

1,25-二羟维生素 D₃ 对免疫性血小板减少症模型小鼠的治疗作用

顾悦, 刘莉侠, 杨明珍, 曾庆曙, 黄震琪, 吴炜, 安福润

摘要 目的 观察并分析 1,25-二羟维生素 D₃ 对免疫性血小板减少症(ITP)模型小鼠的治疗作用。方法 将 44 只 BALB/c 小鼠分为正常对照组、模型组和 1,25-二羟维生素 D₃ 治疗组。模型组经腹腔给予豚鼠抗小鼠血小板血清(GP-APS), 治疗组在模型组的基础上经尾静脉注射给予 100 ng/d 的 1,25-二羟维生素 D₃, 正常对照组均给予相同体积的生理盐水经腹腔及尾静脉注射给药。在每次给药后 24 h 记录体重并采血, 测量血小板计数, 评价出血倾向。2 周后处死小鼠并解剖, 取骨髓涂片, 镜下计数巨核细胞。从多方面评估 1,25-二羟维生素 D₃ 对模型小鼠的治疗作用。结果 注射第 10 天开始, 1,25-二羟维生素 D₃ 治疗组小鼠进食量开始明显增加, 精神和反应逐渐恢复; 体重、血小板数较模型组

明显上升 ($P < 0.05$); 出血倾向较模型组明显降低 ($P < 0.05$); 产板巨核细胞数较模型组高, 低于正常对照组, 而巨核细胞数较模型组低, 高于正常对照组, 差异有统计学意义。结论 1,25-二羟维生素 D₃ 对模型小鼠在一般情况的改善、体重及血小板数的上升、出血倾向的降低和促进骨髓血小板生成等方面表现出一定影响。

关键词 免疫性血小板减少症; 动物模型; 1,25-二羟维生素 D₃

中图分类号 R 558+.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)11-1574-05

1,25-二羟维生素 D₃ [1,25-dihydroxyvitamin D₃, 1,25-(OH)₂D₃] 是维生素 D 的生物活性形式, 近年来发现其既可以作为先天性和获得性免疫应答的调节剂, 同时还参与多种免疫调节活动, 并调控细胞增殖分化^[1]。树突状细胞(dendritic cell, DC)是一种重要的抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APC)。相关实验证实, 1,25-(OH)₂D₃ 不仅能抑制

2015-07-28 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 120805MH154)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院血液科, 合肥 230022

作者简介: 顾悦, 女, 硕士研究生;

杨明珍, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: yangmz89@163.com.cn

Effect and mechanism of miRNA-4465 overexpression in the migration and invasion of breast cancer MDA-MB-231 cells

Luo Guangtao, Wang Benzong

(Dept of Breast Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the effect of overexpression of miRNA-4465 on invasion and metastasis of breast cancer MDA-MB-231 cells and its mechanism. **Methods** MiRNA-4465 minics was transfected into the MDA-MB-231 cells, and real-time PCR was used to detect the expression of miRNA-4465. Transwell assay was used to investigate the migration and invasion capability of cells after being transfected. Bioinformatics analysis were performed to predict the potential targets of miRNA-4465, and finally, luciferase reporter plasmids assay and western blot was used to confirm the potential target of miRNA-4465. **Results** Comparing with negative control group, the expression of miRNA-4465 in miRNA-4465 minics group was increased significantly. Transwell migration assay showed that migration capability of cells in miRNA-4465 minics group was decreased ($P = 0.001$); transwell invasion assay showed that invasion capability of cells in miRNA-4465 minics group was decreased ($P = 0.010$). Luciferase reporter plasmids assay showed that comparing with the negative control + psiCHECK2-EZH2 3' UTR (wild type), the fluorescence activity of miRNA-4465 minics + psiCHECK2-EZH2 3' UTR (wild type) was decreased by 66% ($P = 0.001$). Moreover, comparing with the negative control group, the expression of EZH2 protein was decreased after transfecting miRNA-4465 minics into MDA-MB-231 cells. **Conclusion** MiRNA-4465 can suppress the invasion and metastasis of breast cancer MDA-MB-231 cells, which may be related to the regulation of EZH2.

Key words miRNA-4465; EZH2; breast cancer; metastasis

人外周血来源 DC 的成熟和分化,对小鼠骨髓来源 DC 也有着类似作用^[2]。

免疫性血小板减少症(imune thrombocytopenia, ITP)是自身免疫性疾病的一种,其发病原因之一系体内产生针对自身血小板的特异性抗体,导致其破坏增多,从而导致外周血血小板减少^[3-4]。该研究通过静脉给予模型小鼠 $1,25-(OH)_2D_3$,评估血小板变化并观察其治疗效果,为临床上应用其治疗 ITP 等自身免疫性疾病提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器 $1,25-(OH)_2D_3$ 、完全弗氏佐剂、不完全弗氏佐剂(美国 Sigma 公司) 红细胞裂解液(Solarbio 公司)。玻璃毛细管(上海辰谊科学仪器公司) 倒置显微镜(日本 OLYMPUS 公司) 血细胞计数板(上海求精生化仪器公司) 多孔离心机(北京京立公司) 电子分析天平(上海精密科学仪器公司)。

1.2 实验动物 6~8 周龄 SPF 级 BALB/c 小鼠 44 只 雌雄各半,18~22 g,由安徽医科大学实验动物中心提供,饲养和实验均在本校 SPF 级动物实验室内进行,室温 18~22 °C,湿度 35%~50%,分笼饲养,饮水和摄食自由;5 月龄清洁级豚鼠 6 只,480~600 g,雌雄不限,饲养和实验均在清洁级动物实验室内进行。

1.3 方法

1.3.1 抗血清的制备 制备抗原(即小鼠血小板):用摘眼球取血法收集小鼠外周血至 EDTA- Na_2 抗凝离心管,800 r/min 离心 6 min,将上层及两层交界处液体小心吸出,移入另一不含抗凝剂的试管中,轻轻摇匀后即得到富含血小板的血浆(platelet-rich plasma, PRP)。洗涤 3 次后,加生理盐水调整血小板浓度为 $1 \times 10^9 \sim 2 \times 10^9/L$ 。取最终得到的血小板,分别与等量完全弗氏佐剂和不完全弗氏佐剂充分混合成油包水状。

制备豚鼠抗小鼠血小板血清(guinea pig anti-mouse platelet serum, GP-APS):取与完全弗氏佐剂混合的抗原,于第 0 周注射豚鼠背部、腹股沟及后足掌的皮下,每次至少 4 点,每点至少 1 ml。取与不完全弗氏佐剂混合的抗原,分别于第 1、2、4 周注射于豚鼠背部、腹股沟及后足掌皮下,每次至少 4 点。第 5 周用乙醚麻醉豚鼠后,从心脏取不抗凝全血,3 000 r/min 离心 10 min,将上清液移入干净的离心管,该上清液即为 GP-APS,贮存于 -20 °C 冰箱。

1.3.2 实验血清稀释倍数的筛选 取 14 只小鼠随机分为 7 组,每组 2 只。将 GP-APS 按 1:1、1:2、1:4、1:8、1:16、1:32 稀释,分别给予第 1~6 组小鼠,经腹腔注射 200 μl /只;第 7 组小鼠为正常对照组,腹腔注射等量的生理盐水。观察血小板下降幅度和持续下降时间,评估并选取合适的血清稀释倍数。

1.3.3 动物分组与模型建立 另取 30 只小鼠,将其随机分成 3 组: $1,25-(OH)_2D_3$ 治疗组、模型组和正常对照组,每组 10 只,雌雄各半。注射 APS 前均记为第 0 天,第 1 次注射 APS 当天记为第 1 天。 $1,25-(OH)_2D_3$ 治疗组和模型组均分别于第 1、3、5、7、11、13 天依照 100 $\mu l/20 g$ 的容积质量比给予小鼠腹腔注射 1:4 稀释的 GP-APS,使小鼠的血小板慢性持续性减少;而正常对照组则在同一时间点腹腔注射等量的生理盐水。并于注射 APS 第 4 天开始, $1,25-(OH)_2D_3$ 治疗组每天予以尾静脉注射 100 ng $1,25-(OH)_2D_3$,模型组在同一时间点予以尾静脉注射等量的生理盐水。

1.3.4 血小板计数、体重和出血倾向 于第 2、4、6、8、10、12、14 天分别从小鼠眼眶后静脉丛取血 20 μl ,加入盛有 980 μl 红细胞裂解液的枸橼酸钠抗凝的试管内,充分混匀后,使用血细胞计数板计量血小板数,同时用电子天平称重小鼠,观察并记录体重变化及有无出血点和出血倾向(评分标准:注射处及皮下出血点 <3 个 +1、>3 个 +2、口鼻出血 +1)。

1.3.5 骨髓涂片巨核细胞观察 实验结束后处死小鼠,迅速剥离胸骨,取胸骨骨髓用 20 μl 小牛血清混匀迅速涂片并风干,瑞氏染色后在光学显微镜下观察整张涂片,选择染色良好部位,分别计数每张涂片 3 cm^2 的巨核细胞总数以及产板巨核细胞数。

1.4 统计学处理 实验数据采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析,结果使用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料选用方差分析,计算 F 值,组间两两比较选用 LSD 方法,计数资料使用 χ^2 检验,计算 χ^2 值。

2 结果

2.1 GP-APS 效价的评估 结果显示所有稀释比例的 APS 均可以使小鼠血小板数有不同程度的降低($F=21$),降低程度与稀释倍数呈负相关,但是 1:16、1:32 两个浓度稀释的 APS 组小鼠血小板数下降时间最多只能维持 24 h,后迅速恢复正常。而 1:8 浓度稀释的 APS 亦无明显的抑制作用,小鼠血小板下降维持 36 h,后逐渐恢复正常。综合各方面因素,可见 1:4 稀释浓度最符合本实验需要,见图 1。

表1 1,25-(OH)₂D₃对小鼠体重的影响(g, n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	第0天	第4天	第8天	第10天	第14天
正常对照	22.32 ± 1.33	22.54 ± 1.23	22.64 ± 1.25	22.83 ± 1.23	23.08 ± 1.08
模型	22.12 ± 1.20	21.92 ± 1.17	21.84 ± 1.16*	21.73 ± 1.15*	21.71 ± 1.17*
1,25-(OH) ₂ D ₃ 治疗	22.71 ± 1.21	22.53 ± 1.18	22.19 ± 1.14*	22.51 ± 1.12*▲	22.60 ± 1.15*▲

与正常对照组比较: * P < 0.05; 与模型组比较: ▲ P < 0.05

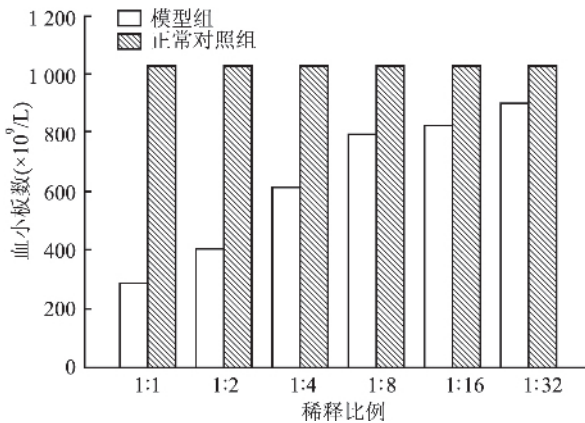


图1 各稀释比例组小鼠血小板数

2.2 小鼠体重及一般情况变化 小鼠造模前称重, 3组之间体重无明显差异 (P > 0.05), 见表1。注射第4天起, 模型组和1,25-(OH)₂D₃治疗组小鼠均出现轻微的脱毛(口鼻周围和背部多见)、皮下瘀点(腹部及尾巴等注射部位明显)。同时出现精神萎靡、反应迟钝、进食量减少、活动量降低且有颤抖和竖毛现象, 体重稍减轻, 相关症状随注射次数增加而逐渐加重。注射第10天起, 1,25-(OH)₂D₃治疗组小鼠进食量开始明显增加, 精神和反应逐渐恢复。正常对照组小鼠未出现类似症状, 反应灵敏, 活动进食及体重等均无明显变化。

注射第10天, 模型组小鼠体重持续降低, 而1,25-(OH)₂D₃治疗组小鼠体重呈现上升趋势; 注射第14天, 正常对照组小鼠体重较前稍有增加, 模型组小鼠体重仍较低, 1,25-(OH)₂D₃治疗组小鼠体重呈持续上升趋势。从注射第10天起, 两组之间差异均有统计学意义 (P < 0.05), 见表1。

2.3 出血评分 注射APS第4天, 模型组及1,25-(OH)₂D₃治疗组小鼠均开始出现不同程度的皮下出血。主要的出血部位为腹部、注射处、尾巴及生殖

器等处, 还有少数小鼠出现口鼻出血。表2显示注射第10天, 1,25-(OH)₂D₃治疗组较模型组出血评分低, 差异有统计学意义 (P < 0.05); 而注射第14天, 1,25-(OH)₂D₃治疗组的出血评分仍明显低于模型组, 差异有统计学意义 (P < 0.05)。注射结束后, 可见1,25-(OH)₂D₃治疗组小鼠皮下出血部位范围较前明显缩小、个数减少; 而模型组皮下出血部位仍较多, 少数可见新发出血部位; 而正常对照组小鼠无皮下出血, 亦无口鼻出血。

表2 1,25-(OH)₂D₃对小鼠出血倾向的影响(只, n=10)

组别	出血评分	第0天	第4天	第8天	第10天	第14天
正常对照	0级	10	10	10	10	10
	1级	0	0	0	0	0
	2级	0	0	0	0	0
	3级	0	0	0	0	0
模型	0级	10	8	6	0	0
	1级	0	2	3	5	3
	2级	0	0	1	4	5
	3级	0	0	0	1	2
1,25-(OH) ₂ D ₃ 治疗	0级	10	9	6	7	9
	1级	0	1	4	3	1
	2级	0	0	0	0	0
	3级	0	0	0	0	0

2.4 1,25-(OH)₂D₃对小鼠血小板数的影响 注射前采集小鼠外周血, 3组间血小板数无明显差异。注射第4天, 模型组和1,25-(OH)₂D₃治疗组小鼠血小板计数出现明显下降; 至注射第10天, 模型组小鼠血小板数稳定在较低水平, 1,25-(OH)₂D₃治疗组小鼠血小板计数有所回升; 注射第14天, 模型组小鼠血小板计数持续稳定在较低水平, 1,25-(OH)₂D₃治疗组小鼠血小板较前继续回升, 正常对照组小鼠血小板维持在正常水平, 稍有波动。从注射第10天起, 1,25-(OH)₂D₃治疗组较模型组差异有统计学意义 (P < 0.05), 见表3。

表3 1,25-(OH)₂D₃对小鼠血小板数的影响(x10⁹/L, n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	第0天	第2天	第4天	第6天	第8天	第10天	第12天	第14天
正常对照	1161.50 ± 173.40	1279.00 ± 158.76	1161.50 ± 161.13	1277.50 ± 171.75	1271.50 ± 169.31	1177.00 ± 187.00	1266.50 ± 187.74	1167.50 ± 178.64
模型	1323.00 ± 110.61	934.50 ± 47.636	662.00 ± 74.70*	637.00 ± 73.02*	626.00 ± 62.84*	637.00 ± 66.30*	630.50 ± 67.12*	634.00 ± 64.07*
1,25-(OH) ₂ D ₃ 治疗	1291.00 ± 214.62	880.50 ± 123.88	638.00 ± 94.00*	690.00 ± 85.95*	658.00 ± 66.45*	690.00 ± 74.30*▲	729.00 ± 73.23*▲	785.00 ± 84.66*▲

与正常对照组比较: * P < 0.05; 与模型组比较: ▲ P < 0.05

2.5 1,25-(OH)₂D₃ 对小鼠巨核细胞及产板巨核细胞数的影响 模型组小鼠的产板巨核细胞数较正常组明显下降,而巨核细胞数则明显升高,1,25-(OH)₂D₃ 治疗组小鼠产板巨核细胞数较模型组稍高,但仍低于正常对照组,而巨核细胞数则低于模型组,高于正常对照组,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。正常对照组小鼠的巨核和产板巨核细胞计数均在正常水平范围,且形态正常,见表4。

表4 1,25-(OH)₂D₃ 对小鼠巨核细胞及产板巨核细胞数的影响(个/片, $n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	骨髓产板巨核细胞数	巨核细胞数
正常对照	24.20 ± 3.36*	70.10 ± 3.38*
模型	7.20 ± 2.78*	136.50 ± 3.81*
1,25-(OH) ₂ D ₃ 治疗	15.50 ± 7.71	100.13 ± 28.26

与1,25-(OH)₂D₃ 治疗组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

ITP 是一种外周血小板数减少、血小板寿命缩短、血小板表面有抗体结合、骨髓巨核细胞代偿性增多而血小板生成障碍的获得性自身免疫性疾病,其发病机制迄今虽然尚未完全阐明,但目前多认为既有体液免疫的紊乱,也有细胞免疫的失调^[5-6]。其中 DC 细胞为专职的抗原提呈细胞,是各种免疫应答发生的启动、调控和维持的中心环节。既往国内外研究^[7]表明,ITP 患者外周 DC 细胞功能出现异常:一方面,DC 细胞表面分子的过多表达或受体的表达缺陷,都可促使 T 细胞亚群功能失常和比例失调,而引起强烈的自身免疫反应;另一方面,DC 细胞可以通过分泌 B 细胞活化因子(BAFF)、TNF 家族因子增殖诱导配体(APRIL)等促进 B 细胞生存和分化成熟,从而直接促进 B 细胞分泌自身抗体。这些均表明 DC 细胞在 ITP 等自身免疫疾病的发病机制中有重要的作用。

前期实验结果证实,在体外使用生理剂量 1,25-(OH)₂D₃ 处理体外扩增小鼠骨髓来源 DC 后,可以得到共刺激分子表达水平明显降低、激活 T 细胞能力减弱的耐受性未成熟 DC,从而可以诱导免疫耐受^[2]。

本研究通过给予小鼠 GP-APS 模拟 ITP 发病机制中的抗体破坏血小板这一过程,建立被动性小鼠 ITP 模型。在注射第 3 天即可见模型组和 1,25-(OH)₂D₃ 治疗组血小板明显下降,并可见皮下出血,甚至口鼻出血,之后血小板一直稳定在较低水

平;而注射第 14 天后处死小鼠,取骨髓涂片计数巨核细胞数示代偿性增多,其中产板巨核细胞数则明显降低,均符合 ITP 表现,表明该模型建立成功。在此模型基础上,从注射血清第 4 天开始给予 1,25-(OH)₂D₃ 治疗,发现注射第 8 天,治疗组小鼠血小板在降至最低后开始上升,但差异无统计学意义。上升趋势从注射第 10 天开始明显,并一直呈持续上升状态,同时伴有出血评分下降。这些结果都证明了 1,25-(OH)₂D₃ 针对 ITP 等自身免疫疾病具有一定的治疗作用,虽然治疗效果在第 10 天才具有明显差异性,表明其发挥作用需要一定时间。

近几年来,已有较多相关实验证实,1,25-(OH)₂D₃ 作为免疫调节剂可以改变不同免疫细胞的作用,调整单核细胞的细胞因子外形结构,促使原始 T 淋巴细胞向调节 T 细胞转化,还可以干扰 DC 细胞的分化和成熟^[8-10],将其锁定在半成熟的状态^[11]。这种转变后的 DC 细胞共刺激分子表达水平降低。它还可以抑制白介素-12 的分泌^[12-13],从而可以改变 T 淋巴细胞的免疫功能,诱导 T 细胞的无反应性,提高凋亡水平^[10,14]。同时将 T 细胞的细胞因子应答反应,从与 Th 1 和 Th 17 共同作用的促炎反应,转换为与 Th 2 和调节性 T 细胞共同作用的更有耐受性的反应,从而诱导免疫耐受性^[15-17]。笔者考虑 1,25-(OH)₂D₃ 可能通过以上各种免疫调节作用诱导 DC 细胞的耐受性,从而发挥对 ITP 的治疗作用。下一步实验即可收集模型组及 1,25-(OH)₂D₃ 治疗组小鼠的骨髓来源 DC 细胞,体外培养后,通过流式细胞术等技术测量 DC 细胞表面共刺激分子等表达水平,验证是否具有免疫耐受性。

参考文献

- [1] Baeke F, Korf H, Overbergh L, et al. Human T lymphocytes are direct targets of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in the immune system [J]. J Steroid Biochem Mol Biol 2010, 121(1-2): 221-7.
- [2] 刘飞,杨明珍,李庆生,等. 1,25-二羟维生素 D₃ 下调 Toll 样受体 7 在树突状细胞中的表达 [J]. 安徽医科大学学报, 2012, 47(8): 924-7.
- [3] McMillan R. Autoantibodies and autoantigens in chronic immune thrombocytopenic purpura [J]. Semin Hematol 2000, 37(3): 239-48.
- [4] Cines D B, Blanchette V S. Immune thrombocytopenic purpura [J]. N Engl J Med 2002, 28(13): 995-1008.
- [5] Ferreira G B, Overbergh L, Verstuyf A, et al. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ and its analogs as modulators of human dendritic cells: a comparison dose-titration study [J]. J Steroid Biochem Mol Biol 2013, 136: 160-5.

- [6] 褚雨霏, 张雅月, 侯丽等. 免疫性血小板减少症的免疫学发病机制研究[A]. 中华中医药学会. 血液病中医药防治分论坛论文集[C]. 中国北京: 中华中医药学会, 2014: 648-52.
- [7] 吴宏妍, 陈家军, 孙宗全等. 重组 HSP60 蛋白体外对小鼠骨髓树突状细胞功能的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2014, 30(4): 438-41.
- [8] Griffin M D, Lutz W, Phan V A, et al. Dendritic cell modulation by 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ and its analogs: a vitamin D receptor-dependent pathway that promotes a persistent state of immaturity *in vitro* and *in vivo* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98(12): 6800-5.
- [9] van Halteren A G, Tysma O M, van Etten E, et al. 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ or analogue treated dendritic cells modulate human autoreactive T cells *via* the selective induction of apoptosis [J]. *J Autoimmun* 2004, 23(3): 233-9.
- [10] Penna G, Adorini L. 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation [J]. *J Immunol*, 2000, 164(5): 2405-11.
- [11] Adorini L, Penna G. Dendritic cell tolerogenicity: a key mechanism in immunomodulation by vitamin D receptor agonists [J]. *Hum Immunol* 2009, 70(5): 345-52.
- [12] Piemonti L, Monti P, Sironi M, et al. Vitamin D₃ affects differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells [J]. *J Immunol* 2000, 164(9): 4443-51.
- [13] van Halteren A G, van Etten E, de Jong E C, et al. Redirection of human autoreactive T-cells Upon interaction with dendritic cells modulated by TX527, an analog of 1, 25-dihydroxyvitamin D(3) [J]. *Diabetes* 2002, 51(7): 2119-25.
- [14] Mahnke K, Schmitt E, Bonifaz L, et al. Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells [J]. *Immunol Cell Biol* 2002, 80(5): 477-83.
- [15] Unger W W, Laban S, Kleijwegt F S, et al. Induction of Treg by monocyte-derived DC modulated by vitamin D₃ or dexamethasone: differential role for PD-L1 [J]. *Eur J Immunol* 2009, 39(11): 3147-59.
- [16] Tang J, Zhou R, Luger D, et al. Calcitriol suppresses antiretinal autoimmunity through inhibitory effects on the Th17 effector response [J]. *J Immunol* 2009, 182(8): 4624-32.
- [17] Penna G, Roncari A, Amuchastegui S, et al. Expression of the inhibitory receptor ILT3 on dendritic cells is dispensable for induction of CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells by 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ [J]. *Blood* 2005, 106(10): 3490-7.

The therapeutic effect of 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ on ITP mice model

Gu Yue, Liu Lixia, Yang Mingzhen, et al

(Dept of Hematology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To observe and analyze the therapeutic effect of 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ on the immune thrombocytopenia (ITP) model in mice. **Methods** 44 BALB/c mice were divided into three groups: normal control group, model group and 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ treatment group. The model group was given the GP-APS intraperitoneally, while the treatment group, on the basis of the model group, was administered 100 ng/d of 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ by intravenous injection, and the normal control group was given the same volume of saline through both intraperitoneal and intravenous injection. The mice were taken blood samples after 24 hours of each administration, recorded their weights and measured platelet accounts and bleeding tendencies. After two weeks of injection, the mice were sacrificed and dissected, smeared with the bone marrow that had been taken out, counted the number of megakaryocyte under the microscope. Assessed the therapeutic effect of 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ on the model mice in several aspects. **Results** From the 10th day of the injection, the food-intake of the treatment group was markedly increased, the spirit status and reaction was gradually recovered; the body weight and platelet account, compared with the model group, were both significantly increased ($P < 0.05$); bleeding tendency evident was markedly decreased ($P < 0.05$); the number of the platelet-forming megakaryocyte was higher than the model group and lower than the normal control group, while the number of the megakaryocyte was lower than the model group and higher than the normal control group, the difference was statistically significant. **Conclusion** 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ shows some influence on the improvement of general status, the rise of body weight and platelet account, the reduction of bleeding tendency and the promotion of platelet's production of the model mice.

Key words immune thrombocytopenia; animal model; 1, 25-dihydroxyvitamin D₃