

IL-17 单克隆抗体对过敏性紫癜小鼠模型的保护作用及机制

贵琳¹, 吴晓林¹, 朱松柏¹, 郑荣浩¹, 舒岚¹, 朱宏飞^{2, 3}, 王治涛⁴, 王勇⁵

(1. 湖北省妇幼保健院 儿童肾脏风湿免疫科, 武汉 430000; 2. 湖北省中医院 麻醉科, 武汉 430000; 3. 湖北省中医药研究院, 武汉 430000; 4. 武汉市武昌医院 儿科, 武汉 430000; 5. 武汉大学 动物实验中心, 武汉 430000)

摘要:为探讨 IL-17 单克隆抗体(monoclonal antibody, mAb)对过敏性紫癜(Henoch-Schonlein purpura, HSP)小鼠模型的保护作用及机制, 50 只 C57BL/6 小鼠被随机分为正常对照组、HSP 模型组、同型对照组、IL-17 mAb 组以及西咪替丁阳性对照组, 每组 10 只。除正常对照组外, 其余 4 组小鼠均进行为期 14 周的 HSP 模型构建, 通过检测血清循环免疫复合物(circulating immune complex, CIC)水平验证模型是否构建成功。在建模成功后对各组小鼠进行为期 3 周的药物干预。干预结束后, 收集各组小鼠 24 h 尿液并进行尿蛋白含量检测; 碳粒廓清实验检测小鼠单核巨噬细胞系统(mononuclear phagocytic system, MPS)功能; ELISA 检测小鼠血清中分泌型 IgE(Secretory-IgE, S-IgE)、IL-17、Th1 相关细胞因子 IFN- γ 以及 Th2 相关细胞因子 IL-4 水平; Western blotting 检测各组小鼠皮肤和肾脏中 IL-17 蛋白表达量; HE 染色观察小鼠皮肤和肾脏的病理学变化。研究发现, 与模型组比较, IL-17 mAb 能显著降低 HSP 小鼠尿蛋白含量($P < 0.01$); 增强 HSP 小鼠 MPS 功能(吞噬指数 K 及吞噬系数 α 均有 $P < 0.01$); 降低血清 S-IgE、IL-17、IL-4 水平(均 $P < 0.01$); 增加血清 IFN- γ 水平及 IFN- γ /IL-4 比值(均 $P < 0.01$)。此外, IL-17 mAb 还能显著改善 HSP 小鼠皮肤及肾脏的病理学变化, 降低 IL-17 表达量($P < 0.01$)。以上结果提示 IL-17 mAb 对 HSP 小鼠具有显著的保护作用, 其作用机制可能与降低 IL-17 表达进而影响其调节 Th1/Th2 免疫平衡有关。

关键词:IL-17 单克隆抗体; 过敏性紫癜; 循环免疫复合物; 单核巨噬细胞系统; Th1/Th2 平衡

中图分类号:R392.8

文献标志码:A

文章编号:1001-2478(2019)02-0115-05

过敏性紫癜(Henoch-Schonlein purpura, HSP), 又称亨诺-许兰综合征, 是多种原因导致的血管炎症反应, 主要引起血管壁的通透性增加, 致使血液渗入皮肤或黏膜^[1]。HSP 临床表现主要为皮肤青紫、出现淤斑、关节痛、腹痛, 严重者可累及肾脏, 导致肾损伤^[2]。HSP 发病年龄以学龄期儿童常见, 且男性多于女性, 有研究报道其发病率高达 14~22 例/10 万^[3]。不同的诊断标准研究^[4]显示, 在 HSP 患者中, 累及肾脏导致肾病综合征的患者占(20~100)%, 长期迁延将发展为终末期肾病, 严重威胁患者的身心健康。

目前, HSP 的发病机制尚未完全阐明, 但自

身免疫应答介导的免疫功能失衡被认为是其主要病理机制之一, 且多项免疫学指标被证明在 HSP 的发生发展中变化显著^[5]。HSP 并发症多, 复发率高, 病程迁延, 患病率逐年升高, 现代医学无法对其有效治疗。目前鲜有关于本病动物模型的文献报道, 有关 HSP 病因、发病机制的探索、治疗方法的评价和新药的研发在很大程度上受到限制。因此, 研究在原基础上再次使用 HSP 小鼠模型, 并采用 IL-17 单克隆抗体(monoclonal antibody, mAb)进行治疗, 从单核巨噬细胞系统(mononuclear phagocytic system, MPS)功能、炎性因子水平以及病理学变化等多角度评估其对 HSP 小鼠的保护作用, 并探究相关作用机制, 为 HSP 的临床免疫治疗提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 本研究中的所有动物实验均按照国家相关法律及动物伦理学要求在武汉大学动物实验中心进行。其中 50 只健康成年雄性 C57BL/6 小鼠(7~9 周龄、体质量 20~25 g)饲养于标准实验室条件:置于光/暗周期为 12/12 h(光照时间 7:00~

收稿日期:2018-08-13

基金项目:湖北省卫生计生科研基金资助项目(WJ2017M132);湖北省妇幼保健院科研课题项目(2016-07);湖北省科技厅科技条件资源开发项目(2015BCE099);武汉市卫生计生委 2017 年度临床医学科研项目(WZ17Z09)

作者简介:贵琳(1973-), 女, 本科, 副主任医师, 主要从事儿童肾脏风湿免疫类疾病临床及基础研究

通信作者:王治涛(E-mail: 348677627@qq.com); 王勇(E-mail: 15002716680@163.com)

19:00), 温度 22 ± 2 °C, 湿度 $(52 \pm 2)\%$, 自由饮食饮水。

1.2 主要试剂 麦胶蛋白购自东京化成工业株式会社, 用时配制成 0.1% 的麦胶蛋白、6 mmol/L 的 HCl 酸化水; 印度墨汁购自北京市西中化工厂。兔抗小鼠 IL-17 mAb 及同型对照抗体兔 IgG2A 购自 R&D Systems; 西咪替丁注射液(阳性对照药物)0.2 g/(2 mL·支)购自国药集团容生制药有限公司, 用时以 0.9% 氯化钠注射液配制成 5% 的溶液。尿蛋白定量测试盒(CBB 法)购自南京建成生物工程研究所; 小鼠 ELISA 检测试剂盒: S-IgE、IL-17、IFN- γ 和 IL-4 均购自 Bio-swamp 公司; BCA 法蛋白定量测定试剂盒及全蛋白提取试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 兔抗小鼠 GAPDH 抗体购自 GST 公司; 山羊抗兔 IgG 二抗购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.3 HSP 小鼠模型的构建 所有小鼠适应性饲养 1 周后开始实验。50 只小鼠被随机分为 5 组: 正常对照组、HSP 模型组、同型对照组、IL-17 mAb 组以及西咪替丁阳性对照组, 每组 10 只。正常对照组小鼠给予 6 mmol/L 的 HCl 酸化水灌胃(不含麦胶蛋白), 0.5 mL/只, 隔日灌胃, 连续至 14 周末。其余 4 组参照赵志华等^[6]的 HSP 动物造模法建模。14 周末, 随机采集每组 3 只小鼠的静脉血 150 μ L, 分离血清, 采用聚乙二醇 6000 沉淀比浊法检测循环免疫复合物(circulating immune complex, CIC)水平, 验证 HSP 造模是否成功。

1.4 药物干预 在模型构建成功后对各治疗组小鼠进行为期 3 周的对应药物干预。同型对照组小鼠腹腔注射 100 μ g/(kg·d) 的非特异性兔 IgG2A; IL-17 mAb 组小鼠腹腔注射 100 μ g/(kg·d) 的 IL-17 mAb; 阳性对照组小鼠腹腔注射西咪替丁注射液 30 mg/(kg·d); 而正常对照组及模型组小鼠均以等体积生理盐水(20 mL/kg)腹腔注射。药物干预 3 周后, 对各组小鼠进行相应的取材检测。

1.5 尿蛋白含量检测 干预结束后, 代谢笼收集各组小鼠 24 h 尿液, 统计尿量并采用尿蛋白定量测试盒(CBB 法)进行尿蛋白定量, 尿蛋白浓度(mg/L) = (测定 D 值 - 空白 D 值) / (标准 D 值 - 空白 D 值) \times 标准品浓度(563 mg/L)。

1.6 小鼠 MPS 功能检测 干预结束后, 采用印度墨汁小鼠碳粒廓清实验^[7]对各组小鼠 MPS 功能进行检测。实验步骤: 向小鼠尾静脉注射印度墨汁(用

生理盐水按 1:10 稀释)0.05 mL/10 g 体质量, 于注入墨汁后 2 min(t_1)、12 min(t_2)分别从眼眶后静脉丛取血 0.02 mL, 立即溶于 2 mL 的 0.1% Na_2CO_3 溶液中摇匀。以 0.1% 的 Na_2CO_3 溶液为对照, 作为比色调零的基准。于分光光度计 640 nm 处检测, 分别记录 2 个不同时间点样本的光密度 $D(640 \text{ nm})$ 。实验结束后, 麻醉小鼠并称取体质量, 收集静脉血、皮肤及肾脏组织保存待检, 并取小鼠肝脏、脾脏称重, 计算吞噬指数 K 和吞噬系数 α 。其中 $K = (\lg D_1 - \lg D_2) / (t_2 - t_1)$; $\alpha = K^{1/3} \times$ 体质量 / (肝重 + 脾重)。

1.7 小鼠血清 S-IgE、IL-17、IFN- γ 和 IL-4 水平检测

小鼠麻醉后收集静脉血, 3 000 r/min 离心 15 min, 分离血清。然后用 ELISA 检测试剂盒分别检测各组小鼠血清中 S-IgE 水平和细胞因子 IL-17、IFN- γ 与 IL-4 的表达情况。

1.8 小鼠皮肤和肾脏中 IL-17 蛋白表达量检测

采用全蛋白提取试剂盒对各组小鼠皮肤及肾脏组织进行蛋白质提取; 用 BCA 蛋白浓度检测试剂盒对所提蛋白质进行浓度检测。取 20 μ g 蛋白质和 4 μ L $2 \times$ SDS 上样缓冲液混合均匀, 100 °C 变性 10 min; 上样, SDS-PAGE 分离后转至 PVDF 膜; 用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h; PBS 洗膜; 洗后分别加入一抗(IL-17, 1:1 000; GAPDH, 1:1 000)于 4 °C 孵育过夜; PBS 洗膜; 加入羊抗兔 IgG 二抗(1:5 000), 室温孵育 30 min; PBS 洗膜; 用 ECL 化学发光法显色。以 GAPDH 为内参蛋白, 然后采用 Quantity One 图像分析软件进行灰度比分析。

1.9 小鼠皮肤和肾脏病理学变化检测 取保存的小鼠皮肤及肾脏样本, 依次经: 脱水、浸蜡、包埋、切片(4~5 μ m); 展片、烤片; HE 染色。最终在显微镜下拍照、记录并分析样本相关部位病理学变化情况。

1.10 统计学处理 所有数据均采用 SPSS 19.0 进行分析处理, 定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组数据间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 Tukey 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 模型构建及验证 造模结束后(药物干预前)检测血清 CIC 水平以验证 HSP 模型是否构建成功。血清 CIC 水平检测结果显示(表 1), 与正常对

照组比较,其余4组(HSP造模组)小鼠血清CIC水平显著升高(均 $P < 0.01$),提示HSP模型构建成功。

表1 各组小鼠血清CIC水平变化

组别	样本数(n)	CIC
正常对照组	3	0.69±0.18
HSP模型组	3	1.24±0.31**
同型对照组	3	1.21±0.33**
IL-17 mAb组	3	1.19±0.27**
西咪替丁组	3	1.26±0.36**

注:与正常对照组比较, ** $P < 0.01$

2.2 IL-17 mAb降低HSP小鼠24 h尿蛋白含量

小鼠尿液检测结果显示(表2),干预结束后各组小

表2 各组小鼠24 h尿蛋白含量变化

组别	样本数(n)	24 h尿量(mL)	24 h尿蛋白含量(mg/L)
正常对照组	10	1.84±0.31	89.83±28.89
HSP模型组	10	1.79±0.29	410.25±52.94**
同型对照组	10	1.72±0.37	421.39±48.17
IL-17 mAb组	10	1.83±0.26	246.85±26.13#&&
西咪替丁组	10	1.80±0.33	262.32±32.04# #

注:与正常对照组比较, ** $P < 0.01$;与HSP模型组比较, # # $P < 0.01$;与同型对照组比较, && $P < 0.01$

表3 各组小鼠MPS功能变化

组别	样本数(n)	吞噬指数K	吞噬系数 α
正常对照组	10	0.033±0.018	4.89±1.54
HSP模型组	10	0.015±0.013**	1.74±0.67**
同型对照组	10	0.016±0.013	1.81±0.72
IL-17 mAb组	10	0.027±0.017#&&	3.79±1.36#&&
西咪替丁组	10	0.026±0.018# #	3.64±1.03# #

注:与正常对照组比较, ** $P < 0.01$;与HSP模型组比较, # # $P < 0.01$;与同型对照组比较, && $P < 0.01$

2.4 IL-17 mAb抑制HSP小鼠S-IgE、IL-17、IL-4分泌,促进IFN- γ 分泌

小鼠血清ELISA检测结果显示(表4),与正常对照组比较,HSP模型组小鼠血清S-IgE、IL-17、IL-4分泌水平显著升高(均 $P < 0.01$),而IFN- γ 水平显著降低($P < 0.01$);与HSP模型组和同型对照组比较,IL-17 mAb干预显著抑制了小鼠血清S-IgE、IL-17、IL-4的分泌(均

鼠24 h尿量无显著差异;而与正常对照组比较,HSP模型组小鼠24 h尿蛋白含量显著增加($P < 0.01$);与HSP模型组和同型对照组比较,IL-17 mAb组小鼠24 h尿蛋白含量均显著降低(均 $P < 0.01$)。

2.3 IL-17 mAb增强HSP小鼠MPS功能

小鼠MPS功能检测结果显示(表3),与正常对照组比较,HSP模型组小鼠吞噬指数K及吞噬系数 α 均显著降低(均 $P < 0.01$),说明小鼠MPS功能减弱;与HSP模型组和同型对照组比较,IL-17 mAb组小鼠吞噬指数K及吞噬系数 α 均显著增加(均 $P < 0.01$),说明小鼠MPS功能增强。

$P < 0.01$),而促进了IFN- γ 的分泌($P < 0.01$)。IFN- γ /IL-4的比值一定程度上反映了Th1/Th2的平衡关系。与正常对照组比较,HSP模型组小鼠血清IFN- γ /IL-4比值显著降低($P < 0.01$),表现为Th1/Th2失衡;而与HSP模型组和同型对照组比较,IL-17 mAb组IFN- γ /IL-4比值显著升高(均 $P < 0.01$),表现为Th1/Th2趋于平衡。

表4 各组小鼠血清S-IgE及细胞因子水平变化

组别	样本(n)	S-IgE(μ g/mL)	IL-17(pg/mL)	IL-4(pg/mL)	IFN- γ (pg/mL)	IFN- γ /IL-4比值
正常对照组	10	1.69±0.23	50.16±9.46	69.21±14.38	226.78±50.19	3.21±0.45
HSP模型组	10	5.16±0.75**	199.47±38.42**	241.36±60.39**	106.44±26.57**	0.48±0.12**
同型对照组	10	4.89±0.59	186.21±36.89	224.34±52.71	119.25±31.25	0.51±0.16
IL-17 mAb组	10	2.71±0.31#&&	87.36±18.74#&&	113.39±30.24#&&	187.42±48.17#&&	1.56±0.31#&&
西咪替丁组	10	2.82±0.36# #	100.28±21.01# #	122.98±39.12# #	189.35±39.56# #	1.51±0.33# #

注:与正常对照组比较, ** $P < 0.01$;与HSP模型组比较, # # $P < 0.01$;与同型对照组比较, && $P < 0.01$

2.5 IL-17 mAb 抑制 HSP 小鼠 IL-17 蛋白表达 小鼠皮肤及肾脏组织 Western blotting 检测结果显示 (图 1), 与正常对照组比较, HSP 模型组小鼠皮肤及肾脏组织中 IL-17 蛋白水平显著升高 (均 $P < 0.01$); 与 HSP 模型组和同型对照组比较, IL-17 mAb 干预显著抑制了小鼠皮肤及肾脏组织中 IL-17 蛋白的表达 (均 $P < 0.01$)。

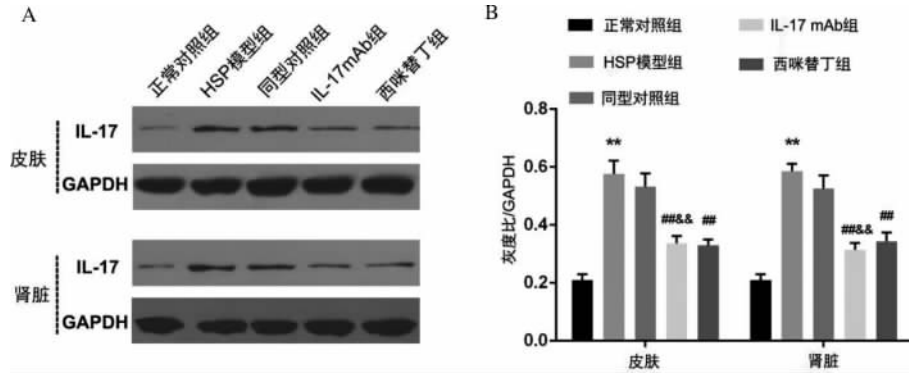


图 1 各组小鼠皮肤及肾脏组织 IL-17 蛋白表达水平

注:A. SDS-PAGE图; B. 灰度比统计结果。与正常对照组比较, $**P < 0.01$; 与 HSP 模型组比较, $##P < 0.01$; 与同型对照组比较, $&&P < 0.01$

2.6 IL-17 mAb 改善 HSP 小鼠组织病理学变化 HE 染色结果显示, 正常对照组小鼠皮肤及肾脏组织均未出现明显的病理学变化; HSP 模型组及同型对照组小鼠皮肤主要表现为水肿, 皮下出血, 血管扩张、充血甚至出血, 并伴随严重的炎症细胞浸润; 而 HSP 模型组及同型对照组小鼠肾脏主要表现为肾小球囊腔积液明显, 肾小球系膜明显增生, 肾小管肿胀以及典型的炎症细胞浸润; 而相对于 HSP 模型组及同型对照组小鼠, IL-17 mAb 及西咪替丁阳性治疗组小鼠皮肤及肾脏组织炎症细胞浸润状况明显减轻, 皮肤水肿及出血减少, 肾小球囊腔基本无积液, 肾小球系膜增生不明显。(图 2)

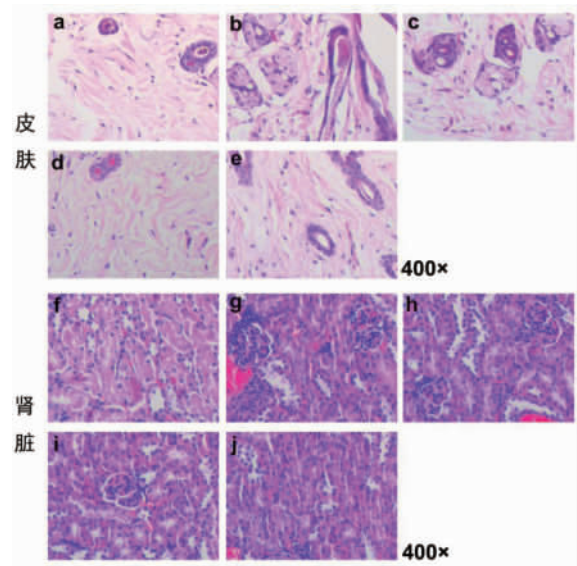


图 2 小鼠皮肤及肾脏组织病理学变化(HE 染色)

注:a/f 为正常对照组; b/g 为 HSP 模型组; c/h 为同型对照组; d/i 为 IL-17 mAb 组; e/j 为西咪替丁组

3 讨论

HSP 是由多种原因导致的血管性炎症反应, 多发于学龄儿童, 严重影响着患者的学业及生活质量^[8]。有研究者在探究临床 HSP 患儿的发病机制时发现, 患儿血清 IL-17 的水平显著高于健康体检儿童; 且对于发展为肾脏受累的 HSP 肾炎组患儿而言, 其在病初时血清 IL-17 水平同样高于同期非肾脏受累的 HSP 患儿, 提示 IL-17 可能参与 HSP 以及 HSP 肾炎的发病过程^[9]。本研究采用 IL-17 mAb 对 HSP 小鼠模型进行干预, 探究其治疗效果及机制。

从免疫学角度而言, HSP 又可以定义为一种主要由 IgA 免疫复合物介导的系统性血管炎, 主要表现为血管壁脆性增加, 通透性增加^[10-11]。从病

理改变和免疫学特征上看, IgA 肾病与 HSP 肾炎具有一定的相似性, 抗麦胶蛋白 IgG 不仅是 IgA 肾病的抗体, 同样也是 HSP 的重要抗体。因此, 本研究参照赵志华等^[6]的 HSP 造模方法, 采用印度墨汁封闭小鼠 MPS, 另持续用抗原刺激免疫系统, 小鼠血清 CIC 水平显著升高, 提示建模成功。持续 14 周的 HSP 造模结束后, 模型组小鼠尿蛋白含量显著高于对照组, 提示长期的抗原刺激致使 HSP 小鼠不仅表现出典型的皮肤病变, 更是累及

肾脏, 引发 HSP 肾炎, 且肾组织 HE 切片染色结果同样说明了这一点。MPS 功能改变是导致 HSP 发生的内源性因素。本研究发现, HSP 小鼠的 MPS 功能较正常对照组显著降低, 主要表现为吞噬指数及吞噬系数的减小。刘建宏等^[12]构建的 HSP 小鼠模型同样表现出 MPS 功能的下降(吞噬系数减小)以及血清 CIC 含量的增加, 且经中药芪元冲剂干预后, HSP 症状显著改善。过往对 HSP 致病机制的研究主要侧重于 IgA 和 IgG 形成的抗原抗体复合物, 但近几年研究证明 IgE 介导的 I 型速发型超敏反应同样参与了 HSP 的发生发展过程^[13]。而本研究发现, HSP 小鼠模型经 IL-17 mAb 干预后 MPS 功能显著提升, 血清过敏反应标志物之一的 S-IgE 水平显著下降, 提示 IL-17 mAb 对 HSP 小鼠的过敏性症状有显著改善作用。

正常生理状态下, 人体内辅助性 T 淋巴细胞亚群 Th1/Th2 在数量和功能上处于平衡状态, 维持着机体的正常免疫功能。当 Th 稳态被破坏, 向 Th1 或 Th2 方向转变, 即发生 Th1/Th2 免疫偏移时, 机体免疫状态失衡, 进而引发一系列疾病^[14]。其中 HSP 就被证明与 Th1/Th2 偏移导致的免疫调节失衡有关^[15]。常红等^[16]在临床 HSP 患儿的相关研究中发现, HSP 组患儿血清 IL-4、IL-6 水平显著高于正常对照组, IFN- γ 水平显著低于正常对照组, IFN- γ /IL-4 比值显著低于对照组, 提示 HSP 患儿存在 T 淋巴细胞亚群失调、功能紊乱和 Th1/Th2 失衡。而本研究通过动物模型同样发现 HSP 小鼠存在 Th1/Th2 失衡, 主要表现为血清 IL-4 水平升高及 IFN- γ 水平降低, 且 IL-17 mAb 靶向降低了 HSP 小鼠内源性 IL-17 水平, 抑制了血清 IL-4 水平, 促进了机体 IFN- γ 的分泌, 提示 IL-17 mAb 对 HSP 小鼠的治疗可能与促进 Th1/Th2 平衡密切相关。

综上所述, IL-17 mAb 能显著降低 HSP 小鼠的尿蛋白含量, 提升 MPS 功能, 降低血清过敏反应标志物 S-IgE 水平, 改善皮肤及肾脏组织的病理学变化。其作用机制可能与 IL-17 mAb 靶向降低 IL-17 表达水平进而促进 Th1/Th2 平衡密切相关。本研究仅从动物水平验证及阐述了 IL-17 mAb 治疗 HSP 小鼠的有效性及其潜在机制, 而其对临床患者的治疗效果如何仍需进一步深入研究。

参考文献

[1] Mao YY, Yin L, Huang H, *et al.* Henoch-Schonlein pur-

pura in 535 Chinese children: Clinical features and risk factors for renal involvement[J]. *J Int Med Res.* 2014, 42(4): 1043-1049.

[2] Saulsbury FT. Clinical update: Henoch-Schonlein purpura[J]. *Lancet.* 2007, 369(9566): 976-978.

[3] Gardner-Medwin JM, Dolezalova P, Cummins C, *et al.* Incidence of Henoch-Schonlein purpura, kawasaki disease, and rare vasculitides in children of different ethnic origins[J]. *Lancet.* 2002, 360(9341): 1197-1202.

[4] Mills JA, Michel B, Bloch DA, *et al.* The American college of rheumatology 1990 criteria for the classification of Henoch-Schonlein purpura[J]. *Arthritis Rheum.* 1990, 33(8): 1114-1121.

[5] 陈朋, 肖凤丽. 过敏性紫癜病因及发病机制研究进展[J]. *实用皮肤病学杂志.* 2011, 4(2): 93-95.

[6] 赵志华, 范惠霞, 史红鱼. 中药血宁对过敏性紫癜模型小鼠药效学研究[J]. *中国药物与临床.* 2013, 13(8): 1054-1055.

[7] 何树梅, 门连超, 袁东亚, 等. 藏药短管兔耳草醇提取物对免疫抑制小鼠免疫功能的影响[J]. *现代免疫学.* 2018, 38(1): 59-65.

[8] Trnka P. Henoch-Schonlein purpura in children[J]. *J Paediatr Child H.* 2013, 49(12): 995-1003.

[9] 徐丽娟, 刘玲, 杨艳君, 等. 过敏性紫癜患儿血清 IL-17 与 MMP-9 的变化及意义[J]. *国际儿科学杂志.* 2014, (4): 431-433.

[10] Kamei K, Ogura M, Sato M, *et al.* Evolution of IgA nephropathy into anaphylactoid purpura in six cases—further evidence that IgA nephropathy and Henoch-Schonlein purpura nephritis share common pathogenesis[J]. *Pediatr Nephrol.* 2016, 31(5): 779-785.

[11] Purevdorj N, Mu Y, Gu Y, *et al.* Clinical significance of the serum biomarker index detection in children with Henoch-Schonlein purpura[J]. *Clin Biochem.* 2018, 52: 167-170.

[12] 刘建宏, 弓彦飞, 门九章, 等. 芪元冲剂对过敏性紫癜小鼠网状内皮功能及免疫复合物的影响[J]. *辽宁中医杂志.* 2012, (9): 1873-1874.

[13] 李沫民, 柳旒, 张森, 等. 过敏性紫癜患儿血清中期因子变化的临床意义[J]. *中国实验血液学杂志.* 2017, 25(1): 181-185.

[14] Hirahara K, Nakayama T. CD4⁺ T-cell subsets in inflammatory diseases: Beyond the Th1/Th2 paradigm[J]. *Int Immunol.* 2016, 28(4): 163-171.

[15] Li YY, Li CR, Wang GB, *et al.* Investigation of the change in CD4⁺ T cell subset in children with Henoch-Schonlein purpura[J]. *Rheumatol Int.* 2012, 32(12): 3785-3792.

[16] 常红, 张秋业, 程娜, 等. 过敏性紫癜患儿外周血单个核细胞 TLR2、TLR4 表达及其与 Th1 和 Th2 型免疫应答相关性观察[J]. *中华微生物学和免疫学杂志.* 2013, (11): 839-844.

(下转第 163 页)