

· 实验研究 ·

熊胆粉及熊去氧胆酸调控免疫性血小板减少症模型
小鼠 $Ly6C^{high}$ 单核细胞迁移的机制研究韩家辉¹, 卓兰², 李睿祯¹, 朱翔慧², 吴斯琴毕力格³, 杜琨^{4*}, 王青春^{2*}1. 内蒙古医科大学蒙医药学院, 内蒙古 呼和浩特 010110; 2. 内蒙古自治区中蒙医药研究院,
内蒙古 呼和浩特 010010; 3. 内蒙古医科大学民族医药创新中心, 内蒙古 呼和浩特 010110;
4. 首都医科大学附属北京中医医院中医药研究所, 北京 100010

摘要 目的: 观察熊胆粉及其有效成分熊去氧胆酸对免疫性血小板减少症(ITP)模型小鼠循环血 $Ly6C^{high}$ 单核细胞趋化受体 CCR2 及其配体 CCL2(MCP-1)的影响, 探究熊胆及其替代品对 ITP 的治疗作用和对 $Ly6C^{high}$ 单核细胞迁移的调控机制。方法: 实验采用豚鼠抗小鼠血小板血清(APS)诱导 ITP 模型, 将 50 只 BALB/c 小鼠随机分为空白组、模型组、泼尼松组、熊胆组及熊去氧胆酸组(UDCA 组), 每组自造模第 6 天起灌胃相应药物(0.40 mL/d)10 d。造模后 6 h、第 7 天和第 15 天, 采用全自动血细胞计数仪观察各组血小板(PLT)数量变化。采用流式细胞术检测循环血单核细胞及其表面趋化受体 CCR2 和 CX_3CR_1 表达情况, 应用酶联免疫吸附法(ELISA)测定血清单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)水平。结果: 造模 6 h 后, 造模组小鼠血小板计数急剧下降($P < 0.05$), 第 7 天时最低, 至实验第 15 天时, 该指标仍处于较低水平, 与空白组相比差异具有统计学意义($P < 0.05$)。熊胆组、熊去氧胆酸组和泼尼松组的血小板数量在治疗后显著增加($P < 0.05$, $P < 0.01$)。流式细胞术检测结果显示, 与模型组比较, 熊胆组、熊去氧胆酸组和泼尼松组能降低循环血 $Ly6C^{high}$ 单核细胞阳性率($P < 0.01$)及其表面趋化受体 CCR2 表达率($P < 0.001$), 而升高 CX_3CR_1 表达率($P < 0.001$)。ELISA 检测结果显示, 与模型组比较, 熊胆组、熊去氧胆酸组和泼尼松组能降低外周血 MCP-1 含量($P < 0.001$)。结论: 熊胆粉及熊去氧胆酸可能是通过降低 MCP-1 的水平, 下调 CCR2 的表达, 从而调控 CCL2-CCR2 介导的 $Ly6C^{high}$ 单核细胞迁移, 降低循环血中 $Ly6C^{high}$ 单核细胞, 进而延缓疾病进展。

关键词 熊胆粉; 熊去氧胆酸; 免疫性血小板减少症; CCL2-CCR2; $Ly6C^{high}$ 单核细胞迁移

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-2392(2026)06-0012-06

DOI: 10.19664/j.cnki.1002-2392.260112

免疫性血小板减少症(Immune thrombocytopenia, ITP)属于血液科常见疾病范畴, 为血小板生成不足或/和血小板免疫性破坏过多而导致的血小板数量减少的一种自身免疫性疾病^[1-3]。ITP 的防治和发病机制研

究仍是临床重点和难点^[4-5]。ITP 属蒙医优势病种^[6], 且涌现出了蒙药“通拉嘎 601”、瘀紫丸、血宝丸、生血康、紫斑红花-8 味等专方, 其中大部分均是以熊胆为主药的制剂^[7]。熊胆的功效及用途是蒙医药学特色和优势, 但由于作用机制不明确和资源紧缺等问题, 熊胆临床应用面临窘境。因此, 研究熊胆治疗 ITP 的作用机制、探寻其替代品成为当务之急。

课题组前期研究证实, 熊胆粉及其有效成分熊去氧胆酸能增加 ITP 小鼠骨髓 $Ly6C^{high}$ 单核细胞数量, 降低循环血 $Ly6C^{high}$ 单核细胞数量, 增加循环血 $Ly6C^{low}$ 单核细胞, 且降低外周血炎症因子 $TNF-\alpha$ 和 $IL-1\beta$ 含量^[8], 表明熊胆粉和熊去氧胆酸可调节 $Ly6C^{high}$ 单核细胞从骨髓进入循环血液, 并改善 ITP 小鼠炎症因子

收稿日期: 2025-07-04 修回日期: 2026-03-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(82160819); 中央引导地方科技发展资金项目(2021ZY0046); 内蒙古医科大学蒙药学“一流学科”科研能力提升项目(MYX2023-K02); 内蒙古自治区草原英才工程青年创新创业人才

作者简介: 韩家辉(2000-), 女, 硕士研究生, 专业: 中药学(蒙药)。

* 通信作者: 杜琨(1978-), 男, 博士, 主任医师, 研究方向: 中医内科。

王青春(1984-), 男, 博士, 主任医师, 研究方向: 蒙药熊胆及其有效替代品治疗血小板减少症的免疫机制研究。

的分泌,促进 Ly6C^{high} 单核细胞转化成 Ly6C^{low} 单核细胞,从而缓解血小板免疫性破坏,但其具体调控机制不明确。为进一步明确其调控机制,本研究通过检测 ITP 模型小鼠循环血 CCL2 及 Ly6C^{high} 单核细胞表面趋化受体 CCR2,探讨熊胆粉及熊去氧胆酸调控 Ly6C^{high} 单核细胞迁移机制,为使用蒙药熊胆及熊去氧胆酸治疗 ITP 建立实验基础。

1 材料

1.1 药物及制备

取 4.28 g 天然熊胆粉(2 倍临床剂量),加入 100 mL 蒸馏水(pH 8.0)溶解,另取 0.52 g 熊去氧胆酸溶于 60 mL 蒸馏水(按熊胆粉用量的 20% 配制)。泼尼松碾碎成粉末,以蒸馏水配制成 2 mg/mL 混悬液备用。

1.2 动物

本研究采用 50 只健康 SPF 级 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠(18~22 g)由北京华阜康公司[SYXK(京)2024-0029]提供,饲养于中国医学科学院药物研究所动物实验中心。饲养环境参数严格控制在温度(22±2)℃、相对湿度(50±10)%、12 h 明/暗光照周期的条件下实施 7 d 环境适应性饲养。本实验方案已获中国医学科学院药物研究所伦理委员会批准(00002053)。

1.3 主要试剂

NK-1.1、CD3e、CD45R/B220、Ly-6G、CD11b、Ly-6C、CD43、CD192(CCR2)、CX₃CR₁、TruStain FcXTM PLUS 抗体均购自美国 Biolegend 公司(批号分别为 156526、152312、103236、127616、101205、128032、143205、150628、341628、156604);红细胞裂解液购自加拿大 Stemcell Technologies 公司(批号:07806);PBS 购自美国康宁公司(批号:21-040-CV);小鼠 MCP-1 ELISA 试剂盒购于美国 R&D 公司(批号:MJE00B);豚鼠抗小鼠血小板血清(APS)由实验室制备;熊胆粉购自福建归真堂药业股份有限公司(批号:Z10980024);熊去氧胆酸(Ursodeoxycholic acid, UDCA)购自上海生工生物有限公司(批号:XW01281321);醋酸泼尼松片购自天津力生制药股份有限公司(批号:XW12510001)。

1.4 主要仪器

BD FACSMelodyTM 流式细胞仪购自美国 BD 公司;5424R 型低温离心机购自德国 Eppendorf 公司;innfinite M200PRO 型酶标仪购自瑞士 Tecan 公司。

2 方法

2.1 豚鼠抗小鼠血小板血清(APS)诱发的 ITP 小鼠模型制备及分组

参考文献^[9]将 50 只 BALB/c 小鼠随机分为空白组、

模型组、泼尼松组、熊胆组和熊去氧胆酸组(UDCA 组)。除空白组外,其余各组于第 1、3、5、7、9、11、13 天腹腔注射 1:4 稀释 APS(100 μL/20 g),使血小板计数持续下降。从建模的第 6 天起,每组都按照给定的治疗方法进行治疗,即空白组、模型组灌胃相同量的生理盐水,熊胆组灌胃熊胆粉溶液,剂量为 0.78 g/kg,熊去氧胆酸组灌胃熊去氧胆酸溶液,剂量为 0.17 g/kg,泼尼松组灌胃泼尼松溶液,剂量为 1.13 mg/kg,每组灌胃量为 0.40 mL/20 g,1 次/d,共 10 d。于实验第 15 天(最后 1 次注射 APS 后 48 h)测定相关指标。

2.2 全自动血细胞分析仪测定外周血小板数量

取血前给每只小鼠准备 380 μL 的 10% CPDA 溶液,在造模后的 3 个时间段(6 h、第 7 天和第 15 天),从各组小鼠大腿隐静脉取血 20 μL,立刻加入准备好的 10% CPDA 稀释液后在全自动血细胞分析仪检测血小板数量。

2.3 循环血单个核细胞的分离

2.5% 异氟烷麻醉后,采用肝素预处理的 1 mL 注射器,经左侧第 3~4 肋间心尖搏动最明显处进行心脏穿刺采血。缓慢回抽注射器活塞维持负压状态,采集 50 μL 全血后迅速退针,穿刺点棉签压迫止血。采集的血液立即转移至含 450 μL 肝素抗凝剂的 EP 管中,加入 2 mL 红细胞裂解液,室温避光孵育 10 min 后,3 000 r/min 离心 3 min,弃上清液后用 PBS 重悬细胞沉淀备用。

2.4 循环血 Ly6C^{high} 单核细胞及其表面趋化受体 CCR2 和 CX₃CR₁ 表达情况

取上述血细胞 10⁶/100 μL,加入 TruStain FcXTM PLUS 封闭非特异性结合位点后再加入如下抗体: NK1.1、CD3e、CD45R/B220、Ly6G、CD11b、Ly6C、CD43、CCR2、CX₃CR₁。设置单阳管和空白对照管,4℃孵育 30 min, PBS 洗涤 3 次,用 500 μL PBS 重悬细胞,过滤,加入流式管内,上机检测。根据 Ly6C 和 CD43 的表达情况,分为 Ly6C⁺⁺ CD43⁺、Ly6C⁺⁺ CD43⁺⁺ 和 Ly6C⁺ CD43⁺⁺ 单核细胞。Ly6C^{high} 单核细胞(Ly6C⁺⁺ CD43⁺ 和 Ly6C⁺⁺ CD43⁺⁺)为炎症表型单核细胞。同时观察其表面趋化受体 CCR2、CX₃CR₁ 表达情况。

2.5 ELISA 检测血清 MCP-1 水平

血液样本通过内眦静脉采集(0.80 mL/只),经两次 4 000 r/min 离心(10 min/次)制备血清,分装冻存于 -80℃。采用 ELISA 试剂盒检测 MCP-1 水平,通过建立标准曲线(横坐标:标准品浓度,纵坐标:OD 值,450 nm 处测量)计算样本浓度(pg/mL)。

2.6 结果统计

数据采用 Graph pad 8 统计软件进行多组间的单因素方差分析(one-way ANOVA),实验数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 熊胆粉及熊去氧胆酸干预 ITP 模型小鼠血小板的变化

模型建立 6 h 后即可观察到模型组 PLT 数量显著降低($P < 0.05$),第 7 天达到最低值。尽管此后 PLT 计数略有回升,但至实验第 15 天仍显著低于空白组($P < 0.05$),证实 APS 成功诱导了 ITP 小鼠模型。治疗 10 d(造模第 15 天)后,熊胆组、UDCA 组 PLT 计数显著回升,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。提示,熊胆粉、熊去氧胆酸能改善 ITP 模型小鼠外周血小板的免疫性破坏,见表 1。

3.2 熊胆粉及熊去氧胆酸对 ITP 模型小鼠循环血 $Ly6C^{high}$ 单核细胞的影响

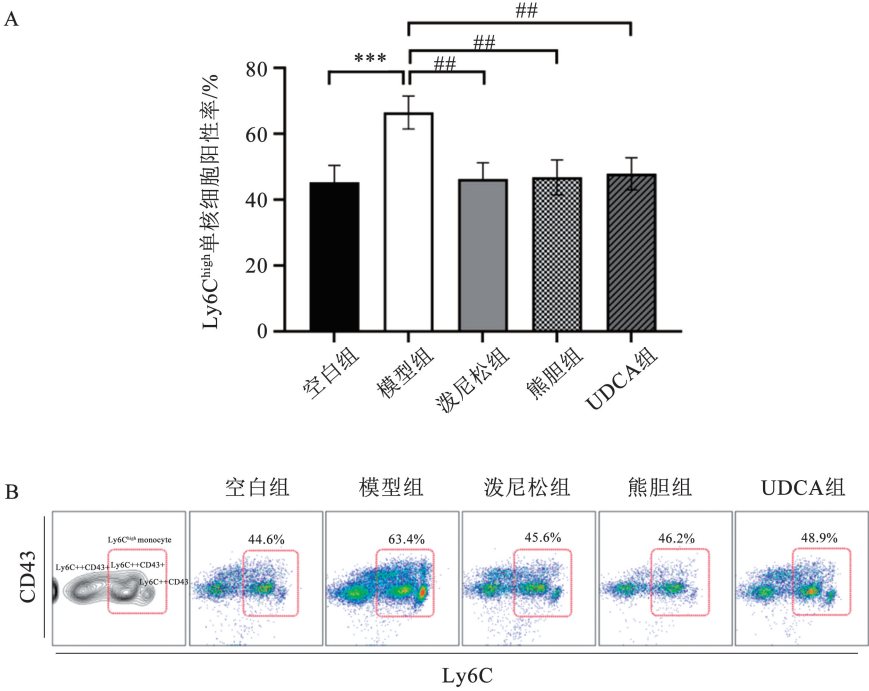
流式细胞术检测结果显示,造模后第 15 天,模型组

循环血中 $Ly6C^{high}$ 单核细胞阳性百分率为(66.50 ± 5.03)%,显著高于空白组(45.30 ± 5.11)%,差异有统计学意义($P < 0.001$),表明 ITP 模型小鼠循环血中 $Ly6C^{high}$ 单核细胞分布较高。干预后,熊胆组、UDCA 组循环血 $Ly6C^{high}$ 单核细胞阳性百分率减少,分别为(46.80 ± 5.31)%、(47.90 ± 4.86)%,与模型组比较差异具有统计学意义($P < 0.01$)。结果显示,熊胆粉及其活性成分熊去氧胆酸可下调 ITP 模型小鼠外周血 $Ly6C^{high}$ 单核细胞水平,见图 1A、1B。

表 1 熊胆粉和 UDCA 对外周血中血小板计数的影响($\bar{x} \pm s, \times 10^9/L$)

组别	6 h	第 7 天	第 15 天
空白组	958.50 ± 90.36	949.70 ± 86.41	965.20 ± 89.08
模型组	426.80 ± 80.13 *	219.60 ± 79.23 *	369.50 ± 80.14 *
泼尼松组	419.90 ± 81.32 *	270.50 ± 90.21 *#	883.30 ± 80.06 *##
熊胆组	420.60 ± 79.86 *	237.90 ± 91.37 *	895.70 ± 82.12 *##
熊去氧胆酸组	416.50 ± 80.12 *	231.10 ± 92.02 *	884.40 ± 85.36 *##

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。



注:A. 各组 $Ly6C^{high}$ 单核细胞阳性率的比较;B. 不同组外周血中单核细胞的百分比。与空白组比较,*** $P < 0.001$;与模型组比较,## $P < 0.01$ 。

图 1 熊胆粉及 UDCA 对 ITP 模型小鼠外周血中 $Ly6C^{high}$ 单核细胞阳性率的影响

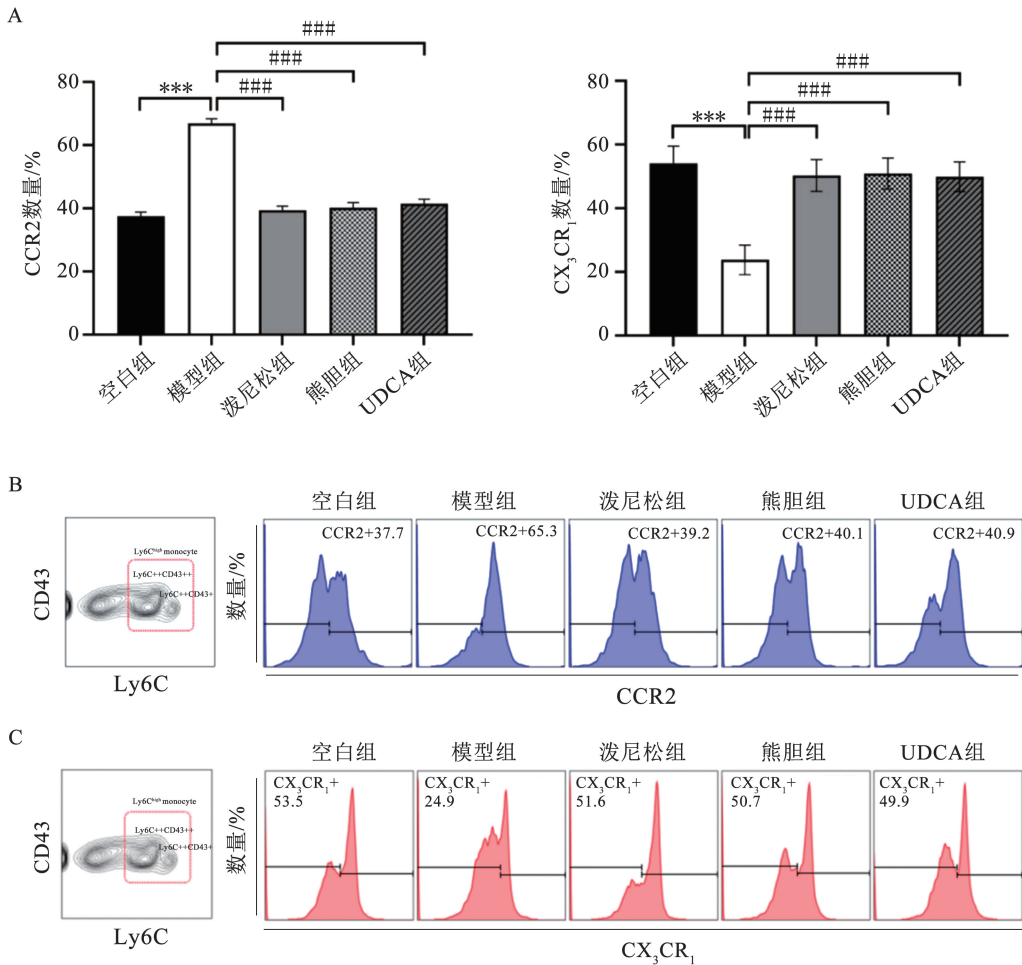
3.3 熊胆粉和熊去氧胆酸对 ITP 模型小鼠循环血 $Ly6C^{high}$ 单核细胞表面趋化受体 CCR2 和 CX_3CR_1 的影响

上述研究结果表明,熊胆粉、熊去氧胆酸可改善 ITP 模型小鼠循环血中 $Ly6C^{high}$ 单核细胞异常分布。为了进一步明确机制,本研究观察了熊胆粉、熊去氧胆

酸对 $Ly6C^{high}$ 单核细胞表面趋化受体 CCR2 和 CX_3CR_1 的影响。流式细胞术结果显示,与空白组比较,模型组循环血 $Ly6C^{high}$ 单核细胞 CCR2 阳性百分率显著升高,而 CX_3CR_1 阳性百分率降低,差异有统计学意义($P < 0.001$)。提示,ITP 模型小鼠循环血 $Ly6C^{high}$ 单核细胞

表面趋化受体 CCR2 表达较高。干预后,与模型组比较,熊胆组、UDCA 组循环血 $Ly6C^{high}$ 单核细胞 CCR2 阳性百分率减少,而 CX_3CR_1 阳性百分率升高,差异有统

计学意义($P<0.001$),见图 2A~2C,表明熊胆粉及熊去氧胆酸可能通过 CCR2 介导的机制改变 $Ly6C^{high}$ 单核细胞在外周血的分布。



注:A. 各组 $Ly6C^{high}$ 单核细胞 CCR2 和 CX_3CR_1 表达阳性率的比较;B. 各组 $Ly6C^{high}$ 单核细胞 ($Ly6C^{++}CD43^{+}$, $Ly6C^{++}CD43^{++}$) 中 CCR2 蛋白表达水平;C. 各组 $Ly6C^{high}$ 单核细胞 ($Ly6C^{++}CD43^{+}$, $Ly6C^{++}CD43^{++}$) 中 CX_3CR_1 蛋白表达水平。与空白组比较,*** $P<0.001$;与模型组比较,### $P<0.001$ 。

图2 熊胆粉和 UDCA 对 ITP 模型小鼠外周血中 $Ly6C^{high}$ 单核细胞表面 CCR2 和 CX_3CR_1 表达的影响

3.4 熊胆粉、熊去氧胆酸对 ITP 模型小鼠外周血 MCP-1 水平的影响

为了进一步明确 CCR2 及其配体 CCL2 的相互作用,本研究还观察了熊胆粉、熊去氧胆酸对 ITP 模型小鼠外周血 MCP-1 含量的影响。ELISA 检测结果显示,模型组外周血 MCP-1 含量为(39.15 ± 3.39) pg/mL,显著高于空白组($P<0.001$)。干预后,熊胆组、UDCA 组外周血 MCP-1 含量与模型组比较差异有统计学意义($P<0.01$),见表 2。表明熊胆粉、熊去氧胆酸可降低 ITP 模型小鼠外周血 MCP-1 含量。

表 2 熊胆粉和 UDCA 对 ITP 模型小鼠循环血液中 MCP-1 水平的影响($n=10, \bar{x} \pm s, \text{pg/mL}$)		
组别	剂量 (mg/kg)	MCP-1 水平/(pg/mL)
空白组	—	15.26 ± 2.58
模型组	—	$39.15 \pm 3.39^{***}$
泼尼松组	1.13	$16.29 \pm 3.03^{###}$
熊胆组	780	$15.93 \pm 2.84^{###}$
熊去氧胆酸组	170	$17.32 \pm 3.87^{###}$

注:与空白组比较,*** $P<0.001$;与模型组比较,### $P<0.001$ 。

4 讨论

免疫稳态失衡导致的单核/巨噬细胞为主的固有

免疫反应是 ITP 的重要发病机制^[10-12]。单核细胞作为巨噬细胞母体,是一种中间细胞,生成于骨髓,循环于血液并迁移入组织,进一步分化为巨噬细胞、树突细胞等,在 ITP 发生和发展中有重要作用^[13]。在 ITP 发生时,单核细胞能够迅速募集到血小板位点,通过膜表面 Fc γ 受体识别经自身抗体 (PAIgG) 致敏的血小板,从而介导巨噬细胞对血小板的吞噬反应^[14-15];同时释放炎症因子,促进 T、B 细胞为主的适应性免疫反应,触发 ITP 发展^[16]。因此,单核细胞 Fc γ 受体失衡在 ITP 发生发展中发挥核心作用,而目前临床治疗药物包括地塞米松及血小板生成素受体激动剂均可以通过恢复 Fc γ 受体失衡,从而对 ITP 产生治疗作用^[17]。

激活性受体 Fc γ RIII (CD16) 是一种激活型 Fc γ 受体,在单核细胞功能划分中有着重要意义。CD14 是普遍表达于单核/巨噬细胞表面的一种受体,根据膜表面 CD14、CD16 和趋化受体表达情况,将人单核细胞分为 3 个亚群:CD14⁺⁺CD16⁻ (classical monocyte, 经典型单核细胞,占 80% ~ 85%), CD14⁺⁺CD16⁺ (intermediate monocyte, 中间型单核细胞,占 5%), CD14⁺CD16⁺⁺ (non-classical monocyte 非经典型单核细胞,约占 5% ~ 10%) 3 个亚型^[18-19]。同时,对小鼠的单核细胞也进行了规范命名:Ly6C⁺⁺CD43⁺ (classical monocyte, 经典型单核细胞), Ly6C⁺⁺CD43⁺⁺ (intermediate monocyte, 中间型单核细胞), Ly6C⁺CD43⁺⁺ (non-classical monocyte, 非经典型单核细胞)^[20]。本研究对 ITP 小鼠单核细胞表型的分析,可为阐明 ITP 患者单核细胞的表型特征及功能改变提供实验依据。

研究表明,血液中的趋化因子 CCL2 (MCP-1) 能通过活化 Ly6C^{high} (Ly6C⁺⁺CD43⁺、Ly6C⁺⁺CD43⁺⁺) 单核细胞表面受体 CCR2,诱导 Ly6C^{high} 单核细胞从骨髓迁移入循环血,参与炎症反应,并进一步分化为 M1 型炎症巨噬细胞,加剧吞噬炎症反应进程^[21-23]。因此,趋化因子 CCL2 及其受体 CCR2 极可能是 Ly6C^{high} 单核细胞迁移的关键因素。本课题组前期研究结果显示^[8],熊胆粉、熊去氧胆酸可调节 ITP 小鼠 Ly6C^{high} 迁移,从而延缓疾病进程。进一步发现,经豚鼠抗小鼠血小板血清 (APS) 诱发 ITP 模型小鼠后,模型组小鼠外周血 MCP-1 水平、循环血 Ly6C^{high} 单核细胞及其趋化受体 CCR2 分布显著增加。ITP 模型促进 CCL2-CCR2 介导的 Ly6C^{high} 单核细胞从骨髓向 ITP 小鼠循环血液迁移,进而影响病理过程。经熊胆粉和熊去氧胆酸治疗后,小鼠外周血中 MCP-1 水平、循环血中 Ly6C^{high} 单核细胞及其趋化受体 CCR2 的分布均有所降低。实验结果显示,熊胆及其活性成分熊去氧胆酸

能够通过调控 CCL2-CCR2 信号轴阻断 Ly6C^{high} 单核细胞的迁移,能够显著抑制免疫介导的血小板破坏过程。实验结果显示,熊胆及熊去氧胆酸通过影响 Ly6C^{high} 单核细胞迁移途径产生治疗 ITP 的效果,不仅为传统蒙医药临床应用提供了理论支持,也为研究安全有效的替代药物提供了实验基础。

参考文献:

- [1] PROVAN D, SEMPLE J W. Recent advances in the mechanisms and treatment of immune thrombocytopenia [J]. E Bio Medicine, 2022, 76: 103820.
- [2] MITITELU A, ONISĂI M C, ROĂCA A, et al. Current understanding of immune thrombocytopenia: a review of pathogenesis and treatment options [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25 (4): 2163.
- [3] GUO X J, WANG K, LIU Q H, et al. The gut-immune axis in primary immune thrombocytopenia (ITP): a paradigm shifts in treatment approaches [J]. Front Immunol, 2025, 16: 1595977.
- [4] CHEN Y F, XU Y M, LI H Y, et al. A novel anti-CD38 monoclonal antibody for treating immune thrombocytopenia [J]. N Engl J Med, 2024, 390 (23): 2178-2190.
- [5] FOGERTY A E, KUTER D J. How I treat thrombocytopenia in pregnancy [J]. Blood, 2024, 143 (9): 747-756.
- [6] 王青春, 萨茹拉, 高敬贤, 等. 免疫性血小板减少性紫癜蒙医学研究进展 [J]. 中国民族医药杂志, 2022, 28 (2): 66-68.
- [7] 韩家辉, 王青春. 蒙药熊胆现代研究进展 [J]. 中国民族医药杂志, 2024, 30 (5): 46-48.
- [8] 王青春, 关文祥, 满达, 等. 熊胆粉及熊去氧胆酸对原发免疫性血小板减少症小鼠骨髓和循环血 Ly6Chi 单核细胞及其细胞因子的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2022, 37 (2): 1154-1157.
- [9] 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.
- [10] ZHAO Y J, NI X F, XU P C, et al. Corrigendum to "Interleukin-37 reduces inflammation and impairs phagocytosis of platelets in immune thrombocytopenia (ITP)" [Cytokine 125 (2020) 154853] [J]. Cytokine, 2022, 155: 155900.
- [11] LIANG Z Y, ZHANG G Y, GAN G T, et al. Activation of the HMGB1-TLR4 pathway impacts the functionality of bone marrow mesenchymal stem cells and disrupts macrophage polarization in immune thrombocytopenia [J]. Br J Haematol, 2024, 205 (4): 1516-1531.
- [12] XU P C, JI L L, ZHAN Y X, et al. YC-4-3, a novel glycogen synthase kinase 3 β inhibitor, alleviates the endoplasmic reticulum stress of macrophages in primary immune thrombocytopenia [J]. Adv Sci, 2025, 12 (17): 2412515.
- [13] SHAO X, XU P C, JI L L, et al. Low-dose decitabine promotes M2 macrophage polarization in patients with primary immune thrombocytopenia via enhancing KLF4 binding to PPAR γ promoter [J]. Clin Transl Med, 2023, 13 (7): e1344.
- [14] MINGOT-CASTELLANO M E. Sovleplenib in immune thrombocytopenia [J]. Lancet Haematol, 2024, 11 (8): e552-e553.
- [15] GIL GONZALEZ L, WON K D, TAWHIDI Z, et al. Human Fc gamma receptor IIIA blockade inhibits platelet destruction in a humanized murine model of ITP [J]. Blood Adv, 2024, 8 (8): 1869-1879.

- [16] ZHANG Y F, YUE Y B, CHENG Y F, et al. Antigen B from *Echinococcus granulosus* regulates macrophage phagocytosis by controlling TLR4 endocytosis in immune thrombocytopenia [J]. Chem Biol Interact, 2025, 406; 111350.
- [17] LIU F Q, QU Q Y, LEI Y, et al. High dimensional proteomic mapping of bone marrow immune characteristics in immune thrombocytopenia [J]. Sci China Life Sci, 2024, 67(8): 1635–1647.
- [18] VIANELLI N, AUTERI G, BUCCISANO F, et al. Refractory primary immune thrombocytopenia (ITP): current clinical challenges and therapeutic perspectives [J]. Ann Hematol, 2022, 101(5): 963–978.
- [19] RUDER A V, WETZELS S M W, TEMMERMAN L, et al. Monocyte heterogeneity in cardiovascular disease [J]. Cardiovasc Res, 2023, 119(11): 2033–2045.
- [20] NARASIMHAN P B, MARCOVECCHIO P, HAMERS A A J, et al. Nonclassical monocytes in health and disease [J]. Annu Rev Immunol, 2019, 37: 439–456.
- [21] ZIEGLER – HEITBROCK L, ANCUTA P, CROWE S, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood [J]. Blood, 2010, 116(16): e74–e80.
- [22] XU M S, WANG Y, XIA R L, et al. Role of the CCL2 – CCR2 signaling axis in cancer: Mechanisms and therapeutic targeting [J]. Cell Prolif, 2021, 54(10): e13115.
- [23] SHEN S, LI J H, WEI Z H, et al. Immune – response gene 1 deficiency aggravates inflammation – triggered cardiac dysfunction by inducing M1 macrophage polarization and aggravating Ly6C (high) monocyte recruitment [J]. Biol Direct, 2024, 19(1): 86.

Mechanism of Bear Bile Powder and Ursodeoxycholic Acid in Regulating Ly6C^{high} Monocyte Migration in Model Mice with Immune Thrombocytopenia

HAN Jiahui¹, ZHUO Lan², LI Ruizhen¹, ZHU Xianghui², WU Siqinbilige³, DU Kun⁴, WANG Qingchun²

1. College of Mongolian Medicine and Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China;

2. The Inner Mongolia Academy of Traditional Chinese and Mongolian medicine, Hohhot 010010, China;

3. Ethnomedicine Innovation Centre of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China; 4. The Institute of Traditional Chinese Medicine, Beijing Chinese Medicine Hospital, Capital Medical University, Beijing 100010, China

Abstract Objective: To observe the effect of Bear bile and UDCA on circulating blood Ly6C^{high} monocyte chemotaxis receptor CCR2 and its ligand CCL2 (MCP – 1) in model mice with Immune Thrombocytopenia (ITP), and explore the possible mechanism of regulating Ly6C^{high} monocyte migration and reference studies on bear bile and its replacements in ITP management. Methods: Following established methods, an ITP model was induced via immunization in 50 BALB/c mice, randomly allocated into five groups: normal control, model control, prednisone treatment, bear bile treatment, and UDCA treatment, from the 6th day of making model, mice in the each group was administered 0.4 mL/d volume of corresponding drug by irrigation treatment. From the 6 h, 7th day, 15th day, automatic blood cytometer was used to dynamic detect platelet count. after treatment 10 day, Flow cytometry was used to detect the changes of the Ly6C^{high} monocyte in circulating blood, Enzyme – linked immunosorbent Assay was used to detect the levels of serum MCP – 1 (monocyte chemotactic protein – 1). Results: After the 6 hour of making model, the counts of platelet decreased obviously in all group, reaching the lowest point on the 7th day, and remained at a relatively low level until the 15th day. There was a statistically significant difference compared to the normal group ($P < 0.05$). After treatment, the platelet counts of bear bile, prednisone and UDCA group increased obviously ($P < 0.01$). Flow cytometry results showed that compared with the model group, the positive rate of circulating Ly6C^{high} monocytes and its surface chemokine receptor CCR2 in bear bile, UDCA and prednesone groups decreased ($P < 0.01$, $P < 0.001$), while CX₃CR₁ expression increased ($P < 0.001$). Enzyme – linked immunosorbent Assay results showed that compared with the model group, the levels of MCP – 1 in bear bile, UDCA and prednesone groups decreased ($P < 0.001$). Conclusion: The Bear bile and UDCA can downregulate the expression of CCR2 by reducing the level of MCP – 1 in circulating blood, thus governs CCL2 – CCR2 mediated Ly6C^{high} monocyte emigration, reduce the Ly6C^{high} monocytes in the circulating blood, this represents a crucial mechanism driving Ly6C^{high} monocyte accumulation during ITP progression and worsening.

Key words Bear bile powder; Ursodeoxycholic acid; Immune thrombocytopenia (ITP); CCL2 – CCR2; Ly6C^{high} monocyte migration mechanism