

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research淫羊藿苷通过 *miRNA* - 98 - 5p 介导 AMPK/
mTOR/ULK1 信号通路调节免疫耐受影响
免疫性血小板减少症的研究Research of icariin in immune thrombocytopenia by regulating immune tolerance
loss through the AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway mediated by *miRNA* - 98 - 5p李洁冰^{1,2a}, 吴静静³,
胥晓琦³, 张晓冬^{2b}(1. 河南中医药大学 儿科医学院, 河南 郑州
450000; 2. 南阳市第一人民医院 a. 儿二科; b.
血液科, 河南 南阳 473000; 3. 河南中医药大学
第一附属医院 儿科, 河南 郑州 450000)LI Jie - bing^{1,2a}, WU Jing - jing³,
XU Xiao - qi³, ZHANG Xiao - dong^{2b}(1. School of Pediatrics, Henan
University of Chinese Medicine, Zhengzhou
450000, Henan Province, China; 2. a.
Department of Pediatrics II; b.
Department of Hematology, Nanyang First
People's Hospital, Nanyang 473000,
Henan Province, China; 3. Department of
Pediatrics, The First Affiliated Hospital of
Henan University of Traditional Chinese
Medicine pediatrics, Zhengzhou 450000,
Henan Province, China)作者简介: 李洁冰(1984 -), 女, 副主任医师,
主要从事中西医结合防治小儿肾病
方面的临床工作和研究

通信作者: 张晓冬, 副主任医师

MP: 13937713145

E - mail: lijiebing_1994@163.com

摘要:目的 探讨淫羊藿苷通过微小 RNA (*miRNA*) - 98 - 5p 介导腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR)/Unc - 51 样自噬激活激酶 1 (ULK1) 信号通路调节免疫耐受对免疫性血小板减少症 (ITP) 的作用及机制。

方法 小鼠腹腔注射豚鼠抗小鼠血小板血清构建 ITP 模型, 另取 12 只正常小鼠为对照组, 将造模成功的小鼠分为模型组、低剂量实验组、高剂量实验组和阳性药组。低、高剂量实验组和阳性药组分别在小鼠造模后灌胃 1.25、5.00 mg · kg⁻¹ 淫羊藿苷及 9.1 mg · kg⁻¹ 醋酸泼尼松。用全自动血液分析仪检测血小板 (PLT) 和血红蛋白 (Hb) 的水平; 用酶联免疫吸附实验法检测血小板生成素 (TPO) 和炎症因子水平; 用苏木素 - 伊红染色法检测脾组织病理损伤; 用胸骨骨髓涂片法观察巨核细胞; 用实时荧光定量聚合酶链反应法检测 *miRNA* - 98 - 5p 表达水平; 用蛋白质印迹法检测 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路蛋白表达。

结果 对照组、模型组、低剂量实验组、高剂量实验组和阳性药组的 PLT 水平分别为 (1 504.56 ± 166.99)、(752.68 ± 80.33)、(862.95 ± 98.33)、(1 212.35 ± 134.23) 和 (1 363.23 ± 155.33) × 10⁹ · L⁻¹, Hb 水平分别为 (151.33 ± 18.96)、(124.11 ± 13.56)、(138.32 ± 14.02)、(145.33 ± 16.88) 和 (149.22 ± 16.02) g · L⁻¹, TPO 水平分别为 (12.05 ± 1.33)、(5.86 ± 0.78)、(6.62 ± 0.96)、(7.85 ± 0.92) 和 (9.66 ± 0.89) pg · mL⁻¹, 白介素 (IL) - 6 水平分别为 (18.96 ± 2.33)、(44.33 ± 5.39)、(39.25 ± 4.46)、(32.32 ± 4.33) 和 (22.98 ± 3.78) ng · L⁻¹, IL - 10 水平分别为 (42.15 ± 6.48)、(23.12 ± 3.56)、(26.89 ± 3.99)、(31.02 ± 4.65) 和 (33.66 ± 4.86) ng · L⁻¹, 肿瘤坏死因子 - α (TNF - α) 水平分别为 (31.02 ± 4.65)、(77.36 ± 8.98)、(67.65 ± 7.88)、(60.52 ± 7.34) 和 (40.56 ± 5.99) ng · L⁻¹, 干扰素 - γ (IFN - γ) 水平分别为 (4.33 ± 0.68)、(8.33 ± 0.96)、(7.35 ± 0.89)、(6.02 ± 0.81) 和 (5.86 ± 0.75) ng · L⁻¹, *miRNA* - 98 - 5p 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.16、1.78 ± 0.21、1.51 ± 0.18、1.22 ± 0.16 和 1.15 ± 0.15, 磷酸化 (p) - AMPK/AMPK 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.14、1.81 ± 0.28、1.60 ± 0.19、1.31 ± 0.16 和 1.25 ± 0.21, p - mTOR/β - 肌动蛋白 (β - actin) 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.16、0.48 ± 0.07、0.59 ± 0.09、0.79 ± 0.12 和 0.82 ± 0.14, p - ULK1/β - actin 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.15、0.42 ± 0.06、0.53 ± 0.09、0.89 ± 0.14 和 0.93 ± 0.16, 模型组上述指标与对照组比较, 低、高剂量实验组和阳性药组上述指标与模型组比较, 在统计学上差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$)。

结论 淫羊藿苷通过下调 *miRNA* - 98 - 5p 表达调控 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路来调节 ITP 小鼠免疫耐受, 抑制细胞自噬, 从而提升血小板水平。

关键词: 淫羊藿苷; 免疫性血小板减少症; 免疫耐受; 微小 RNA - 98 - 5p; 腺苷酸活化蛋白激酶/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白/Unc - 51 样自噬激活激酶 1 信号通路; 自噬

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2026.05.014

中图分类号:R558 文献标志码: A
文章编号:1001-6821(2026)05-0678-08

Abstract: Objective To explore the mechanism of action by which icariin regulates the loss of immune tolerance to immune thrombocytopenia (ITP) through the microRNA (*miRNA*) - 98 - 5p - mediated adenosine monophosphate - activated protein kinase (AMPK)/mammalian target of rapamycin (mTOR)/Unc - 51 - like autophagy - activating kinase 1 (ULK1) signaling pathway. **Methods** The ITP model was established by intraperitoneal injection of guinea pig anti - mouse platelet serum into mice. Another 12 normal mice were taken as the control group. The mice with successful modeling were divided into model group, the experimental - low group, the experimental - high group and the positive drug group. The experimental - low and experimental - high groups and the positive drug group were gavaged with 1.25, 5.00 mg · kg⁻¹ icariin and 9.1 mg · kg⁻¹ prednisone acetate, respectively, after the mice were modeled. The levels of platelets (PLT) and hemoglobin (Hb) were detected by automatic blood analyzer; the levels of thrombopoietin (TPO) and inflammatory factors were detected by enzyme - linked immunosorbent assay; the pathological damage of spleen tissue was detected by hematoxylin - eosin staining; megakaryocytes were observed with sternum bone marrow smears; the relative expression level of *miRNA* - 98 - 5p was detected by real - time fluorescence quantitative polymerase chain reaction; and the protein relative expression levels of the AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway was detected by Western blotting. **Results** The PLT levels in control group, model group, experimental - low group, experimental - high group and positive drug group were (1 504.56 ± 166.99), (752.68 ± 80.33), (862.95 ± 98.33), (1 212.35 ± 134.23) and (1 363.23 ± 155.33) × 10⁹ · L⁻¹, respectively; the Hb levels were (151.33 ± 18.96), (124.11 ± 13.56), (138.32 ± 14.02), (145.33 ± 16.88) and (149.22 ± 16.02) g · L⁻¹, respectively; the TPO levels were (12.05 ± 1.33), (5.86 ± 0.78), (6.62 ± 0.96), (7.85 ± 0.92) and (9.66 ± 0.89) pg · mL⁻¹, respectively; the levels of interleukin - 6 (IL - 6) were (18.96 ± 2.33), (44.33 ± 5.39), (39.25 ± 4.46), (32.32 ± 4.33) and (22.98 ± 3.78) ng · L⁻¹, respectively; the levels of IL - 10 were (42.15 ± 6.48), (23.12 ± 3.56), (26.89 ± 3.99), (31.02 ± 4.65) and (33.66 ± 4.86) ng · L⁻¹, respectively; the levels of tumor necrosis factor - α (TNF - α) were (31.02 ± 4.65), (77.36 ± 8.98), (67.65 ± 7.88), (60.52 ± 7.34) and (40.56 ± 5.99) ng · L⁻¹, respectively; the levels of interferon - gamma (IFN - γ) were (4.33 ± 0.68), (8.33 ± 0.96), (7.35 ± 0.89), (6.02 ± 0.81) and (5.86 ± 0.75) ng · L⁻¹, respectively; the relative expression levels of *miRNA* - 98 - 5p were 1.00 ± 0.16, 1.78 ± 0.21, 1.51 ± 0.18, 1.22 ± 0.16 and 1.15 ± 0.15, respectively; the relative expression levels of phosphorylated (p) - AMPK/AMPK were 1.00 ± 0.14, 1.81 ± 0.28, 1.60 ± 0.19, 1.31 ± 0.16 and 1.25 ± 0.21, respectively; the relative expression levels of p - mTOR/β - actin were 1.00 ± 0.16, 0.48 ± 0.07, 0.59 ± 0.09, 0.79 ± 0.12 and 0.82 ± 0.14, respectively; the relative expression levels of p - ULK1/β - actin were 1.00 ± 0.15, 0.42 ± 0.06, 0.53 ± 0.09, 0.89 ± 0.14 and 0.93 ± 0.16, respectively. There were statistically significant differences when comparing the above indicators of model group with those of control group, and also when comparing the above indicators of the experimental - low, experimental - high groups and positive drug group with those of model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$). **Conclusion** Icariin regulates the loss of immune tolerance in rats with ITP, inhibits autophagy, and thus elevates platelet levels by down - regulating the expression of *miRNA* - 98 - 5p and modulating the AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway.

Key words: icariin; immune thrombocytopenia; loss of immune tolerance; microRNA - 98 - 5p; adenosine monophosphate - activated protein kinase/mammalian target of rapamycin/unc - 51 - like autophagy - activating kinase 1 signaling pathway; autophagy

免疫性血小板减少症(immune thrombocytopenia, ITP)是一种获得性自身免疫性疾病,其主要特征是血

小板数量降低和出血倾向^[1]。由T细胞介导的血小板自身抗原的免疫失耐受为ITP发病的重要诱因^[2]。

在一线标准治疗下,约1/3患者出现难治,1/2患者发生疾病慢性化,而中医侧重辨证论治,循证证据发现中医药在降低出血风险、协同增效方面具有优势^[3]。淫羊藿苷为中药淫羊藿的关键活性成分,在调节免疫与神经、预防骨质疏松等方面均发挥着重要作用^[4]。微小RNA(microRNA, *miRNA*) - 98 - 5p 属于 let7 家族 *miRNAs*,参与调控生物体的发育、分化、代谢及免疫等生理病理过程,可以通过调控其下游信号通路来调节全身炎症综合征^[5]。本研究探讨淫羊藿苷通过 *miRNA* - 98 - 5p 介导腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine monophosphate - activated protein kinase, AMPK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)/Unc - 51 样自噬激活激酶1(unc - 51 - like autophagy - activating kinase 1, ULK1)信号通路调节免疫耐受对ITP的作用和机制,为ITP的治疗提供新的思路。

材料与方法

1 材料

动物 80只6~8周龄无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级BALB/c小鼠,体质量为18~20g,雌雄各半;3~4周龄雄性豚鼠20只,体质量为250~300g,均购自河南斯克贝斯生物公司,动物生产许可证号:SCXK(豫)2020-0005,动物使用许可证号:SYXK(豫)2022-0004。将豚鼠每笼3只饲养,小鼠每笼饲养数量不超过5只,饲养于SPF级动物实验房内,温度控制在 $(24 \pm 2)^{\circ}\text{C}$,相对湿度为40%~60%,光照度为每12h明暗交替,自由饮水进食,3d更换1次垫料并添加饲料及水。本实验经南阳市第一人民医院动物伦理委员会审批通过(伦理批号:IACUC-202405028)。

药品与试剂 淫羊藿苷,规格:每瓶200mg,纯度:98.04%,批号:114542,美国TargetMol公司生产;弗氏完全佐剂,规格:每瓶10mL,批号:376039、弗氏不完全佐剂,规格:每瓶10mL,批号:457078、醋酸泼尼松,规格:每瓶1g,纯度:98.74%,批号:101239,均由美国MedChemExpress公司生产;干扰素- γ (interferon - gamma, IFN - γ)、血小板生成素(thrombopoietin, TPO)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor - alpha, TNF - α)、白细胞介素(Interleukin, IL) - 10和IL - 6酶联免疫吸附实验(enzyme - linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒,均由上海科艾博生物公司生产;磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)、苏木素-伊红(hematoxylin - eosin, HE)

染色试剂盒、逆转录试剂盒和瑞氏染液,均由北京索莱宝科技公司生产;总RNA提取试剂,北京天根生化科技公司生产;实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real - time polymerase chain reaction, qRT - PCR)试剂盒,上海翌圣生物科技有限公司生产;磷酸化(phosphorylated, p) - AMPK、p - mTOR、p - ULK1、 β - 肌动蛋白(beta - actin, β - actin)、AMPK、mTOR和ULK1抗体,均由美国Cell Signaling Technology公司生产;辣根过氧化物酶标记的二抗,英国Abcam公司生产;引物由上海生工生物公司提供。

仪器 DF55Vet全自动血液分析仪,广东深圳帝迈生物公司产品;Gentier mini PCR仪,陕西西安天隆科技公司产品;Axioscope 5光学显微镜,德国蔡司公司产品;FS800A切片机,广东深圳市瑞沃德生命科技公司产品。

2 实验方法

2.1 ITP模型构建^[6]

豚鼠抗小鼠血小板血清(guinea pig anti - mouse platelet serum, APS)制备:选用20只BALB/c小鼠,麻醉后,用心脏取血法获取血液样本。分离得到血小板,调整浓度为 $2.5 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$,将调整好浓度的血小板分别与等量的弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂充分混合均匀,以此制备抗原。在实验第0w,将含有弗氏完全佐剂的抗原注射至豚鼠足掌、背部及皮下,注射总量为1mL。于1、2、4w,分别将含有弗氏不完全佐剂的抗原,按照与第0w相同注射部位、点数及剂量,对豚鼠进行注射。在第5w时,豚鼠心脏取血,离心后,取血清,获得APS。

ITP造模:将APS取出融化加入生理盐水稀释。在实验的第0、1、3、5、7、9、11、13d,取上述稀释后的APS,以0.1mL剂量注射至SPF级BALB/c小鼠腹腔内,若血小板计数持续处于低水平,则为造模成功。

2.2 动物分组与处理方法

将剩余60只SPF级BALB/c小鼠用分层随机化法分为5组,先按性别分为雌雄2个亚层,每个亚层内随机分为5组,每组12只,保证每组雌雄各6只,组间性别比例完全均衡。对照组小鼠分别于0、1、3、5、7、9、11、13d腹腔注射等量生理盐水,随后灌胃等量生理盐水,每天1次,连续2w;模型组按照“2.1”方法进行ITP造模操作,造模成功后灌胃等量生理盐水,每天1次,连续2w;低剂量实验组为造模后小鼠灌胃淫羊藿苷($1.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),每天1次,连续灌胃2w;高剂量实验组为造模后小鼠灌胃淫羊藿苷($5.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),每天1次,连续灌胃2w;阳性药组

为造模后小鼠灌胃醋酸泼尼松($9.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),每周2次,连续2 w。

2.3 全自动血液分析仪和 ELISA 法检测外周血相关指标^[7]

麻醉后的小鼠经腹主动脉取血,乙二胺四乙酸抗凝,用全自动血液分析仪检测外周血中血小板(platelet, PLT)和血红蛋白(hemoglobin, Hb)水平。将小鼠血液以 $3\,500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,分离血清后,严格按照 ELISA 试剂盒说明书要求检测血清中 IL-10、TPO、IL-6、IFN- γ 和 TNF- α 水平。

2.4 HE 染色法检测小鼠脾组织病理损伤^[8]

将小鼠处死后取脾组织,经脱水、透明、固定包埋后,用切片机制成石蜡切片(厚度 $5 \mu\text{m}$),石蜡切片脱蜡、水化后,苏木精染色 2 min,流水冲洗,盐酸酒精分化,再次冲洗,伊红染色 1 min 后,梯度乙醇脱水处理,二甲苯透明,用中性树胶封片,用光学显微镜观察脾组织病理损伤。

2.5 胸骨骨髓涂片法观察巨核细胞^[9]

将小鼠麻醉后,持穿刺针抽取骨髓液,制备为骨髓涂片,用瑞氏染色法进行染色,用 10 倍显微镜视野随机拍摄,观察原始、幼稚、产板、颗粒巨核细胞并进行分类计数。

2.6 qRT-PCR 法检测各组小鼠脾组织中 miRNA-98-5p 表达水平^[10]

小鼠脾组织切碎,置于总 RNA 提取试剂内混匀,提取各组总 RNA,按 qRT-PCR 试剂盒说明书中方法进行 PCR 反应,反应程序:预变性 94°C 10 min,变性 94°C 30 s,退火 58°C 30 s,35 个循环,延伸 72°C 32 s。以 U6 为内参基因,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 算法进行分析,计算 miRNA-98-5p 相对表达水平。引物序列如下:miRNA-98-5p 上游引物: $5' - \text{ACACTCCCTATA-CAACTTAC} - 3'$,下游引物: $5' - \text{GGGAAAGTAGTGAG-}$

$\text{GCCTCAGA} - 3'$;U6 上游引物: $5' - \text{AGAGCCTGTGCTGTCCG} - 3'$,下游引物: $5' - \text{CATCTTCAAAGCACTTC-CCT} - 3'$ 。

2.7 蛋白印迹法检测 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路蛋白表达^[11]

取小鼠脾组织,低温裂解处理,高速离心后分离上清液,提取蛋白并测定蛋白浓度。用聚丙烯酰胺凝胶电泳法分离蛋白,转移到聚偏二氟乙烯膜上,脱脂牛奶封闭 1 h 后,加入 p-AMPK/AMPK、p-mTOR/ β -actin 和 p-ULK1/ β -actin 一抗(稀释度均为 1:1 000)中, 4°C 下避光过夜孵育,次日,加入二抗(稀释度为 1:5 000),室温在脱色摇床上孵育 1 h,洗膜 3 次,以增强型化学发光试剂显色,用凝胶成像仪显像,用 Image J 软件定量分析蛋白条带灰度值。本实验设置 3 次独立生物学重复,每次重复同步设置 3 次技术重复,最终结果取 3 次生物学重复的 $\bar{x} \pm s$ 。

3 统计学处理

用 SPSS 26.0 软件进行统计分析,以 $\bar{x} \pm s$ 表示计量资料,2 组间比较用独立样本 t 检验,多组间整体比较用单因素方差分析(One-way ANOVA)。

结 果

1 淫羊藿苷对 ITP 小鼠外周血血小板的影响

对照组和模型组灌胃等量生理盐水,低、高剂量实验组和阳性药组分别在小鼠造模后灌胃 1.25 、 $5.00 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 淫羊藿苷及 $9.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 醋酸泼尼松。

全自动血液分析和 ELISA 法检测显示:与对照组相比,模型组的 PLT、Hb 和 TPO 水平均显著下降($P < 0.001$);与模型组相比,低、高剂实验量和阳性药组的 Hb、PLT 和 TPO 水平均显著上升($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$),见表 1。

表 1 各组小鼠血小板(PLT)、血红蛋白(Hb)和血小板生成素(TPO)水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of platelet(PLT), hemoglobin(Hb) and thrombopoietin(TPO) levels in mice of each group($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	PLT($\times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$)	Hb($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	TPO($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
Control	12	$1\,504.56 \pm 166.99$	151.33 ± 18.96	12.05 ± 1.33
Model	12	$752.68 \pm 80.33^{***}$	$124.11 \pm 13.56^{***}$	$5.86 \pm 0.78^{***}$
Experimental-low	12	$862.95 \pm 98.33^{***\#}$	$138.32 \pm 14.02^{***\#}$	$6.62 \pm 0.96^{***\#}$
Experimental-high	12	$1\,212.35 \pm 134.23^{***\#\Delta\Delta}$	$145.33 \pm 16.88^{***\#\Delta}$	$7.85 \pm 0.92^{***\#\Delta\Delta\Delta}$
Positive drug	12	$1\,363.23 \pm 155.33^{***\#\Delta\Delta\Delta\blacktriangle}$	$149.22 \pm 16.02^{***\#\Delta\Delta\Delta\blacktriangle}$	$9.66 \pm 0.89^{***\#\Delta\Delta\Delta\blacktriangle\blacktriangle}$

Control and model group: Injected an equal volume of normal saline; Experimental-low group: Gavaged $1.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ icariin; Experimental-high group: Gavaged $5.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ icariin; Positive drug group: Gavaged $9.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ prednisone acetate tablets; Compared with control group, $***P < 0.001$; Compared with model group, $\#P < 0.05$, $\#\#P < 0.01$, $\#\#\#P < 0.001$; Compared with experimental-low group, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.001$; Compared with experimental-high group, $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.001$.

2 淫羊藿苷对 ITP 小鼠脏器指数及组织病理损伤的改善

HE 染色显示:对照组中红白髓界限清晰,脾窦、脾小结结构正常,未见充血、扩张以及肿胀现象;与对照组相比,模型组中脾小结、脾窦结构扩张明显,细胞肿胀明显,炎性介质填充明显,红白髓界限模糊不明;与模型组相比,高剂量实验组和阳性药组脾组织内脾小结的扩张、肿胀现象明显缓解,见图 1。

脾和胸腺指数检测显示:与对照组相比,模型组的脾和胸腺指数均显著上升(均 $P < 0.001$);与模型组相比,低、高剂量实验组和阳性药组的脾和胸腺指数均显著下降($P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001$),见表 2。

3 淫羊藿苷改善 ITP 小鼠炎症水平

ELISA 显示:与对照组相比,模型组的 $\text{TNF}-\alpha$ 、 $\text{IL}-6$ 和 $\text{IFN}-\gamma$ 水平均显著上升, $\text{IL}-10$ 水平显著下降(均 $P < 0.001$);与模型组相比,低、高剂量实验组和阳性药组的 $\text{TNF}-\alpha$ 、 $\text{IL}-6$ 和 $\text{IFN}-\gamma$ 水平均显著下降, $\text{IL}-10$ 水平显著上升($P < 0.05, P < 0.001$),见表 3。

4 淫羊藿苷对胸骨骨髓巨核细胞的影响

胸骨骨髓涂片观察巨核细胞显示:与对照组相比,模型组中原始和幼稚巨核细胞比例显著增

多,产板巨核细胞比例显著减少(均 $P < 0.001$),颗粒巨核和裸核巨核细胞比例在统计学上差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$);与模型组相比,低、高剂量实验组和阳性药组的原始和幼稚巨核细胞比例均显著下降,产板巨核细胞比例均显著增加($P < 0.05, P < 0.001$),颗粒巨核和裸核巨核细胞在统计学上差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),见表 4。

5 淫羊藿苷对 ITP 小鼠脾组织中 $\text{miRNA}-98-5p$ 水平的影响

qRT-PCR 显示:对照组、模型组、低剂量实验组、

表 2 各组小鼠脾和胸腺指数的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of spleen and thymus indices in mice of each group($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Spleen index	Thymus index
Control	12	4.11 ± 0.66	2.75 ± 0.33
Model	12	9.12 ± 1.55 ***	3.85 ± 0.46 ***
Experimental-low	12	7.56 ± 0.78 ***##	3.42 ± 0.45 ***#
Experimental-high	12	6.33 ± 0.70 ***###△△	3.11 ± 0.42 *###△
Positive drug	12	4.66 ± 0.59###△△△▲▲▲	3.19 ± 0.51 *###△

Compared with control group, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$; Compared with model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$; Compared with experimental-low group, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$, △△△ $P < 0.001$; Compared with experimental-high group, ▲▲▲ $P < 0.001$.

表 3 小鼠血清中白细胞介素(IL)-6、IL-10、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和干扰素-γ(IFN-γ)水平的比较($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}, \bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of the levels of interleukin (IL)-6, IL-10, tumor necrosis factor - alpha (TNF - α) and interferon - gamma (IFN - γ) in mouse serum ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}, \bar{x} \pm s$)

Group	n	IL-6	IL-10	TNF-α	IFN-γ
Control	12	18.96 ± 2.33	42.15 ± 6.48	31.02 ± 4.65	4.33 ± 0.68
Model	12	44.33 ± 5.39 ***	23.12 ± 3.56 ***	77.36 ± 8.98 ***	8.33 ± 0.96 ***
Experimental-low	12	39.25 ± 4.46 ***#	26.89 ± 3.99 ***#	67.65 ± 7.88 ***#	7.35 ± 0.89 ***#
Experimental-high	12	32.32 ± 4.33 ***###△△	31.02 ± 4.65 ***###△	60.52 ± 7.34 ***###△	6.02 ± 0.81 ***###△△
Positive drug	12	22.98 ± 3.78###△△△▲▲▲	33.66 ± 4.86 ***###△△▲	40.56 ± 5.99 ***###△△△▲▲▲	5.86 ± 0.75 ***###△△△▲

Compared with control group, *** $P < 0.001$; Compared with model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.001$; Compared with experimental-low group, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$, △△△ $P < 0.001$; Compared with experimental-high, ▲ $P < 0.05$, ▲▲▲ $P < 0.001$.

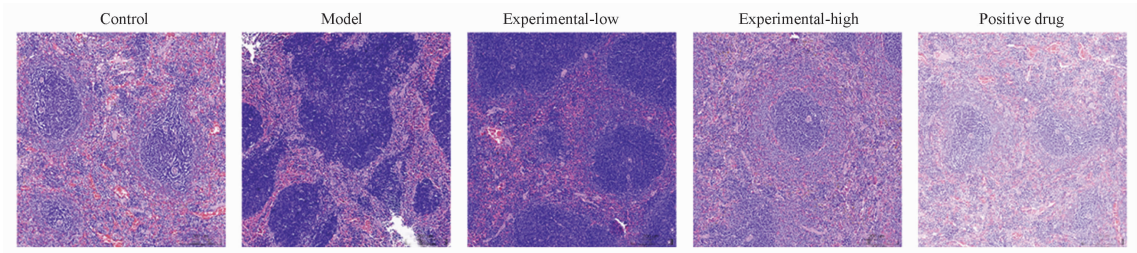


图 1 用苏木精-伊红(HE)染色法观察各组小鼠脾组织($\times 50$)

Figure 1 Spleen tissues in mice of each group observed by hematexylin-eosin(HE) staining($\times 50$)

高剂量实验组和阳性药组小鼠脾 *miRNA-98-5p* 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.16 、 1.78 ± 0.21 、 1.51 ± 0.18 、 1.22 ± 0.16 和 1.15 ± 0.15 。与对照组相比,模型组的 *miRNA-98-5p* 相对表达水平显著上升 ($P < 0.05$);与模型组相比,低、高剂量实验组和阳性药组的 *miRNA-98-5p* 相对表达水平均显著下降 (均 $P < 0.05$)。

6 淫羊藿苷对 ITP 小鼠脾组织中 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路相关蛋白表达的影响

蛋白印迹法显示:与对照组相比,模型组的 p-AMPK/AMPK 相对表达水平显著上升, p-mTOR/ β -actin 和 p-ULK1/ β -actin 相对表达水平均显著下降 (均 $P < 0.001$);与模型组相比,低、高剂量实验组和阳性药组中 p-AMPK/AMPK 相对表达水平均显著下降, p-mTOR/ β -actin 和 p-ULK1/ β -actin 相对表达水平均显著上升 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$),见图 2 和表 5。

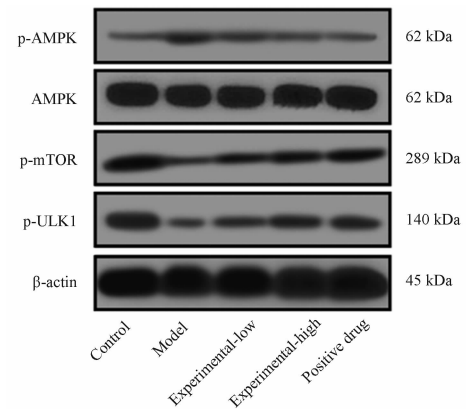


图 2 蛋白印迹法检测腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR)/Unc-51 样自噬激活激酶 (ULK1) 信号通路相关蛋白相对表达水平

Figure 2 The relative expression levels of proteins related to the adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)/mammalian target of rapamycin (mTOR)/unc-51-like autophagy-activating kinase 1 (ULK1) signaling pathway detected by Western blotting

表 4 各组小鼠胸骨骨髓巨核细胞的比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of megakaryocytes in the sternal bone marrow of mice in each group (% , $\bar{x} \pm s$)

Group	n	Primitive and immature megakaryocytes	Platelet-producing megakaryocytes	Granular megakaryocytes	Bare-nucleus megakaryocytes
Control	12	27.99 ± 3.86	25.88 ± 3.65	40.85 ± 6.85	5.28 ± 0.88
Model	12	$40.65 \pm 5.96^{***}$	$9.68 \pm 1.51^{***}$	44.75 ± 7.65	4.92 ± 0.82
Experimental-low	12	$35.68 \pm 4.89^{***\#}$	$14.25 \pm 1.95^{***\#}$	44.98 ± 6.98	5.09 ± 0.91
Experimental-high	12	$30.63 \pm 4.45^{###\Delta\Delta}$	$21.92 \pm 2.86^{###\Delta\Delta\Delta}$	42.55 ± 7.05	4.90 ± 0.76
Positive drug	12	$28.95 \pm 3.97^{###\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta}$	$22.56 \pm 3.22^{###\Delta\Delta\Delta\Delta}$	43.88 ± 7.78	4.61 ± 0.70

Compared with control group, $***P < 0.001$; Compared with model group, $\#P < 0.05$, $###P < 0.001$; Compared with experimental-low group, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$; Compared with experimental-high, $\Delta P < 0.05$.

表 5 各组小鼠脾组织中 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路蛋白相对水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of the relative expression levels of AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway proteins in the spleen tissues of mice in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	p-AMPK/AMPK	p-mTOR/ β -actin	p-ULK1/ β -actin
Control	12	1.00 ± 0.14	1.00 ± 0.16	1.00 ± 0.15
Model	12	$1.81 \pm 0.28^{***}$	$0.48 \pm 0.07^{***}$	$0.42 \pm 0.06^{***}$
Experimental-low	12	$1.60 \pm 0.19^{***\#}$	$0.59 \pm 0.09^{***\#}$	$0.53 \pm 0.09^{***\#}$
Experimental-high	12	$1.31 \pm 0.16^{###\Delta\Delta}$	$0.79 \pm 0.12^{###\Delta\Delta}$	$0.89 \pm 0.14^{###\Delta\Delta\Delta}$
Positive drug	12	$1.25 \pm 0.21^{###\Delta\Delta\Delta\Delta}$	$0.82 \pm 0.14^{###\Delta\Delta\Delta\Delta}$	$0.93 \pm 0.16^{###\Delta\Delta\Delta\Delta}$

Compared with control group, $***P < 0.001$; Compared with model group, $\#P < 0.05$, $###P < 0.01$, $###P < 0.001$; Compared with experimental-low group, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$.

讨 论

研究发现,免疫细胞功能受损是 ITP 发病机制的

重要组成部分,该病的主要一线治疗(皮质类固醇、免疫球蛋白)和二线治疗(脾切除术、利妥昔单抗)等存在药物不良反应较大且易反复发作的局限性,部分患者对多线治疗无反应,慢性和难治性 ITP 的治疗仍

然是临床面临的重大挑战^[10,12]。中医药治疗在防治ITP出血、免疫稳态及稳定外周血小板数值等方面优势显著,但其作用机制仍待深入研究^[9]。

淫羊藿苷是从温补肾阳药淫羊藿中提取的有效成分,在特异性免疫细胞中,可以通过调控IL-6/两面神激酶/信号转导与转录激活因子3通路,下调免疫抑制因子的表达,提高免疫微环境对肿瘤的抑制作用^[13]。有研究指出,淫羊藿苷能够降低肿瘤坏死因子 α 及白细胞介素8水平,促进成骨细胞的分化^[14]。血小板由产板巨核细胞产生,其前体是颗粒巨核细胞,产生血小板后变为裸核巨核细胞^[6]。TPO可以通过调节巨核细胞成熟过程来抑制细胞凋亡,促进血小板生成;在炎症反应中,炎症介质能够刺激巨核细胞,促使其进入活跃的增殖状态,进而致使血小板数量出现相对性的增多^[15-16]。本研究发现,ITP小鼠经皮质类固醇类(醋酸泼尼松片)以及低、高剂量淫羊藿苷处理后,与血小板相关的PLT、Hb和TPO水平均显著升高,脾和胸腺指数均显著降低,与炎症相关的IL-6、TNF- α 和IFN- γ 水平均显著降低,IL-10水平显著升高,胸骨骨髓巨核细胞中原始和幼稚巨核细胞比例显著降低,产板巨核细胞比例显著增加,与王岩航等^[11]研究相似,其研究表明,淫羊藿苷可以促进与炎症反应相关蛋白的降解,保护血小板免受免疫介导的损伤,提示淫羊藿苷可以提升血小板水平,调节免疫,可能是治疗ITP的有效药物。从临床应用角度分析,在本研究中,高剂量淫羊藿苷提升血小板的药效已接近一线阳性药醋酸泼尼松水平,且2者在统计学上差异无统计学意义。醋酸泼尼松作为糖皮质激素,虽起效迅猛,但长期使用存在骨质疏松、血糖紊乱、非特异性免疫抑制导致的感染风险升高等药物不良反应^[17-18];而淫羊藿苷具有显著的骨保护作用^[4],且其免疫调控具有靶点特异性,无激素的全身广泛药物不良反应,在慢性/难治性ITP的长期维持治疗、激素减停联合用药中具有潜在临床优势。

miRNA通过与目标mRNA的3'-非翻译区结合,在转录和转录后水平调节基因表达,其中miRNA-98-5p在溃疡性结肠炎、急性心肌梗塞和哮喘等炎症性疾病中表达失调,与多种生物过程有关^[19]。有研究指出,miRNA-98具有抗炎作用,在骨关节炎组织中上调,过表达miR-98可以抑制骨关节炎中软骨细胞的凋亡;而miRNA-98-5p在类风湿关节炎中下调,与类风湿因子滴度呈负相关^[20]。本研究中,模型组的miRNA-98-5p相对表达水平显著升

高,低、高剂量实验组和阳性药组的miRNA-98-5p相对表达水平均显著降低,推测淫羊藿苷通过miRNA-98-5p发挥作用。MPK和mTOR是自动吞噬的上调因子,2者均参与炎症进程,AMPK通过直接磷酸化和激活ULK1促进自噬,而mTOR则通过抑制ULK1的活化来抑制自噬^[21]。罗雅琴等^[22]研究发现,ITP小鼠脾p-AMPK蛋白相对表达水平显著增加,p-mTOR、p-ULK1蛋白相对表达水平均显著降低,细胞自噬增强。本研究中也发现,模型组的p-AMPK/AMPK水平显著升高、p-mTOR/ β -actin和p-ULK1/ β -actin水平均显著降低,经淫羊藿苷处理后则出现与模型组相反结果,细胞自噬得以抑制。推测淫羊藿苷可能通过下调miR-98-5p相对表达水平调控AMPK/mTOR/ULK1信号通路来减轻自噬,未来可以通过特定方式来干预miR-98-5p表达或进行miR-98-5p的过表达来进一步验证结论,拓宽治疗途径,还可以通过TargetScan、miRDB生物信息学数据库预测miR-98-5p在AMPK/mTOR/ULK1通路中的直接靶基因,构建含靶基因3'UTR野生型/突变型序列的荧光素酶报告基因载体,与miR-98-5p mimics共转染细胞,验证miR-98-5p与靶基因的直接结合关系。本研究为动物水平的基础机制研究,后续从基础研究到临床转化仍存在一定挑战,一方面需通过人和动物体表面积换算法完成小鼠到人体的等效剂量转换,明确ITP人群的安全有效剂量范围;另一方面,淫羊藿苷在慢性/难治性ITP人群中的长期用药安全性、毒理学特征仍需后续系统研究进一步验证。此外,本研究仅在动物水平验证了淫羊藿苷的作用与机制,尚未开展细胞水平的靶点验证与临床样本表达分析;其次,免疫相关指标仅检测了核心促炎/抑炎因子,未进一步检测Th1/Th2/Treg细胞亚群比例及相关特异性标志物,对免疫耐受机制的全面解读存在一定限制。后续研究将进一步开展细胞水平的靶点验证、ITP患者临床样本的分子表达分析,同时结合流式细胞术深入探索淫羊藿苷对T细胞亚群失衡的调控作用,全面阐明其恢复ITP免疫耐受的深层机制,进一步完善研究的深度与临床价值。

本研究提示:淫羊藿苷调节ITP小鼠免疫失调,抑制自噬从而改善血小板水平,可能与下调miRNA-98-5p以及AMPK/mTOR/ULK1信号通路有关。

参考文献:

- [1] 吴洁雅,侯丽,黄子明,等.健脾益气摄血方调控免疫性血小板

- 减少症 T 细胞亚群功能失调研究[J]. 世界中医药, 2023, 18 (10): 1366—1373.
- [2] 文光焰, 陈斯敏, 吴婵, 等. 原发免疫性血小板减少症发病机制及其相关指标的研究进展[J]. 承德医学院学报, 2024, 4 (4): 326—330.
- [3] 胡琦. 从中西医视角看原发免疫性血小板减少症诊疗实践[J]. 中国实用内科杂志, 2023, 43 (7): 544—550.
- [4] 李时斌, 夏天, 章晓云, 等. 淫羊藿活性单体成分调控骨质疏松症相关信号通路影响骨吸收与骨形成的稳态[J]. 中国组织工程研究, 2022, 26 (11): 1772—1779.
- [5] 唐晋, 周靖, 陈雪梅, 等. *miR* - 98 - 5p 通过靶向调控 TRAF6 表达促进肺泡巨噬细胞 M2 表型分化以保护脓毒症引起的急性肺损伤[J]. 免疫学杂志, 2020, 36 (8): 645—654.
- [6] 杨秀鹏, 许勇钢, 麻柔, 等. 益气通阳颗粒对免疫性血小板减少症模型小鼠的治疗作用及机制[J]. 北京中医药大学学报, 2023, 46 (4): 502—508.
- [7] 王莉, 李微, 张恒文, 等. 生脉散对辐射损伤小鼠造血系统的保护作用[J]. 时珍国医国药, 2022, 33 (3): 584—587.
- [8] ZU Y, MU Y, LI Q, *et al.* Icarin alleviates osteoarthritis by inhibiting NLRP3 - mediated pyroptosis [J]. *J Orthop Surg Res*, 2019, 14 (1): 307.
- [9] 罗雅琴, 黄伟. 芪黄益气摄血方调控 PI3K/AKT/mTOR 信号通路和自噬治疗免疫性血小板减少症的作用机制[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37 (10): 5627—5633.
- [10] 杨雪花, 宋海辰, 焦红杰, 等. 细粒棘球蚴抗原 B 和钙结合蛋白 1 调节小鼠免疫性血小板减少症机制研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2024, 42 (5): 566—572, 581.
- [11] 彭磊, 徐丝瑜, 武博, 等. 淫羊藿中朝藿苷 A、B 和 C 的酶转化及其稀有藿苷的制备[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49 (21): 95—100.
- [12] NOKHOSTIN F, BAKHSHPOUR F, PEZESHKI S, *et al.* Immune thrombocytopenia: A review on the pathogenetic role of immune cells [J]. *Expert Rev Hematol*, 2023, 16 (10): 731—742.
- [13] 卢泰成, 许博文, 邬金洋, 等. 从“免疫编辑”角度探讨恶性肿瘤的五期演变生物学基础[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29 (21): 172—179.
- [14] 王岩航, 叶效明, 姚璐, 等. 淫羊藿苷元治疗血小板减少症的靶点鉴定及作用机制研究[J]. 中草药, 2021, 52 (17): 5250—5257.
- [15] 汤忠富, 程丽丽, 戈扬, 等. 芪黄健脾滋肾颗粒对系统性红斑狼疮血小板减少患者的临床疗效[J]. 中成药, 2023, 45 (6): 1845—1848.
- [16] 徐健, 赵世杰, 牛一蒙, 等. 血小板淋巴细胞比值与老年急性冠状动脉综合征患者冠状动脉介入治疗围术期心肌梗死的相关分析及其预测价值[J]. 中国医科大学学报, 2019, 48 (8): 719—725.
- [17] NARANJO PALACIO L X, ROJAS LÓPEZ A K, FORERO VÁSQUEZ B N, *et al.* Adverse effects and withdrawal symptoms of prolonged glucocorticoid therapy in chronic rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus: A systematic review [J/OL]. *Cureus*, 2025, 17 (12): e99081. 2025 - 12 - 12 [2025 - 12 - 20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/41531608/>.
- [18] POFI R, OTHONOS N, MARJOT T, *et al.* Dose - dependent and tissue - specific adverse effects of exogenous glucocorticoids: Insights for optimizing clinical practice [J]. *J Endocrinol Invest*, 2025, 48 (9): 2067—2076.
- [19] LV H, LIU P, HU H, *et al.* *miR* - 98 - 5p plays suppressive effects on IL - 1 β - induced chondrocyte injury associated with osteoarthritis by targeting CASP3 [J]. *J Orthop Surg Res*, 2024, 19 (1): 239.
- [20] WANG S, GENG Q, ZHANG H, *et al.* Downregulation of *miR* - 98 - 5p expression induces interleukin - 6 expression in rheumatoid fibroblast - like synoviocytes [J]. *Int J Rheum Dis*, 2021, 24 (8): 1024—1031.
- [21] XIAO J, SHEN X, KOU R, *et al.* Kirenol inhibits inflammation challenged by lipopolysaccharide through the AMPK - mTOR - ULK1 autophagy pathway [J/OL]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 116: 109734. 2023 - 03 - 30 [2025 - 12 - 20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36706589/>.
- [22] 罗雅琴, 于新阳, 张月明, 等. 基于 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路介导的自噬探讨芪黄益气摄血方治疗免疫性血小板减少症模型小鼠的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28 (17): 43—51.

(本文编辑: 马凌云 收稿日期 2025 - 06 - 20)