

滋阴凉血方联合泼尼松对免疫性血小板减少性紫癜小鼠免疫功能及 ST2/IL-33 通路的影响

赵冰洁, 车虹, 胡琰, 易文静, 肖利, 刘培佳, 刘松山*
成都中医药大学附属医院血液科, 四川成都 610072

摘要 目的: 探讨滋阴凉血方联合泼尼松对免疫性血小板减少性紫癜小鼠免疫功能及 ST2/IL-33 通路的影响。方法: 40 只 BALB/c 小鼠, 其中 32 只采用注射抗血小板血清构建免疫性血小板减少性紫癜小鼠模型, 造模成功后, 随机分为模型、滋阴凉血方 (0.2 ml/10 g)、泼尼松 (0.2 ml/10 g) 和滋阴凉血方 + 泼尼松 (0.2 ml/10 g) 共 4 组, 每组 8 只, 剩余 8 只小鼠设为空白组。分别按剂量灌胃给药, 模型组与空白组灌胃等量生理盐水, 1 次/d × 2 周。采集血样和脾脏组织, 使用全自动血液分析仪测定外周血小板数; HE 染色观察脾脏组织病理学变化; 酶联免疫吸附法检测血清转化生长因子 β 、白细胞介素 (IL)-17 及外周血血小板生成素水平; Western blot 检测脾脏组织 IL-33、sST2、ST2 表达; 流式细胞术检测外周血 Th17、Treg 细胞数。结果: 与空白组相比, 模型组小鼠血小板数、血小板生成素、转化生长因子 β 水平及 Treg 细胞均明显降低 ($P < 0.05$), IL-17 水平、Th17 细胞及 IL-33、sST2、ST2 蛋白表达明显增加 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 滋阴凉血方 + 泼尼松组血小板数、血小板生成素、转化生长因子 β 水平及 Treg 细胞均明显上升 ($P < 0.05$), IL-17 水平、Th17 细胞及 IL-33、sST2、ST2 蛋白表达明显降低 ($P < 0.01$)。结论: 滋阴凉血方 + 泼尼松可有效地调节 Th17/Treg 平衡, 进而有效改善免疫性血小板减少性紫癜, 其机制可能与调节 ST2/IL-33 信号通路有关。

关键词 免疫性血小板减少性紫癜; 滋阴凉血方; 泼尼松; 免疫功能; ST2/IL-33 通路

中图分类号 R285.5

文献标识码 A

doi: 10.19746/j.cnki.issn1009-2137.2024.01.032

Effects of Ziyin Liangxue Formula Combined with Prednisone on Immune Function and ST2/IL-33 Pathway in Mice with Immune Thrombocytopenia

ZHAO Bing-Jie, CHE Hong, HU Lian, YI Wen-Jing, XIAO Li, LIU Pei-Jia, LIU Song-Shan*

Department of Hematology, Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, Sichuan Province, China

*Corresponding Author: LIU Song-Shan, Senior Physician. E-mail: xianhecao009@163.com

Abstract Objective: To investigate the effects of Ziyin Liangxue formula combined with prednisone on immune function and the ST2/IL-33 pathway in mice with immune thrombocytopenia. **Methods:** In 40 BALB/c mice, 32 were constructed as immune thrombocytopenia mouse models by antiplatelet serum injection. After successful modeling, the mice were randomly divided into model group, Ziyin Liangxue formula group (0.2 ml/10 g), prednisone group (0.2 ml/10 g), and Ziyin Liangxue formula + prednisone group (0.2 ml/10 g), 8 mice in each group, and the other 8 mice were set as control group. The drugs were administered by gavage at the dose, and the model group and control group were given equal amounts of saline by gavage once a day for 2 weeks of continuous intervention. Blood samples and spleen tissues were collected, the peripheral platelet count was measured by automatic hematology analyzer, the pathological changes in spleen tissue was observed by HE staining, the levels of serum transforming growth factor (TGF)- β , interleukin (IL)-17, and peripheral blood thrombopoietin (TPO) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), the expression of IL-33, sST2, and ST2 in spleen tissue was detected by Western blot, and the cell counts of peripheral blood Th17 and Treg were detected by flow cytometry. **Results:** Compared with the control group, the number of platelets, the level of TPO, TGF- β , and Treg cells were significantly decreased ($P < 0.05$), while the level of IL-17, Th17 cells, and the expression of IL-33, sST2, and ST2 protein were significantly increased in the model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, the number of platelets, the level of TPO, TGF- β , and Treg cells were significantly increased ($P < 0.05$), while the level of IL-17, Th17 cells, and the expression of IL-33, sST2, and ST2 protein were significantly decreased

* 通信作者: 刘松山, 主任医师. E-mail: xianhecao009@163.com

2022-06-21 收稿; 2022-08-15 接受

in the *Ziyin Liangxue* formula + prednisone group ($P < 0.01$). **Conclusion:** *Ziyin Liangxue* formula + prednisone can effectively regulate Th17/Treg balance, thus effectively improve immune thrombocytopenia, and the mechanism may be related to the regulation of ST2/IL-33 signaling pathway.

Key words immune thrombocytopenia; *Ziyin Liangxue* formula; prednisone; immune function; ST2/IL-33 pathway

J Exp Hematol 2024, 32 (1) : 202–207

免疫性血小板减少性紫癜 (immune thrombocytopenia, ITP) 是一种自身免疫性疾病, 其特征是加速血小板破坏和不理想血小板生成, 约占出血性疾病总数的 1/3^[1]。尽管一线药物的初始有效率高达 82.1%, 但超过 2/3 的 ITP 患者可能会复发, 使用二线治疗手段, 如利妥昔单抗、血小板生成素 (TPO) 受体激动剂和脾切除术, 仍有一些患者的病情无法获得改善^[2-3]。因此, 需要探索新的 ITP 药物来提高治疗效果, 以实现长期缓解和重建免疫耐受。ITP 的病理生理学机制复杂, 目前仍不完全清楚, 研究认为, 功能失调的辅助性 T 细胞 (Th) 在 ITP 的发生中起主要作用^[4]。已有研究观察到 ITP 患者 Treg 的数量和 / 或功能减少^[5], 但 Th17 细胞在 ITP 中的作用仍不确定^[6]。中医学认为, ITP 属于“血症”、“紫斑”等范畴。本院的滋阴凉血方由水牛角、生地黄、丹皮、赤芍、女贞子、墨旱莲、知母、黄芩、仙鹤草组成, 其中水牛角水解物静脉给药具有快速止血作用, 与诱导血小板聚集有关, 生地黄、丹皮、赤芍具有抗血小板聚集作用, 黄芩具有泻火解毒、止血等作用^[7-8]。目前, 滋阴凉血方治疗 ITP 的机制及相关实验研究报道尚少, 本研究旨在探讨滋阴凉血方联合泼尼松对 ITP 的治疗作用及机制, 为其应用于 ITP 治疗提供理论依据。

材料与方 法

实验动物

SPF 级 BALB/c 小鼠 40 只, 雌雄各半, 8 周龄, 体质量 19–24 g; SPF 级雄性 Hartley 豚鼠, 6 周龄, 体质量 300–400 g, 均由四川大学华西医院提供, 动物质量合格证号为 SCXK (川) 2018–026, 小鼠于标准饲养条件下适应性饲养 1 周后用于实验, 豚鼠于标准饲养条件下适应性饲养 1 个月后用于实验。小鼠和豚鼠的饲养条件为自由饮食饮水, 室温和湿度分别维持在 22–24 °C 和 50%–60%, 12/12 h 昼夜交替光照, 实验动物饲养设施合格证号为 SYXK (川) 2021–248。

试剂与仪器

PBS 溶液购自武汉 Servicebio 公司; 完全弗氏佐剂、

不完全弗氏佐剂均购自上海 Sigma-Aldrich 公司; 泼尼松购自天津天药药业股份有限公司; 苏木素-伊红 (HE) 染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司; 转化生长因子 β (TGF- β)、白细胞介素 (IL)-17、TPO ELISA 试剂盒均购自上海茁彩生物科技有限公司; 抗体 IL-33、抗体 sST2、抗体 ST2 及二抗均购自英国 Abcam 公司。BA210Digital 数码三目摄像显微镜购自麦克奥迪实业集团; 酶标仪 (型号 Spectra Max Plus 384) 购自上海 Molecular Devices; JY200C 电泳仪购自北京君意东方电泳设备有限公司; FACSCalibur 流式细胞仪购自美国 BD 公司。

制备抗血小板血清 (APS)

BALB/c 小鼠麻醉取抗凝全血, 梯度 (100 \times g、250 \times g) 离心得血小板, 加 PBS 洗涤 3 次, 采用 0.9% NaCl 溶液调整血小板浓度至 2.5×10^6 /ml, 与等量完全弗氏佐剂或不完全弗氏佐剂混合至油包水状作抗原。于第 1 周注射含完全弗氏佐剂抗原于豚鼠足掌、背及皮下, 至少 4 点; 于第 2、3、4、5 周注射含不完全弗氏佐剂抗原于豚鼠足掌、背及皮下, 至少 4 点, 每次注射量为 1 ml。第 6 周从豚鼠心脏取不抗凝全血, 静置后 250 \times g 离心分离血清, 即为豚鼠抗小鼠血小板血清, 于 -20 °C 保存。使用前, 取 APS 置于 56 °C 水浴 30 min 灭活补体, 红细胞吸附, 制成 1:4 浓度 APS 备用。

ITP 小鼠模型制备及分组给药

40 只小鼠随机选取 8 只作为空白组 (Control), 其余小鼠作为造模组。造模步骤: 取 1:4 浓度 APS, 造模组按 100 μ l/只剂量注射 APS 造模, 空白组按 100 μ l/只腹腔注射生理盐水^[9]。7 d 后通过尾静脉取 20 μ l 血测量血小板数量, 评估造模情况, 当小鼠血小板下降至空白组一半以下时为造模成功。造模成功后随机将小鼠分为模型 (ITP)、滋阴凉血方 (ZYLXF)、泼尼松 (Pre) 和滋阴凉血方 + 泼尼松 (ZYLXF+Pre) 共 4 组。空白组和模型组按 0.2 ml/10 g 体质量灌胃生理盐水; 滋阴凉血方组给予 0.2 ml/10 g 体质量滋阴凉血方水煎液灌胃; 泼尼松组给予 0.2 ml/10 g 体质量 (泼尼松片 + 生理盐水混悬液, 含药量 0.72 g/L) 灌胃; 滋阴凉血方 + 泼尼松组给予 0.2 ml/10 g (滋阴凉血方水煎液: 泼尼松片 + 生理盐水混悬液 = 1:1

混合液)灌胃。每日1次,连续干预2周。其中,滋阴凉血方由本院药剂科制成,包括水牛角30g、生地黄30g、丹皮15g、赤芍15g、女贞子20g、墨旱莲15g、知母15g、黄芩15g、仙鹤草20g。取药材加入500ml双蒸水浸泡30min,加热沸腾后文火煎煮30min、纱布过滤、药渣再加入500ml双蒸水煮沸后煎煮30min,合并2次药液,纱布过滤,旋转蒸发浓缩至生药量为1.75g/ml。

样本采集

给药结束后,35mg/kg戊巴比妥钠麻醉小鼠,摘取小鼠眼球取全血。随后,立即摘取小鼠脾脏组织,将脾脏组织分为两份,部分采用4%多聚甲醛固定,观察组织病理,部分于-80℃保存,行Western blot检测。

外周血血象检测

取20μl全血与抗凝稀释液混匀,2h内采用全自动血液分析仪测定外周血小板数。

HE染色观察脾脏组织病理学变化

取经4%多聚甲醛固定24h的脾脏组织,置于乙醇中脱水,石蜡包埋,切成5μm厚的切片,HE染色,采用数码三目摄像显微镜观察组织病理变化情况。

ELISA检测血清TGF-β、IL-17、TPO水平

取50μl全血,ELISA法检测外周血TPO水平;取经250×g离心5min后分离的血清,按照ELISA试剂盒说明操作检测血清TGF-β、IL-17含量。

Western blot检测脾脏组织IL-33、sST2、ST2表达

取于-80℃保存的脾脏组织,将脾脏组织在冰冷的RIPA缓冲液中匀浆,使用BCA法对蛋白质浓度进行定量,等量的蛋白质经过10%的SDS-PAGE电泳,并转移到PVDF膜,在5%脱脂牛奶中封闭1h后,将膜与IL-33(1:1000)、sST2(1:1000)、ST2(1:1000)或β-actin(1:2000)一抗在4℃下孵育过夜,随后,将膜与辣根过氧化物酶标记的二抗(1:3000)室温孵育2h,用ECL检测系统检测结合抗体,以β-actin为内参,使用Quantity One软件对免疫反应条带进行量化,实验重复3次。

流式细胞检测外周血Th17、Treg细胞

取100μl全血,在细胞染色缓冲液中制备单细胞悬液,将单细胞悬液在4℃下250×g离心5min以去除红细胞,用1×红细胞裂解缓冲液重新悬浮。取100μl加入流式测定管中,用荧光标记抗体(5

μl FITC 标记的 CD4 McAb、5 μl APC 标记的 IL-17 McAb 或 5 μl FITC 标记的 CD4 McAb、2.5 μl PE 标记的 Foxp3 McAb) 对细胞表面标志物进行染色。流式细胞缓冲液洗涤,100×g离心5min,弃上清液,PBS洗2遍,调整细胞浓度至 1×10^6 /ml,上FACSCalibur流式细胞仪检测,CD4⁺IL-17⁺为Th17含量,CD4⁺Foxp3⁺细胞为Treg含量。

统计学分析

使用SPSS 22.0软件对数据进行统计学分析,GraphPad Prism 8.3软件作图。计量资料以平均值±标准差(mean±SD)表示,多组间数据比较采用单因素方差分析(ANOVA),组间两两数据比较采用LSD-t法, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

各组小鼠外周血小板数及TPO水平的变化

与空白组比较,模型组血小板数、TPO水平均明显降低($P < 0.05$);与模型组相比,滋阴凉血方+泼尼松组血小板数明显上升($P < 0.05$),泼尼松组、滋阴凉血方+泼尼松组TPO水平明显升高($P < 0.05$);与滋阴凉血方组、泼尼松组比较,滋阴凉血方+泼尼松组TPO水平明显升高($P < 0.01$),而血小板计数差异无明显统计学意义($P > 0.05$)(表1)。

Table 1. Peripheral blood platelet count and TPO level in each group of mice

Group	PLT ($\times 10^9$ /L)	TPO (pg/ml)
Control	1 524.00 ± 107.14	11.45 ± 0.95
ITP	771.67 ± 81.08 [*]	5.22 ± 0.91 ^{**}
ZYLXF	1 361.67 ± 98.87	6.72 ± 0.94
Pre	1 371.33 ± 183.86	7.22 ± 0.68 [#]
ZYLXF+Pre	1 436.67 ± 56.14 [#]	9.68 ± 1.01 ^{###▲▲▲}

TPO: thrombopoietin; PLT: platelet; ITP: immune thrombocytopenia; ZYLXF: Ziyin Liangxue formula; Pre: prednisone. ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, compared with control group; [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, compared with ITP group; ^{▲▲} $P < 0.01$, compared with ZYLXF group; ^{▲▲▲} $P < 0.01$, compared with Pre group.

各组小鼠脾脏组织病理变化

空白组:脾脏组织被膜完整,被膜及脾小梁纤维结缔组织未见增生,未见明显病理改变。模型组:骨髓与红髓分界较清晰,骨髓区域增大,动脉周围淋

巴鞘和脾小体淋巴细胞显著增多,边缘区消失。滋阴凉血方组:脾脏组织被膜完整;骨髓与红髓分界较清晰,骨髓动脉周围淋巴鞘和脾小结淋巴细胞增多,边缘区不明显,红髓内各类细胞成分未见明显增生或减少。泼尼松组:脾脏组织被膜完整,骨髓与红髓分界较清晰,骨髓动脉周围淋巴鞘和脾小结淋巴细胞增多,少量淋巴细胞坏死,见胞核固缩、崩解,胞质溶解,边缘区不明显,红髓内各类细胞成分未见明显增生或减少,脾血窦未见明显淤血和炎性细胞浸润。滋阴凉血方+泼尼松组:脾脏组织被膜完整;骨髓与红髓分界较清晰,骨髓动脉周围淋巴鞘和脾小结淋巴细胞略微增多,红髓内各类细胞成分未见明显增生或减少,脾血窦未见明显淤血和炎性细胞浸润(图1)。

各组小鼠血清 TGF-β、IL-17 水平比较

与空白组比较,模型组小鼠血清 TGF-β 水平明显降低,IL-17 水平明显升高($P<0.01$);与模型组相比,滋阴凉血方+泼尼松组 TGF-β 水平明显升高($P<0.05$),泼尼松组、滋阴凉血方+泼尼松组 IL-17 水平明显降低($P<0.05$);与滋阴凉血方组、泼尼松组相比,滋阴凉血方+泼尼松组 IL-17 水平明显降低($P<0.05$),而 TGF-β 水平差异无明显统计学意义($P>0.05$)(表2)。

各组小鼠 ST2/IL-33 信号通路相关因子水平

与空白组比较,模型组脾脏组织 IL-33、sST2、ST2 蛋白表达均明显升高($P<0.01$);与模型组相比,滋阴凉血方组、泼尼松组、滋阴凉血方+泼尼松组脾脏组织 IL-33、sST2、ST2 蛋白表达明显降低($P<0.01$);与滋阴凉血方组、泼尼松组相比,滋阴凉血方+泼尼松组脾脏组织 IL-33、sST2、ST2 蛋白表达明显降低($P<0.01$)(图2)。

Table 2. Comparison of serum TGF-β and IL-17 levels in each group of mice

Group	TGF-β (pg/ml)	IL-17 (pg/ml)
Control	116.54 ± 8.56	3.74 ± 0.43
ITP	77.45 ± 6.31**	6.17 ± 0.31**
ZYLXF	84.32 ± 8.06	5.71 ± 0.64
Pre	88.17 ± 10.01	4.77 ± 0.37 [#]
ZYLXF+Pre	97.36 ± 8.49 [#]	4.58 ± 0.49 ^{##} ▲ ^Δ

** $P<0.01$, compared with control group; [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$, compared with ITP group; ▲ $P<0.05$, compared with ZYLXF group; Δ $P<0.05$, compared with Pre group.

各组小鼠 Th17、Treg 细胞水平比较

与空白组比较,模型组 Th17 细胞水平明显增加,Treg 细胞水平明显降低($P<0.01$);3 个治疗组呈现出相同的变化趋势,即与模型组比较,Th17 细胞水平明显降低,Treg 细胞水平明显增加($P<0.01$);与滋阴凉血方组、泼尼松组相比,滋阴凉血方+泼尼松组 Th17 细胞水平明显降低,Treg 细胞水平明显增加($P<0.01$)(图3)。

讨 论

血小板是由巨核细胞释放的,一个巨核细胞可以产生数千个血小板^[10]。ITP 患者多表现为骨髓巨核细胞增生,并伴有巨核细胞分化成熟异常。脾是人体最大的免疫器官,能产生抗血小板自身抗体,破坏和储存血小板。骨髓巨核细胞的数量和脾形态是决定疾病疗效的重要指标^[11]。注射 APS 是一种常见的被动免疫模型方法,持续注射外源性 APS 可刺激免疫系统破坏外周血小板,从而减少血小板数量,

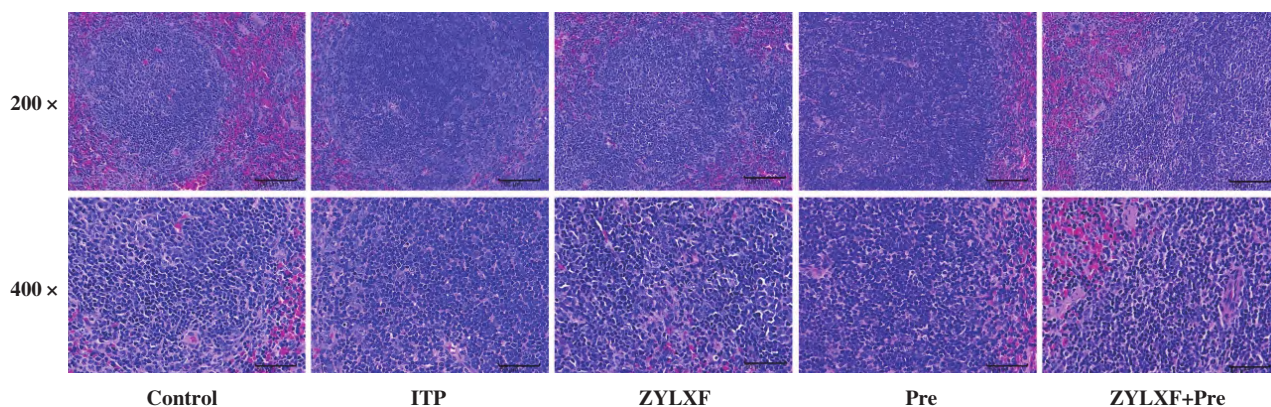


Figure 1. Histopathological changes in the spleen of mice in each group. HE, 200 ×, 400 ×.

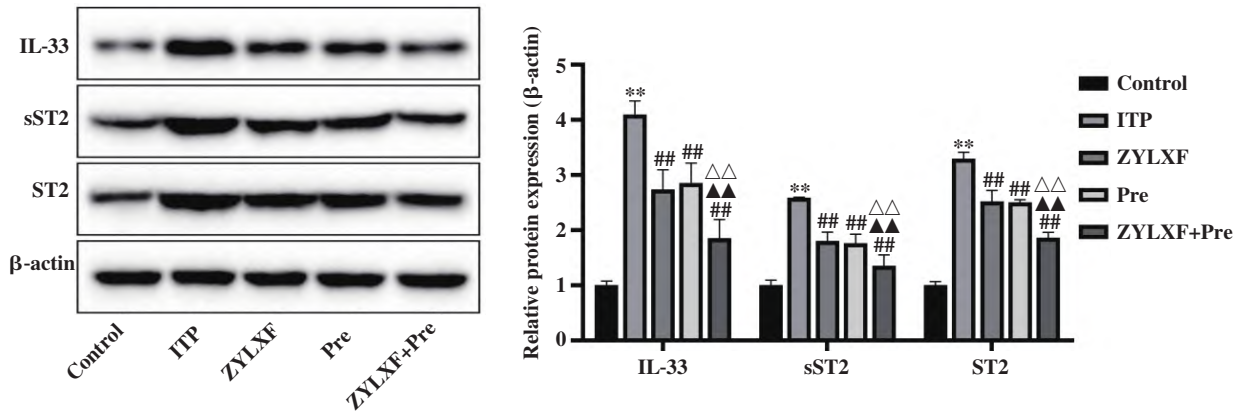


Figure 2. Levels of ST2/IL-33 signaling pathway-related factors in each group of mice. ** $P < 0.01$, compared with control group; ## $P < 0.01$, compared with ITP group; ▲▲ $P < 0.01$, compared with ZYLXF group; ▲▲ $P < 0.01$, compared with Pre group.

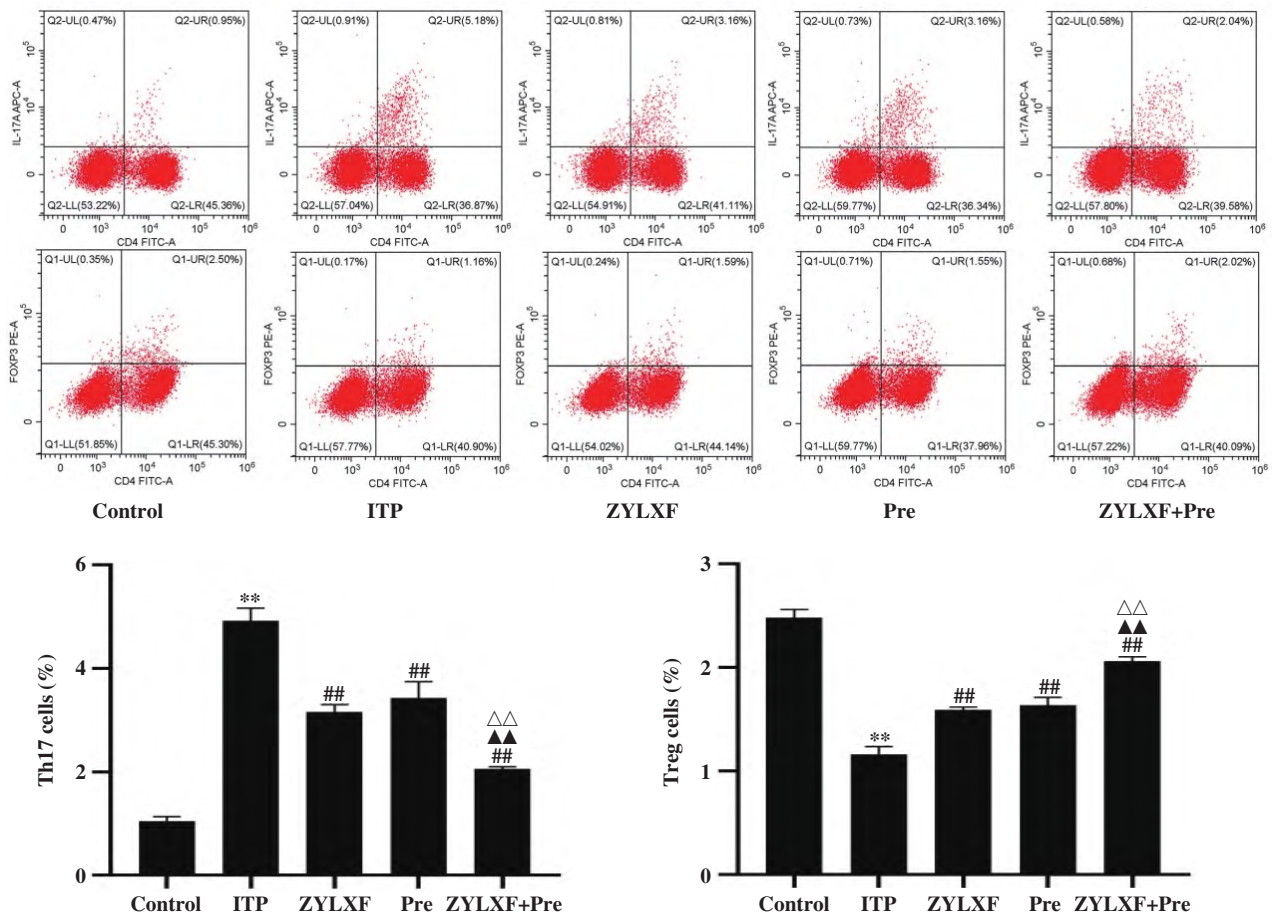


Figure 3. Comparison of Th17 and Treg cell levels in each group of mice. ** $P < 0.01$, compared with control group; ## $P < 0.01$, compared with ITP group; ▲▲ $P < 0.01$, compared with ZYLXF group; ▲▲ $P < 0.01$, compared with Pre group.

该模型模拟了人 ITP 自身免疫的发病机制和临床表现, 模型简单、重复性好、成本低, 被广泛用于评价 ITP 的疗效^[12]。本研究采用豚鼠抗小鼠血小板血清建立 ITP 小鼠模型, 结果显示, 与空白组相比, 模型小鼠外周血中血小板数显著降低, 且模型

组小鼠骨髓与红髓分界较清晰, 骨髓区域增大, 动脉周围淋巴鞘和脾小体淋巴细胞显著增多, 边缘区消失, 这与人 ITP 临床特征一致, 表明该模型制备成功^[13]。TPO 是促进巨核细胞和血小板生成的关键细胞因子, 体内的 TPO 受体是骨髓增殖性白血病病

毒癌基因 (MPL), MPL 的表达在调节巨核细胞产生中起着重要作用, MPL 的过度表达会导致巨核细胞过度增殖, 增加血小板的生成, 当 MPL 表达不足或缺失时, 巨核细胞的增殖会减弱, 从而导致血小板减少^[14]。本研究模型组较空白组外周血中 TPO 含量明显降低, 滋阴凉血方 + 泼尼松治疗的血小板数、TPO 水平显著增加, 表明滋阴凉血方 + 泼尼松改善了 ITP。此外, TPO 与 MPL 共同激活一系列信号通路, 如 PI3K/Akt 和 Ras/MAPK 等, 这些信号通路将细胞外信号传递到细胞核, 促进巨核细胞前体细胞的复制、成熟和分化, 可增加外周血中的血小板数量^[15]。

研究认为, Th17 与 Treg 细胞的平衡是维持人体免疫系统稳态的关键, Th17 细胞是以分泌 IL-17 为特征的 T 淋巴细胞亚群之一, Treg 细胞以 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 为主要标志, 具有调控自身免疫功能紊乱的作用^[16]。ITP 可诱导 Th17 细胞增加, Treg 细胞减少, 且有证据表明, ITP 患者外周血 Treg 的数量和质量都受到了损害^[17]。文献报道, ST2/IL-33 信号通路在 Th17/Treg 细胞平衡中发挥作用, 在 ITP 患者中, 增高的 sST2 可阻断 Treg 细胞介导的 ST2/IL-33 信号通路, 抑制 Treg 细胞增殖, 导致 TGF- β 分泌减少, 从而对 Th17 细胞抑制作用减少, 致使 IL-17 负性调节 ST2/IL-33 信号通路^[18-19]。临床研究发现, 与健康者比较, ITP 患者血清中 IL-33、sST2 水平表达升高, IL-33 与 IL-17/IL-10 的比值呈正相关, 提示 IL-33 可促使 Th17 细胞和 Treg 细胞失衡, 参与 ITP 的发病过程^[20]。本研究观察到模型组较空白组 TGF- β 及 Treg 细胞显著下降, IL-17、IL-33、sST2、ST2 表达水平及 Th17 细胞显著增加, 经滋阴凉血方 + 泼尼松治疗后, 小鼠 TGF- β 及 Treg 细胞显著增加, IL-33、sST2、ST2 表达及 IL-17、Th17 细胞显著降低, 提示滋阴凉血方 + 泼尼松促进 Th17/Treg 细胞平衡, 且可能通过 ST2/IL-33 信号通路发挥作用。

综上所述, 滋阴凉血方联合泼尼松可明显改善 ITP 小鼠血小板数, 升高 TGF- β 水平、Treg 细胞数, 恢复 Th17/Treg 细胞的失衡, 并可能是通过 ST2/IL-33 信号通路发挥治疗作用。

参 考 文 献

- Cooper N, Ghanima W. Immune thrombocytopenia. *N Engl J Med*, 2019, 381(10): 945-955.
- Ghanima W, Khelif A, Waage A, *et al*. Rituximab as second-line treatment for adult immune thrombocytopenia (the RITP trial): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*, 2015, 385(9978): 1653-1661.
- Hammond WA, Vishnu P, Rodriguez EM, *et al*. Sequence of splenectomy and rituximab for the treatment of steroid-refractory immune thrombocytopenia: does it matter?. *Mayo Clin Proc*, 2019, 94(11): 2199-2208.
- Zufferey A, Kapur R, Semple JW. Pathogenesis and therapeutic mechanisms in immune thrombocytopenia (ITP). *J Clin Med*, 2017, 6(2): 16.
- Kostic M, Zivkovic N, Cvetanovic A, *et al*. CD4⁺ T cell phenotypes in the pathogenesis of immune thrombocytopenia. *Cell Immunol*, 2020, 351: 104096.
- Li Q, Liu Y, Wang X, *et al*. Regulation of Th1/Th2 and Th17/Treg by pDC/mDC imbalance in primary immune thrombocytopenia. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2021, 246(15): 1688-1697.
- 屈凝露, 刘涛. 王灿晖教授运用“滋阴凉血活血法”治疗“瘀热证”临床经验. *中华中医药学刊*, 2019, 37(10): 2414-2417.
- 张敏, 张子彦. 滋阴凉血消斑汤治疗阴虚火旺型成人原发免疫性血小板减少症临床观察. *山西中医*, 2019, 35(7): 18-20, 23.
- 郝颖, 初杰, 范颖. 紫癜康颗粒对免疫性血小板减少性紫癜模型小鼠多个细胞因子的影响. *中华中医药学刊*, 2017, 35(7): 1705-1707.
- LeVine DN, Brooks MB. Immune thrombocytopenia (ITP): pathophysiology update and diagnostic dilemmas. *Vet Clin Pathol*, 2019, 48(Suppl 1): 17-28.
- Bonnard G, Babuty A, Collot R, *et al*. Platelet features allow to differentiate immune thrombocytopenia from inherited thrombocytopenia. *Ann Hematol*, 2021, 100(11): 2677-2682.
- Zhang L, Chen K, Li T, *et al*. Prednisolone provokes serum and vasoactive substances in a mice model of immune thrombocytopenia. *Iran J Basic Med Sci*, 2016, 19(9): 1010-1015.
- Bradbury CA, Pell J, Hill Q, *et al*. Mycophenolate mofetil for first-line treatment of immune thrombocytopenia. *N Engl J Med*, 2021, 385(10): 885-895.
- Michel M, Ruggeri M, Gonzalez-Lopez TJ, *et al*. Use of thrombopoietin receptor agonists for immune thrombocytopenia in pregnancy: results from a multicenter study. *Blood*, 2020, 136(26): 3056-3061.
- Chanprasert S, Geddis AE, Barroga C, *et al*. Thrombopoietin (TPO) induces c-myc expression through a PI3K- and MAPK-dependent pathway that is not mediated by Akt, PKCzeta or mTOR in TPO-dependent cell lines and primary megakaryocytes. *Cell Signal*, 2006, 18(8): 1212-1218.
- Han P, Hou Y, Zhao Y, *et al*. Low-dose decitabine modulates T-cell homeostasis and restores immune tolerance in immune thrombocytopenia. *Blood*, 2021, 138(8): 674-688.
- Yu L, Zhang L, Jiang Z, *et al*. Decreasing lncRNA PVT1 causes Treg/Th17 imbalance via NOTCH signaling in immune thrombocytopenia. *Hematology*, 2021, 26(1): 734-740.
- 王秀娟, 孙明玲, 刘颖, 等. sST2/IL-33 与 Th17/Treg 相关细胞因子在原发免疫性血小板减少症中的作用研究. *天津医药*, 2019, 47(7): 732-734.
- Ryba-Stanisławowska M, Stanisławowski M, Myśliwska J. Effector and regulatory T cell subsets in diabetes-associated inflammation. Is there a connection with ST2/IL-33 axis? Perspective. *Autoimmunity*, 2014, 47(6): 361-371.
- Yang XP, Ma R, Yang XH, *et al*. Effect of Yiqi Tongyang Decoction (YTD) on blood T cell subsets in patients with chronic immune thrombocytopenia. *Chin J Integr Med*, 2017, 23(9): 709-713.