 SIgA 和  $\beta$ -EP 影响研究[J]. *中医药信息*, 2015, 32(5): 47-49.
- [13] ZUFFEREY A, KAPUR R, SEMPLE J W. Pathogenesis and therapeutic mechanisms in immune thrombocytopenia (ITP)[J]. *J Clin Med*, 2017, 6(2): 16.
- [14] 程晓雯, 郑清华, 李小玲, 等. 血管活性肠肽与某些胃肠动力紊乱性疾病的内在关联研究进展[J]. *中国全科医学*, 2012, 15(3): 237-241.
- [15] 蒋明, 刘地川. 血管活性肠肽与心脏血管活动[J]. *重庆医学*, 2011, 40(10): 1026-1028.
- [16] 高瑞梅, 许琳, 孟欣颖, 等. 原发性胆汁反流性胃炎胃黏膜胃动素、血管活性肠肽的表达[J]. *世界华人消化杂志*, 2010, 18(7): 722-725.
- [17] IWASAKI M, AKIBA Y, KAUNITZ J D. Recent advances in vasoactive intestinal peptide physiology and pathophysiology: focus on the gastrointestinal system[J]. *F1000Res*, 2019, 8: F1000 Faculty Rev-1629.
- [18] KARPESIUK A, PALUS K. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in physiological and pathological processes within the gastrointestinal tract: a review[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(16): 8682.
- [19] RINCÓN-ARÉVALO H, SANCHEZ-PARRA C C, CASTAÑO D, et al. Regulatory B cells and mechanisms[J]. *Int Rev Immunol*, 2016, 35(2): 156-176.
- [20] ZENG H T, ZHAO M, YANG S B, et al. Vasoactive intestinal peptide alleviates food allergy via restoring regulatory B cell functions[J]. *Immunobiology*, 2019, 224(6): 804-810.
- [21] SUN X, GUO C Y, ZHAO F, et al. Vasoactive intestinal peptide stabilizes intestinal immune homeostasis through maintaining interleukin-10 expression in regulatory B cells[J]. *Theranostics*, 2019, 9(10): 2800-2811.
- [22] KOSTIC M, ZIVKOVIC N, CVETANOVIC A, et al. CD4<sup>+</sup> T cell phenotypes in the pathogenesis of immune thrombocytopenia[J]. *Cell Immunol*, 2020, 351: 104096.
- [23] LI Q Z, LIU Y, WANG X J, et al. Regulation of Th1/Th2 and Th17/Treg by pDC/mDC imbalance in primary immune thrombocytopenia[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2021, 246(15): 1688-1697.

(张西倩 编辑)

**本文引用格式:** 车明璐, 严香, 王冬雨, 等. 基于 VIP/PACAP 介导的肠道免疫功能失调探讨强的松治疗免疫性血小板减少症的效应机制[J]. *中国现代医学杂志*, 2023, 33(21): 33-40.

**Cite this article as:** CHE M L, YAN X, WANG D Y, et al. Investigation of the mechanisms of high-dose methylprednisolone treatment for immune thrombocytopenia based on VIP/PACAP-mediated intestinal immune dysfunction[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2023, 33(21): 33-40.