

两种主动免疫特发性血小板减少性紫癜动物模型免疫功能的动态变化**☆

胡海燕, 李章球, 余力, 姚瑶, 王国征, 孙明, 黄睿, 张梅霞, 陆志刚

Dynamic changes in immune function of active immunization-induced idiopathic thrombocytopenic purpura animal models

Hu Hai-yan, Li Zhang-qiu, Yu Li, Yao Yao, Wang Guo-zheng, Sun Ming, Huang Rui, Zhang Mei-xia, Lu Zhi-gang

Department of
Hematology, Zhujiang
Hospital, Southern
Medical University,
Guangzhou
510282, Guangdong
Province, China

Hu Hai-yan☆,
Doctor, Attending
physician,
Department of
Hematology, Zhujiang
Hospital, Southern
Medical University,
Guangzhou
510282, Guangdong
Province, China

Li Zhang-qiu★,
Master, Physician,
Department of
Hematology, Zhujiang
Hospital, Southern
Medical University,
Guangzhou
510282, Guangdong
Province, China
lqz3208@gmail.com

Hu Hai-yan and Li
Zhang-qiu
contributed equally to
this paper.

Correspondence to:
Zhang Mei-xia,
Doctor, Professor,
Department of
Hematology, Zhujiang
Hospital, Southern
Medical University,
Guangzhou
510282, Guangdong
Province, China
meixiaz88@yahoo.
com.cn

Correspondence to:
Lu Zhi-gang,
Professor,
Department of
Hematology, Zhujiang
Hospital, Southern
Medical University,
Guangzhou
510282, Guangdong
Province, China
luzhigang123@
hotmail.com

Supported by: the
Natural Science
Foundation of
Guangdong Province,
No.07005195; the
Medical Science and
Technology Research
Fund of Guangdong
Province, No.
WSTJJ2006116440
105196211238024*

Received: 2010-02-06
Accepted: 2010-05-05

Abstract

BACKGROUND: Currently, most of the idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) models are severe and characterized by notable decrease of platelet and short persistence time, which can not fit to clinical platelet fluctuation features.

OBJECTIVE: To construct mild ITP models induced by injecting anti platelet serum (APS) from guinea pig and rabbit, moreover, to explore the adaptivity of two methods

METHODS: Mice were divided into guinea pig anti-mouse APS group and rabbit anti-mouse APS group in which mice were injected with APS of 1:32 dilution to establish mild ITP models. At 8 different sampling times after infusion, blood, bone marrow and lymphatic organ were collected to observe the changes of cells, cytokines and tissue structures.

RESULTS AND CONCLUSION: Counts of platelet in both groups were decreased to 40%~60% of the normal number and maintained for 7 days. Counts of megakaryocyte were increased significantly at 8 days and gradually returned to normal at 16 days. Rates of C3bRR, ICR in both APS groups were decreased significantly compared with saline group ($P < 0.05$). The levels of interleukin 2 and interferon γ in both APS groups were elevated compared with saline group ($P < 0.05$). For pathology change, there was more micromegakaryocyte in spleen and thymus gland analysis significantly. There was imbalance of T lymphocytes subpopulations, disorders of immuno-functions of red blood cell and cytokine changes in two successful mild ITP models. The constructed model is fit for the clinical features of moderate ITP.

Hu HY, Li ZQ, Yu L, Yao Y, Wang GZ, Sun M, Huang R, Zhang MX, Lu ZG. Dynamic changes in immune function of active immunization-induced idiopathic thrombocytopenic purpura animal models. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(24): 4462-4468. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景:目前的特发性血小板减少性紫癜模型多为重度,血小板下降显著但持续时间短,与临床患者血小板波动变化的特性拟合不佳。

目的:用兔抗小鼠血小板血清及豚鼠抗小鼠血小板血清构建中度特发性血小板减少性紫癜模型,并探讨其适用性。

方法:应用不同稀释倍数的抗血小板血清腹腔注射免疫小鼠,筛选出1:32稀释倍数的抗血清制备中度特发性血小板减少性紫癜模型。免疫结束后分8个时间点取血、骨髓及淋巴器官,观察各种细胞、细胞因子及组织结构的变化。

结果与结论:两种抗血清免疫后,小鼠血小板数量均下降到正常数目的40%~60%,并能维持7d;骨髓巨核细胞数于免疫后8d明显增加,16d基本恢复正常;红细胞C3b受体花环与红细胞免疫复合物花环率明显下降($P < 0.05$);白细胞介素2和干扰素 γ 水平及CD4⁺/CD8⁺细胞比例明显升高($P < 0.05$);脾小巨核细胞增加,胸腺萎缩。说明豚鼠和兔抗小鼠血小板血清制备的慢性特发性血小板减少性紫癜模型存在红细胞免疫功能紊乱, T淋巴细胞亚群比例失调以及细胞因子分泌变化,是一种与临床拟合良好的中度特发性血小板减少性紫癜模型。

关键词:血小板减少性紫癜;动物模型;抗血小板血清;血小板;免疫功能

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.24.021

胡海燕,李章球,余力,姚瑶,王国征,孙明,黄睿,张梅霞,陆志刚.两种主动免疫特发性血小板减少性紫癜动物模型免疫功能的动态变化[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(24):4462-4468.

[http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

特发性血小板减少性紫癜(idiopathic thrombocytopenic purpura, ITP)为临床常见的血小板减少所致的出血性疾病^[1-2]。数十年来,已有众多的动物模型制备方法应用于ITP的研究,包括抗血小板血清(anti platelet serum, APS)造模法,多/单克隆抗体造模法,转基因动物造模法等,其中既符合ITP发病机制,又具有简单易行特点的是目前国内大多数ITP研究都使用的APS造模法^[3-6],但已报道的APS造模法往往

出现血小板极度低下,与临床患者血小板波动变化的特性拟合不佳^[7-9]。基于此,实验探讨建立中度血小板减少的ITP模型方法,以弥补此缺陷,并进一步研究模型鼠淋巴器官组织结构和淋巴细胞免疫功能变化,以及红细胞免疫功能变化,比较应用不同种属来源的APS制备模型的差异,以筛选建立一种理想的动物模型,以便于加深对ITP发病机制和治疗药物的研究。

1 材料和方法

设计:随机对照动物实验。

时间和地点: 实验于2006-03/2007-09在南方医科大学附属珠江医院血液科实验室完成。

材料:

实验动物: 健康8周龄BALB/c小鼠65只, 体重18~22 g, 雌雄各半; 5月龄豚鼠6只, 体重480~600 g, 雌雄各半; 6月龄新西兰兔6只, 体重约2.4 kg, 雌雄各半; 均购自南方医科大学动物实验中心(许可证号: SCXK(粤)2006-0015), 实验中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》的相关要求^[10]。

试剂与仪器:

试剂及仪器	来源
红细胞免疫检测试剂, 酵母菌冰冻试剂	上海第二军医大学长海医院
白细胞介素 2(interleukin 2, IL-2) 和干扰素 γ (interferon γ , IFN- γ) ELISA 试剂盒	晶美生物公司
辣根酶标记兔抗豚鼠和羊抗兔 IgG	北京博奥森生物技术有限公司
福氏佐剂	Sigma 公司

方法:

抗血清的制备:

小鼠血小板抗原的制备: 用摘眼球取血法收集 BALB/c 小鼠外周血, 以枸橼酸钠(6:1, pH 4.5)抗凝, 分离血小板并洗涤纯化, 用生理盐水稀释。取以上血小板分别与等量完全福氏佐剂和不完全福氏佐剂混合成油包状。

豚鼠抗小鼠血小板抗血清 (guinea pig anti-mouse APS, GP-APS) 的制备: 取含完全福氏佐剂抗原于 0 周注射于豚鼠足掌、背及皮下至少 4 点; 取含不完全福氏佐剂抗原分别于 1, 2, 4 周注射于豚鼠足掌、背及腹部皮下, 每次至少 4 点, 第 5 周从豚鼠心脏取不抗凝全血, 560 g 离心 10 min 后取上清, 即为 GP-APS, 贮存于-20 °C 冰箱待用。

兔抗小鼠血小板抗血清 (rabbit anti-mouse APS, R-APS) 的制备: 取含完全福氏佐剂抗原于 0 周注射于兔背部皮下至少 9 点, 取含不完全福氏佐剂抗原分别于 2, 3, 4 周注射于兔背部皮下、大腿肌肉、脚掌等至少 9 点, 第 5 周从兔颈动脉取不抗凝全血, 560 g 离心 10 min 后取上清, 即获得 R-APS, 贮存于-20 °C 冰箱待用。

ELISA 法检测抗血清的浓度: ELISA 法检测用

辣根酶标记兔抗豚鼠 IgG 和辣根酶标记羊抗兔 IgG。将两种 APS 和豚鼠、兔正常血清从-20 °C 中取出, 置 56 °C 水浴 30 min, 各用等量 BALB/c 小鼠红细胞吸附至少 2 次, 最后用生理盐水稀释成不同浓度 APS 待用。

实验血清稀释倍数的筛选: 将 30 只小鼠随机分为 10 组, 每组 3 只, 分别取 GP/R-APS 及正常小鼠血清, 与 PBS 混合按 1:1, 1:4, 1:8, 1:16, 1:24, 1:32, 1:40, 1:48, 1:64 稀释, 腹腔注射小鼠 100 μ L/只, 观察血小板变化幅度、血小板下降持续时间, 选取最合适的血清稀释倍数。

慢性 ITP 模型的建立: 将 35 只小鼠随机分成 5 组: GP-APS 组, R-APS 组, 豚鼠正常血清组, 兔正常血清组, 对照组, 每组 7 只, 雌雄各半。GP/R-APS 组分别于 1, 2, 4, 6, 7 d 腹腔注射 1:32 的 GP/R-APS 100 μ L, 造成小鼠慢性持续性血小板减少^[1]; 豚鼠/兔正常血清组在同样时间点注射 1:32 豚鼠/兔正常血清; 对照组注射等量生理盐水。

小鼠血细胞计数: 于末次注射血清后 6, 24 h, 2, 4, 8, 12, 16 d, 从小鼠眼眶后静脉丛毛细血管取血 60 μ L, 分别加入盛有 980 μ L 红细胞稀释液, 380 μ L 白细胞稀释液和 380 μ L 血小板稀释液的试管内, 20 μ L/管, 充分混匀, 显微镜下分别计数红细胞、白细胞和血小板。

骨髓涂片制备及脾、胸腺病理形态学检查: 于注射血清后 6, 24 h, 2, 4, 8, 12, 16 d, 处死小鼠, 迅速剥离胸骨, 取骨髓, 涂片 3 张, 瑞氏染色后在光学显微镜下分别计数每张骨髓涂片的巨核细胞数。取脾脏、胸腺固定于体积分数为 10% 的甲醛中, 石蜡包埋后做病理形态学检查, 观察脾脏及胸腺组织细胞结构的改变。

红细胞免疫实验:

红细胞 C3b 受体花环试验: 取待测新鲜枸橼酸钠抗凝血 0.5 mL 离心, 取出上清液(血浆)待用, 红细胞配成 $1.25 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$ 应用液。将 50 μ L 血浆加入 50 μ L 酵母菌悬液, 再加 50 μ L 红细胞悬液充分混匀, 37 °C 水浴 30 min 后取出, 加 25 μ L 体积分数 0.25% 的戊二醛轻轻混匀, 涂片, 吹干, 染色, 计数, 高倍镜下数 200 个红细胞所形成的酵母菌花环, 以结合 2 个以上为花环, 计算红细胞花环率, 作为红细胞 C3b 受体活性指标。

红细胞免疫复合物花环试验: 取 50 μ L 红细胞悬液加 50 μ L 酵母多糖混匀, 37 °C 水浴,

南方医科大学附属珠江医院血液科, 广东省广州市 510282

胡海燕^{*}, 女, 1976 年生, 河南省南阳市人, 汉族, 2005 年毕业于, 博士, 主治医师, 主要从事肿瘤免疫治疗及基因治疗方面的研究。

并列第一作者: 李章球^{*}, 男, 1979 年生, 广东省云浮市人, 汉族, 2009 年毕业于, 硕士, 医师, 主要从事树突状细胞疫苗治疗特异性血小板减少性紫癜方面的研究。

通讯作者: 张梅霞, 博士, 教授, 南方医科大学附属珠江医院血液科, 广东省广州市 520282
meixiaz88@yahoo.com.cn

通讯作者: 陆志刚, 教授, 南方医科大学附属珠江医院输血科, 广东省广州市 510282
luzhigang123@hotmail.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2010)24-04462-07

收稿日期: 2010-02-06
修回日期: 2010-05-05
(20100206012/WLM · Z)

其他步骤同上述试验。酵母菌外膜酵母多糖可黏附红细胞膜上的免疫复合物形成花环, 用于检测细胞免疫功能(实验重复3次)。

ELISA 法检测 IL-2 和 IFN- γ : 收集各时间点小鼠血清, 按 IL-2 和 IFN- γ ELISA 试剂盒说明书操作, 测定小鼠血清中 IL-2 和 IFN- γ 的水平(实验重复3次)。

淋巴细胞亚群测定: 取各时间点小鼠血 400~500 μ L, 裂解红细胞后, PBS 洗涤细胞, 分别加入 PE 标记兔抗鼠 CD3 抗体, FITC 标记羊抗鼠 CD4 抗体和 Cy3 标记兔抗鼠 CD8 抗体, 流式细胞仪检测 CD3⁺, CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞的比例(实验重复3次)。

主要观察指标: 小鼠外周血细胞计数, 脾脏、胸腺组织学改变, 血清细胞因子水平, 淋巴细胞比率及红细胞免疫功能。

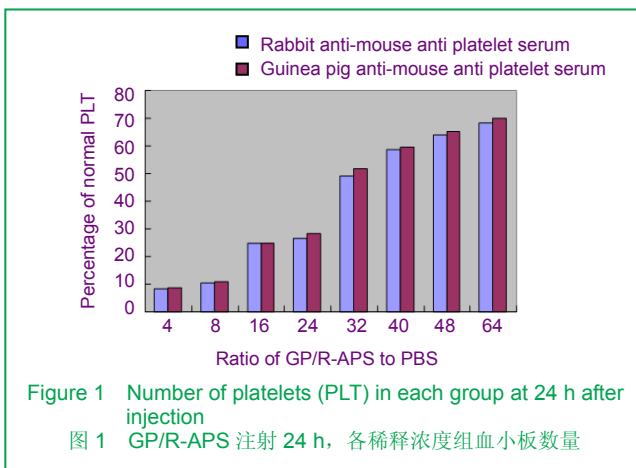
设计、实施、评估者: 实验设计为通讯作者张梅霞, 实施者为第一作者和共同第一作者, 评估者为共同通讯作者陆志刚, 病理学检测由病理科余力教授协助完成。

统计学分析: 用 SPSS13.0 软件进行统计分析, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组数据方差齐时多重比较用单因素方差分析的 LSD 法; 方差不齐时用 Tamhane's T2 法, $P < 0.05$ 为差异有显著性差意义。

2 结果

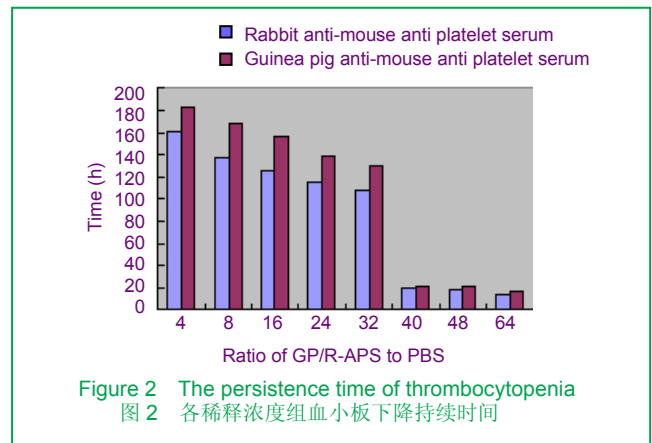
2.1 实验动物数量分析 实验中用于模型制备的35只 BALB/c 小鼠全部进入结果分析。

2.2 GP-APS 及 R-APS 效价评估 1:4, 1:8, 1:16, 1:24, 1:32, 1:40, 1:48, 1:64 浓度稀释的 GP/R-APS 血清均可使小鼠血小板计数下降。1:32 稀释抗血清可产生抑制效应, 见图1。



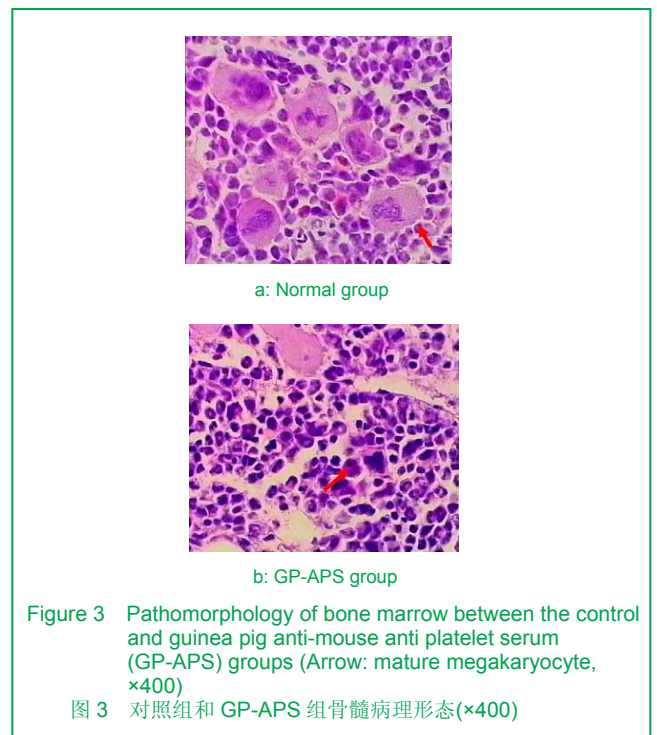
其中, 1:32 稀释的 R-APS 组于 108 h 血象恢复正常, GP-APS 组在 130 h 血象恢复正常。1:40, 1:48, 1:64 稀释的 APS 组降血小板计数作用持续时间均不到 24 h 就恢复正常, 见图2。因此, 1:32 稀释的抗血清符

合实验需要。两种模型维持时间无差异, 6 次注射 APS 后可使两种 ITP 动物模型血小板减少维持 7 d。



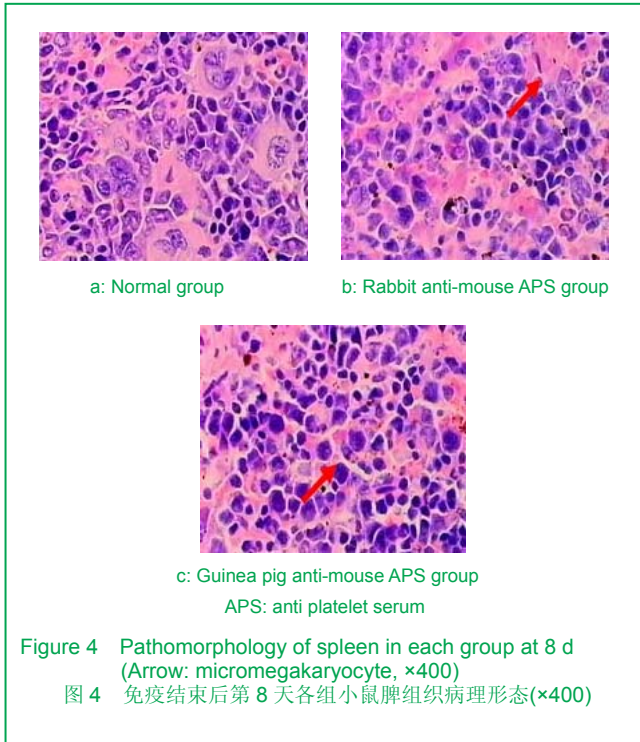
2.3 骨髓细胞学及骨髓、脾脏和胸腺组织病理学变化

骨髓涂片细胞学检查结果: GP/R-APS 免疫结束后 24 h, 小巨核细胞开始增多; 免疫结束后第 8 天, 骨髓成熟巨核细胞和小巨核细胞数量均明显增多, 以小巨核细胞增多为主; 第 16 天骨髓恢复正常。兔、豚鼠正常血清组未见明显异常, 见图3。



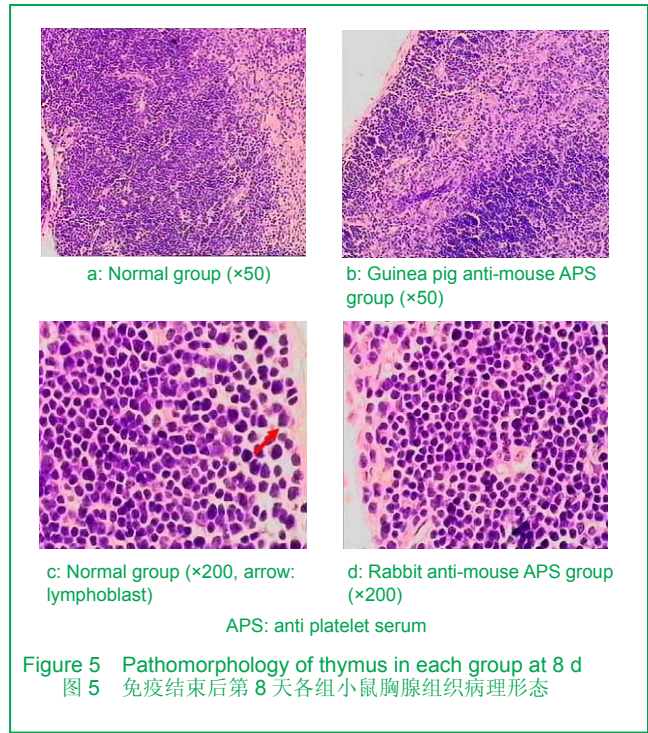
脾脏病理变化: 正常小鼠脾脏可见散在的成熟巨核细胞, 细胞胞体呈不规则形, 直径 40~70 μ m, 细胞核分叶状, 胞浆丰盈, 胞质内有许多血小板颗粒, 细胞膜边缘有成簇排列的血小板。脾窦内无红细胞淤滞。R/GP-APS 组免疫结束后 6 h, 脾组织可见脾窦扩张、淤血明显; 第 8 天可见大量小巨核细胞, 聚集成堆, 成熟的巨核细胞极少, 与成熟粒细胞大小相仿, 形态类似淋巴细胞, 胞核为类圆形, 胞浆偏少, 未见血小板生成;

第 16 天脾组织内巨核细胞数量明显减少, 与正常小鼠脾脏组织形态类似, 兔、豚鼠正常血清组与正常小鼠脾脏组织形态无明显差异, 见图 4。



胸腺病理变化: 正常小鼠胸腺组织内膜内侧可见大量向髓质迁移的淋巴母细胞, R/GP-APS免疫结束后第 8 天, 胸腺萎缩, 皮髓质界限不清; 第 12 天胸腺已整个萎缩, 皮髓质边界模糊, 淋巴母细胞明显减少, 为胞体偏小的成熟淋巴细胞所取代, 见图 5。兔、豚鼠正常血清

组与正常小鼠间无差异。



2.4 外周血细胞计数结果 在末次注射 GP/R-APS 后观察血小板数目发现, 血小板计数在 7 d 内维持原水平的 40%~60%, 之后缓慢回升, 于第 16 天恢复正常。16 d 内, R/GP-APS 组血小板数明显低于对照组 ($P < 0.05$); 而兔和豚鼠正常血清组血小板计数与对照组差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。R/GP-APS 组红细胞计数、白细胞计数与正常小鼠及兔、豚鼠正常血清组比较差异无显著意义 ($P > 0.05$), 见表 1。

表 1 各组小鼠血常规检测结果
Table 1 Blood routine examination of all groups

($\bar{x} \pm s, \times 10^{12}/L$)

Group	Time after serum injection						
	6 h	24 h	2 d	4 d	8 d	12 d	16 d
Rabbit anti-mouse APS							
WBC	6.2±0.4	6.5±0.4	5.9±0.3	6.5±0.4	6.4±0.5	7.7±0.4	7.1±0.4
RBC	16.1±3.7	14.1±1.3	16.5±1.2	15.8±2.0	13.3±1.2	18.2±1.4	16.2±1.7
PLT	305.4±10.4 ^a	400.2±31.0 ^a	370.8±29.2 ^a	840.4±60.3 ^a	770.6±54.4 ^a	1 045.3±87.2 ^a	1 055.7±71.4 ^a
Rabbit-normal PS							
WBC	6.9±0.4	6.1±0.3	6.3±0.4	7.1±0.4	5.5±0.3	8.4±0.6	7.7±0.4
RBC	16.6±1.2	14.8±1.1	14.2±1.3	16.1±1.7	15.7±1.2	15.7±1.1	17.8±1.8
PLT	1 305.2±74.8	1 295.4±82.3	1 375.7±69.4	1 550.3±73.2	1 290.2±81.8	1 250.6±83.7	1 410.4±79.3
Guinea pig anti-mouse APS							
WBC	5.8±0.4	6.6±0.5	5.9±0.4	6.2±0.2	6.7±0.3	6.2±0.5	4.9±0.2
RBC	15.7±0.9	15.4±1.3	15.7±1.3	16.2±1.4	14.2±1.3	17.8±1.9	15.0±1.3
PLT	620.3±50.4 ^a	505.6±39.3 ^a	530.4±40.3 ^a	555.4±36.8 ^a	730.6±60.2 ^a	1 016.7±82.7 ^a	1 025.7±81.4 ^a
Guinea pig-normal PS							
WBC	7.1±0.3	6.5±0.3	6.0±0.3	5.7±0.3	6.1±0.4	9.7±0.8	6.9±0.6
RBC	16.2±1.6	15.3±1.4	14.7±1.3	15.7±1.7	14.5±1.4	16.9±1.7	15.4±1.7
PLT	1 265.3±79.2	1 325.2±62.2	1 360.2±57.3	1 280.3±66.3	1 370.4±71.3	1 405.3±68.3	1 495.6±70.3
Control							
WBC	5.5±0.4	6.2±0.4	6.3±0.5	6.8±0.4	6.3±0.3	6.4±0.5	6.6±0.4
RBC	16.1±1.4	15.2±1.3	16.3±1.7	17.1±1.4	16.5±1.3	16.7±1.5	15.9±1.2
PLT	1 320.3±69.5	1 270.3±71.3	1 325.6±64.7	1 224.6±56.7	1 265.4±62.8	1 495.3±69.4	1 320.8±58.4

PS: platelet serum; APS: anti platelet serum; PLT: platelet; WBC: white blood cell; RBC: red blood cell; PLT: platelet; ^a $P < 0.05$, vs. control group

2.5 淋巴细胞亚群CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺细胞变化 R-APS组CD4⁺细胞比例较对照组高($P < 0.05$)。GP-APS组CD8⁺细胞比例较对照组低($P < 0.05$)。免疫结束后6 h, R-APS组CD4⁺明显升高达原水平的175%, 24 h下降至原来水平的110%, 一直至第16天都维持于该水平; GP-APS组免疫结束后6 h, CD4⁺升高达原水平的138%, 24 h后下降至原来水平的98%, 后一直下降, 至第16天下降至原来水平的76%, 可见两者引起CD4⁺的变化有很大的不同, CD8⁺细胞的变化在各组中和CD4⁺相反, 见表2。

2.6 红细胞免疫功能 GP/R-APS组红细胞C3b受体

花环率和红细胞免疫复合物花环率于免疫结束后6 h开始下降, 于24 h降至最低, 为正常小鼠的60%左右, 之后一直维持在正常小鼠的60%~70%。停止注射24 h后开始升高, 于第16天恢复至正常小鼠的90%左右。GP/R-APS组红细胞C3b受体花环率和红细胞免疫复合物花环率与正常组比较均有显著性意义($P < 0.05$)。而两APS组之间的C3b受体花环率和红细胞免疫复合物花环比较差异无显著性意义($P > 0.05$)。兔、豚鼠正常血清组的红细胞C3b受体花环率和红细胞免疫复合物花环率与对照组比较差异无显著性意义($P > 0.05$), 见表3。

表2 各组小鼠免疫后淋巴细胞亚群的变化
Table 2 Clustering ratio of lymphocyte in each group

($\bar{x} \pm s$)

Group	Time after serum injection						
	6 h	24 h	2 d	4 d	8 d	12 d	16 d
Rabbit anti-mouse APS							
CD3 (%)	84.6±3.3	68.2±4.2	59.6±2.2	65.9±3.3	65.1±2.8	67.2±3.2	60.5±2.5
CD4 (%)	74.3±2.6 ^a	56.4±2.1 ^a	47.8±1.9 ^a	53.8±3.0 ^a	53.5±3.8 ^a	53.5±3.8 ^a	51.1±3.5 ^a
CD8 (%)	10.9±0.9	11.9±0.8	12.6±1.1	12.4±0.8	11.3±0.9	14.1±1.5	9.5±0.6
CD4/CD8	6.82 ^a	4.74 ^a	3.79 ^a	4.34 ^a	4.73 ^a	3.79 ^a	5.38 ^a
Rabbit-normal PS							
CD3 (%)	69.2±2.2	61.7±3.2	70.7±2.8	63.9±3.0	66.2±4.0	62.9±2.9	62.1±3.1
CD4 (%)	57.4±2.4	51.1±2.0	55.5±2.6	51.4±2.7	54.8±2.6	54.6±2.5	51.6±2.5
CD8 (%)	12.5±0.9	10.5±1.0	15.5±1.8	12.7±1.0	11.4±0.9	8.6±0.7	10.3±0.8
CD4/CD8	4.59	4.87	3.58	4.05	4.81	6.35	5.01
Guinea pig anti-mouse APS							
CD3 (%)	68.9±3.2	62.2±3.0	62.8±3.2	60.7±2.7	51.6±2.6	61.3±2.0	39.7±1.4
CD4 (%)	58.7±3.0	52.8±2.8	49.7±2.5	47.2±1.9	42.1±1.7	52.1±2.8	32.2±3.1
CD8 (%)	11.1±0.8 ^a	9.4±0.7 ^a	13.9±1.2 ^a	13.1±1.0 ^a	9.2±0.8 ^a	9.6±0.8 ^a	8.6±0.9 ^a
CD4/CD8	5.29 ^a	5.62 ^a	3.58 ^a	3.60 ^a	4.58 ^a	5.43 ^a	3.72 ^a
Guinea pig-normal PS							
CD3 (%)	59.7±2.4	63.1±3.2	65.4±3.0	57.8±2.8	50.8±2.1	51.4±2.3	48.3±1.9
CD4 (%)	47.5±2.4	51.3±3.1	52.6±2.8	46.7±2.8	41.5±2.2	42.2±2.7	38.6±2.6
CD8 (%)	12.8±1.0	11.9±1.0	13.3±1.2	12.2±1.0	9.7±1.0	9.5±0.7	10.3±0.8
CD4/CD8	3.71	4.31	3.95	3.83	4.28	4.44	3.75
Control							
CD3 (%)	54.7±2.0	66.3±2.7	60.1±3.2	67.4±3.4	63.9±2.6	58.2±3.8	50.6±3.1
CD4 (%)	42.4±3.1	51.8±2.6	47.3±2.8	53.4±2.7	51.3±2.4	46.6±2.5	42.1±2.9
CD8 (%)	12.9±1.0	14.9±1.2	13.8±1.1	14.6±1.3	12.9±1.1	12.2±1.0	8.6±0.9
CD4/CD8	3.29	3.48	3.43	3.66	3.98	3.82	4.89

APS: anti platelet serum; PS: platelet serum; ^a $P < 0.05$, vs. control group

表3 各组小鼠免疫后红细胞免疫功能的改变
Table 3 Change of immune function of red blood cells in each group

($\bar{x} \pm s$)

Group	Time after serum injection						
	6 h	24 h	2 d	4 d	8 d	12 d	16 d
Rabbit anti-mouse APS							
C3bRR	10.2±2.6 ^a	5.1±1.0 ^a	8.1±0.9 ^a	7.3±0.6 ^a	9.2±0.6 ^a	8.2±0.7 ^a	13.4±0.9 ^a
ICR	13.3±2.7 ^a	10.3±0.8 ^a	14.1±1.3 ^a	13.4±1.3 ^a	16.8±1.4 ^a	18.2±1.5 ^a	19.4±2.0 ^a
Rabbit-normal PS							
C3bRR	12.2±0.9	6.3±0.5	12.6±1.0	11.3±0.9	8.3±0.7	11.7±0.8	16.5±1.1
ICR	16.6±1.5	14.3±1.4	18.2±1.7	18.3±1.6	17.1±1.8	19.6±1.8	20.1±1.9
Guinea pig anti-mouse APS							
C3bRR	9.4±0.8 ^a	5.2±0.4 ^a	7.4±0.6 ^a	6.3±0.5 ^a	10.2±0.8 ^a	9.1±0.9 ^a	14.2±1.2 ^a
ICR	10.2±0.8 ^a	12.6±0.9 ^a	16.8±1.4 ^a	14.7±1.3 ^a	19.6±1.8 ^a	16.4±1.7 ^a	18.4±1.3 ^a
Guinea pig-normal PS							
C3bRR	15.4±1.3	8.8±0.6	13.4±1.3	12.3±0.9	13.7±1.2	11.6±0.9	13.8±1.4
ICR	18.8±1.7	16.2±1.5	17.8±1.6	19.2±1.5	20.3±1.8	21.4±2.0	18.7±1.7
Control							
C3bRR	14.8±1.3	8.6±0.7	13.2±2.1	9.4±1.0	12.7±1.1	11.8±1.0	15.8±1.9
ICR	17.6±1.5	15.2±1.2	18.6±1.9	17.3±1.4	20.6±1.8	20.9±2.2	20.7±1.7

C3bRR: c3b receptor rosette; ICR: immune complex rosette; APS: anti platelet serum; ^a $P < 0.05$, vs. control group; PS: platelet serum

2.7 IL-2, IFN- γ 水平变化 免疫结束后6 h GP/R-APS组的IL-2开始升高($P < 0.05$), 其中R-APS组于24 h升至最高, 2 d后稍下降并于该水平持续到第15天, 16 d时接近正常水平, GP-APS组于第8天升到最高水平, 16 d时仍处于较高水平, GP-APS与R-APS组IL-2水平比较

差异具有显著性意义($P < 0.05$)。

GP/R-APS组的IFN- γ 均于24 h达到最高水平($P < 0.05$), 后逐渐下降, 但于第12天出现比24 h略低的高峰, 16 d时已接近正常。两者比较差异无显著性意义($P > 0.05$), 见表4。

表4 各组小鼠免疫后 IL-2, IFN- γ 水平的变化
Table 4 Concentration of serum interleukin 2 (IL-2) and interferon γ (IFN- γ) in each group ($\bar{x} \pm s$, ng/L)

Group	Time after serum injection						
	6 h	24 h	2 d	4 d	8 d	12 d	16 d
Rabbit anti-mouse APS							
IL-2	326.4 \pm 23.7 ^a	340.6 \pm 33.7 ^a	209.6 \pm 29.1 ^a	234.4 \pm 21.8 ^a	256.8 \pm 24.8 ^a	240.6 \pm 21.6 ^a	214.4 \pm 29.4 ^a
IFN- γ	162.2 \pm 10.3 ^a	312.1 \pm 24.6 ^a	128.4 \pm 10.3 ^a	140.3 \pm 11.3 ^a	108.8 \pm 9.4 ^a	232.8 \pm 17.6 ^a	129.4 \pm 10.4 ^a
Rabbit-normal PS							
IL-2	288.7 \pm 19.9	368.5 \pm 30.2	180.8 \pm 37.5	229.6 \pm 19.4	152.8 \pm 13.7	244.6 \pm 20.9	152.8 \pm 17.4
IFN- γ	110.8 \pm 11.0	86.4 \pm 9.5	76.3 \pm 9.1	86.4 \pm 7.5	52.3 \pm 7.0	83.2 \pm 6.9	93.6 \pm 8.4
Guinea pig anti-mouse APS							
IL-2	204.8 \pm 22.1 ^a	229.6 \pm 18.8 ^a	493.6 \pm 33.6 ^a	350.4 \pm 32.2 ^a	508.7 \pm 42.4 ^a	488.4 \pm 39.0 ^a	408.8 \pm 37.5 ^a
IFN- γ	174.4 \pm 14.8 ^a	353.2 \pm 31.7 ^a	160.4 \pm 12.6 ^a	101.9 \pm 9.7 ^a	100.8 \pm 8.3 ^a	177.8 \pm 14.4 ^a	108.8 \pm 8.4 ^a
Guinea pig-normal PS							
IL-2	353.6 \pm 31.8	229.6 \pm 27.5	204.8 \pm 19.4	234.4 \pm 20.7	224.8 \pm 22.2	136.8 \pm 11.2	204.8 \pm 17.7
IFN- γ	48.8 \pm 5.3	101.9 \pm 8.4	42.4 \pm 5.3	79.4 \pm 6.9	76.6 \pm 5.9	201.9 \pm 11.0	119.2 \pm 12.3
Control							
IL-2	273.6 \pm 24.4	148.4 \pm 29.4	234.4 \pm 19.2	131.2 \pm 14.8	252.6 \pm 27.2	108.8 \pm 9.4	84.2 \pm 7.9
IFN- γ	42.8 \pm 3.7	52.3 \pm 8.0	90.1 \pm 6.9	62.4 \pm 4.8	45.4 \pm 3.8	55.6 \pm 4.2	65.6 \pm 5.5

APS: anti platelet serum; ^a $P < 0.05$, vs. control group; PS: platelet serum

3 讨论

实验通过对APS造模法进行改良, 发现APS以1:32稀释血清进行建模可以获得良好效果。结果发现应用1:32稀释的GP/R-APS进行建模, 连续6次注射可使血小板维持在正常鼠的40%~60%长达7 d, 16 d后才完全恢复正常。实验还发现, 正常小鼠脾脏内有散在分布的成熟巨核细胞, 胞浆内可见成簇的血小板, 但模型鼠脾脏内成熟巨核细胞明显减少, 取而代之的是大量的小巨核细胞, 血小板几乎见不到, 且模型鼠胸腺较正常小鼠明显萎缩。此模型的成功构建更贴近临床慢性ITP的病理生理变化, 其血小板持续在正常40%左右, 无显著的内脏出血, 无出血性死亡, 可以更好地进行ITP治疗药物的药理、毒理以及疫苗等实验。

诸多临床研究表明ITP患者存在细胞免疫功能异常^[11-15]。T淋巴细胞亚群是参与细胞免疫的主要成分, T细胞各亚群之间保持正常的比例和功能是形成正常免疫应答的基础, CD4⁺和CD8⁺细胞之间通过分泌细胞因子相互调节, 是决定内环境稳定的一个中心环节。实验发现, 虽然GP/R-APS模型引起CD4⁺/CD8⁺细胞比例均为增加, 但R-APS建立的模型CD4⁺细胞增多, 而GP-APS建立的模型CD8⁺细胞下降。由淋巴细胞分泌的细胞因子在调节造血及促进血小板与巨核细胞增生过程中发挥重要作用, 与ITP的发病及其临床进展有

关^[16-20]。实验结果显示与对照组比较, 两APS组小鼠模型血清IL-2、IFN- γ 水平均显著升高, 但GP-APS组IL-2在注射血清后16 d仍维持较高水平, 而R-APS组基本恢复正常, 两者比较差异也有显著性意义, 说明这两种细胞因子与ITP发病密切相关, 参与了该病的免疫反应^[21-27]。两种模型淋巴细胞比例及细胞因子水平不同, 可能是动物模型与人类疾病在机制上存在差别, 血清来源不同导致结果不同。

临床研究表明ITP患者还存在红细胞免疫功能异常^[28], ITP患者的C3b受体花环率明显低于正常人, 红细胞免疫复合物花环形成明显增高。红细胞系统参与免疫调节是近期提出的新概念, 其具有识别、黏附、浓缩、提呈抗原及清除机体循环免疫复合物的能力^[29-30]。C3b受体花环率和红细胞免疫复合物花环直接体现红细胞的黏附能力, 是反映红细胞免疫功能的重要指标。实验中GP/R-APS的C3b受体花环率低于对照组, 但红细胞免疫复合物花环也明显低于对照组, 这说明红细胞免疫功能紊乱参与了ITP的形成, 但人和动物体内具体表现形式不尽一致。

综上所述, 实验成功地用兔抗小鼠血清和豚鼠抗小鼠血清建立了两种ITP小鼠动物模型, 该小鼠模型血小板仅轻度下降, 利于敏感地观察ITP发病机制及药物对ITP的治疗效果。同时证实了不但细胞免疫异常在ITP发病机制中起着重要的作用, 细胞因子、红细胞免疫功能异常亦参与ITP的发病机制。两组动物模型在血小板

降低、巨核细胞升高、细胞因子分泌的趋势及红细胞功能改变上基本相同,但在参与疾病的T细胞亚群及其细胞因子分泌水平略有不同。实验建立的两种中度血小板减低ITP动物模型,与临床拟合良好,为进行ITP治疗药物及疫苗等研究提供良好的平台。

4 参考文献

[1] Terrell DR, Beebe LA, Vesely SK, et al. The incidence of immune thrombocytopenic purpura in children and adults: A critical review of published reports. *Am J Hematol.* 2010;85(3):174-180.

[2] Kuter DJ, Gernsheimer TB. Thrombopoietin and platelet production in chronic immune thrombocytopenia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2009;23(6):1193-1211.

[3] Yang YF, Zhou AX, Ma R. *Zhonghua Xueyexue Zazhi.* 1994;15(3):160-161.
杨宇飞,周霁祥,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):160-161.

[4] Musaji A, Cormont F, Thirion G, et al. Exacerbation of autoantibody-mediated thrombocytopenic purpura by infection with mouse viruses. *Blood.* 2004;104(7):2102-2106.

[5] Arnott J, Horsewood P, Kelton JG. Measurement of platelet-associated IgG in animal models of immune and nonimmune thrombocytopenia. *Blood.* 1987;69(5):1294-1299.

[6] Crow AR, Song S, Siragam V, et al. Mechanisms of action of intravenous immunoglobulin in the treatment of immune thrombocytopenia. *Pediatr Blood Cancer.* 2006;47(5 Suppl):710-713.

[7] McKenzie SE, Reilly MP. Heparin-induced thrombocytopenia and other immune thrombocytopenias: lessons from mouse models. *Semin Thromb Hemost.* 2004;30(5):559-568.

[8] Crow AR, Lazarus AH. The mechanisms of action of intravenous immunoglobulin and polyclonal anti-d immunoglobulin in the amelioration of immune thrombocytopenic purpura: what do we really know? *Transfus Med Rev.* 2008;22(2):103-116.

[9] McKenzie SE. Humanized mouse models of FcR clearance in immune platelet disorders. *Blood Rev.* 2002;16(1):3-5.

[10] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30.
中华人民共和国科学技术部.关于善待实验动物的指导性意见.2006-09-30.

[11] Domínguez-García MV, Rodríguez-Moyado H. Cellular and biochemical mechanisms involved in physiopathogenesis of autoimmune thrombocytopenic purpura. *Gac Med Mex.* 2002;138(5):461-472.

[12] Kuwana M, Ikeda Y. The role of autoreactive T-cells in the pathogenesis of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Int J Hematol.* 2005;81(2):106-112.

[13] Olsson B, Ridell B, Carlsson L, et al. Recruitment of T cells into bone marrow of ITP patients possibly due to elevated expression of VLA-4 and CX3CR1. *Blood.* 2008;112(4):1078-1084.

[14] Fan Y, Ma J, Tao SC, et al. *Zhonghua Zhongyiyao Xuekan.* 2004;22(9):1609-1610.
范颖,马骥,陶淑春,等.紫癜颗粒对ITP模型小鼠外周血T亚群的影响[J].*中华中医药学刊*,2004,22(9):1609-1610.

[15] Semple JW. Infections, antigen-presenting cells, T cells, and immune tolerance: their role in the pathogenesis of immune thrombocytopenia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2009;23(6):1177-1192.

[16] Cines DB, Liebman H, Stasi R. Pathobiology of secondary immune thrombocytopenia. *Semin Hematol.* 2009;46(1 Suppl 2):S2-14.

[17] Stasi R, Evangelista ML, Stipa E, et al. Idiopathic thrombocytopenic purpura: current concepts in pathophysiology and management. *Thromb Haemost.* 2008;99(1):4-13.

[18] Cines DB, McMillan R. Pathogenesis of chronic immune thrombocytopenic purpura. *Curr Opin Hematol.* 2007;14(5):511-514.

[19] Cooper N, Bussel J. The pathogenesis of immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol.* 2006;133(4):364-374.

[20] Garcia-Suarez J, Prieto A, Reyes E, et al. Abnormal gamma IFN and alpha TNF secretion in purified CD2+ cells from autoimmune thrombocytopenic purpura (ATP) patients: their implication in the clinical course of the disease. *Am J Hematol.* 1995;49(4):271-276.

[21] Zhao H, Du W, Wang D, et al. The expression of IFN-gamma, IL-4, Foxp3 and perforin genes are not correlated with DNA methylation status in patients with immune thrombocytopenic purpura. *Platelets.* 2010;21(2):137-143.

[22] Perri D, Shabani F, Ziaeeian G, et al. IFN-gamma treated monocyte/macrophage phagocytosis of red cells sensitized with IgG1 and IgG3 Anti-D containing identical immunoglobulin variable region genes. *Transfus Apher Sci.* 2008;39(1):37-44.

[23] Ma D, Zhu X, Zhao P, et al. Profile of Th17 cytokines (IL-17, TGF-beta, IL-6) and Th1 cytokine (IFN-gamma) in patients with immune thrombocytopenic purpura. *Ann Hematol.* 2008;87(11):899-904.

[24] Tag LM, Ezz-Eldeen AM, Mahmoud MS, et al. Serum IL-2 and platelet-associated immunoglobulins are good prognostic markers in immune thrombocytopenic purpura. *Egypt J Immunol.* 2004;11(2):121-132.

[25] Shariatmadar S, Nassiri M, Vincer V. Effect of plasma exchange on cytokines measured by multianalyte bead array in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol.* 2005;79(2):83-88.

[26] Panitsas FP, Mouzaki A. Effect of splenectomy on type-1/type-2 cytokine gene expression in a patient with adult idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). *BMC Blood Disord.* 2004;4(1):4.

[27] Symons JA, Wood NC, Di Giovine FS, et al. Soluble IL-2 receptor in rheumatoid arthritis. Correlation with disease activity, IL-1 and IL-2 inhibition. *J Immunol.* 1988;141(8):2612-2618.

[28] Lu X, Tang B, Li CR, et al. *Zhonghua Xueyexue Zazhi.* 1995;16(3):130-131.
陆焱,汤斌,李昌荣,等.儿童特发性血小板减少性紫癜红细胞免疫功能观察[J].*中华血液学杂志*,1995,16(3):130-131.

[29] Siegel I, Liu TL, Gleicher N. The red-cell immune system. *Lancet.* 1981;2(8246):556-559.

[30] Aubin E, Lemieux R, Bazin R. Absence of cytokine modulation following therapeutic infusion of intravenous immunoglobulin or anti-red blood cell antibodies in a mouse model of immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol.* 2007;136(6):837-843.

来自本文课题的更多信息——

基金资助: 广东省自然科学基金“树突细胞疫苗治疗特发性血小板减少性紫癜的实验研究”(07005195); 广东省医学科学技术研究基金(WSTJJ20061116440105196211238024)。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

课题的创新点: ①通过倍比稀释血清注射观察模型鼠血小板变化,筛选出能良好拟合临床慢性ITP的中度ITP模型构建方法,以用于进一步的ITP疫苗研究。②动态观察了模型鼠骨髓、脾脏、胸腺的病理变化,目前尚未见相关报道。

课题评估的“金标准”: 课题通过动态观察模型鼠外周血细胞计数、骨髓细胞形态学等ITP诊断的“金标准”,来评价ITP模型构建是否成功。

设计或课题的偏倚与不足: 课题设计合理,实施时发现血清注射后ITP模型鼠血小板中度下降,故观察实验个体出血症状不显著。

提供临床借鉴的价值: 实验结果显示1:32稀释的抗血清可使模型鼠血小板减少50%左右维持时间达100h以上,与ITP临床症状拟合良好,可用于临床新药的药理、毒理实验研究。