

• 论 著 •

基于 SPOP/MyD88/NF- κ B 通路探讨木犀草素对过敏性鼻炎大鼠炎症反应及 Th1/Th2 失衡的影响*

董小莉¹, 吴袁媛¹, 郭丹^{2Δ}

1. 河南中医药大学第二临床医学院, 河南郑州 450000; 2. 河南医学高等专科学校医学系, 河南郑州 450000

摘要:目的 探讨木犀草素对过敏性鼻炎(AR)大鼠炎症反应及辅助性 T 细胞(Th)1/Th2 失衡的影响及其机制。方法 将 56 只 SD 大鼠按照数字随机表法分为对照组、模型(AR)组、木犀草素低剂量[20 mg/(kg·d)]组、木犀草素高剂量[40 mg/(kg·d)]组、AAV-shRNA-NC 组、AAV-shRNA-斑点型 POZ 蛋白(SPOP)组和木犀草素[40 mg/(kg·d)]+AAV-shRNA-SPOP 组, 每组各 8 只。各组处理 3 周后, 评估各组大鼠 AR 症状。采用苏木精-伊红染色观察大鼠鼻黏膜病理学和炎症变化, 采用酶联免疫吸附试验检测血清中 Th1、Th2 型细胞因子及卵白蛋白(OVA)-特异性免疫球蛋白 E(sIgE)水平, 采用免疫共沉淀实验检测髓样分化因子(MyD88)泛素化水平, 采用蛋白质印迹法检测 SPOP/MyD88/核因子(NF)- κ B 通路相关蛋白表达。结果 与对照组比较, AR 组大鼠行为学评分升高($P < 0.05$), 鼻黏膜大部分上皮脱落, 固有层血管扩张, 腺体增生, 伴嗜酸性粒细胞及淋巴细胞浸润, 血清干扰素(IFN)- γ 、白细胞介素(IL)-2 水平降低($P < 0.05$), IL-4、IL-5、IL-13、OVA-sIgE 水平升高($P < 0.05$), MyD88 泛素化水平降低($P < 0.05$), MyD88 非泛素化水平升高($P < 0.05$), SPOP 水平降低($P < 0.05$), MyD88 水平、p-P65/P65 升高($P < 0.05$)。与 AR 组比较, 木犀草素低、高剂量组大鼠行为学评分均降低($P < 0.05$), 鼻黏膜上皮病变、腺体增生和炎症反应均逐渐减轻, 血清 IFN- γ 、IL-2 水平升高($P < 0.05$), IL-4、IL-5、IL-13、OVA-sIgE 水平降低($P < 0.05$), MyD88 泛素化水平升高($P < 0.05$), 非泛素化状态下 MyD88 水平降低($P < 0.05$), SPOP 水平升高($P < 0.05$), MyD88 水平、p-P65/P65 降低($P < 0.05$)。与木犀草素高剂量组比较, 木犀草素+AAV-shRNA-SPOP 组鼻黏膜 MyD88 泛素化水平降低($P < 0.05$), MyD88 水平、p-P65/P65 升高($P < 0.05$), 血清 IFN- γ 、IL-2 水平降低($P < 0.05$), IL-4、IL-5、IL-13、OVA-sIgE 水平及行为学评分升高($P < 0.05$)。AR 组与 AAV-shRNA-SPOP 组大鼠鼻黏膜 MyD88 泛素化水平、MyD88 水平、p-P65/P65、血清 IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-13、OVA-sIgE 水平比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 木犀草素可通过调控 SPOP/MyD88/NF- κ B 通路, 抑制 NF- κ B 活化, 改善 OVA 诱导的 AR 炎症损伤及 Th1/Th2 失衡。

关键词:木犀草素; 过敏性鼻炎; 炎症损伤; 辅助性 T 细胞 1/辅助性 T 细胞 2 失衡; 斑点型 POZ 蛋白/髓样分化因子/核因子- κ B 通路

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2026.04.001

中图法分类号:R765.21

文章编号:1673-4130(2026)04-0385-09

文献标志码:A

Exploring the effect of luteolin on inflammatory response and Th1/Th2 imbalance in allergic rhinitis rats based on the SPOP/MyD88/NF- κ B pathway*

DONG Xiaoli¹, WU Yuanyuan¹, GUO Dan^{2Δ}

1. Second Clinical School of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou, Henan 450000, China; 2. Department of Medicine, Henan Medical College, Zhengzhou, Henan 450000, China

Abstract: Objective To investigate the effect of luteolin on inflammatory response and T helper cell (Th) 1/Th2 imbalance in allergic rhinitis (AR) rats and its mechanism. **Methods** A total of 56 SD rats were randomly divided into control group, model (AR) group, luteolin low-dose [20 mg/(kg·d)] group, luteolin high-dose [40 mg/(kg·d)] group, AAV-shRNA-NC group, AAV-shRNA-spotted POZ protein (SPOP) group and luteolin [40 mg/(kg·d)]+AAV-shRNA-SPOP group according to the random number table, with 8 rats in each group. After 3 weeks of treatment, the AR symptoms of rats in each group were evaluated. Hematoxylin-eosin staining was used to observe the pathological and inflammatory changes of nasal mucosa. The levels of

* 基金项目:河南省医学科技攻关计划省部共建项目(SBGJ202102055);河南省科技攻关项目(222102310338)。

作者简介:董小莉,女,硕士研究生在读,主要从事耳鼻喉疾病相关研究。Δ 通信作者, E-mail: dongdong12687@163.com。

Th1, Th2 cytokines and ovalbumin (OVA)-specific immunoglobulin E (sIgE) in serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The ubiquitination level of myeloid differentiation factor 88 (MyD88) was detected by co-immunoprecipitation assay. The expression of SPOP/MyD88/nuclear factor (NF)- κ B pathway related proteins was detected by Western blot. **Results** Compared with the control group, the behavioral score of the AR group was increased ($P < 0.05$), most of the nasal mucosa epithelium was shed, the blood vessels of the lamina propria were dilated, the glands were proliferated, with eosinophils and lymphocytes infiltration, the serum interferon (IFN)- γ and interleukin (IL)-2 levels were decreased ($P < 0.05$), the levels of IL-4, IL-5, IL-13 and OVA-sIgE were increased ($P < 0.05$), the level of MyD88 ubiquitination was decreased ($P < 0.05$), the level of MyD88 non-ubiquitination was increased ($P < 0.05$), the level of SPOP was decreased ($P < 0.05$), and the MyD88 level and p-P65/P65 were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the AR group, the behavioral scores of the rats in the luteolin low-dose, high-dose group were decreased ($P < 0.05$), the pathological changes of nasal mucosa, glandular hyperplasia and inflammatory reaction were gradually alleviated, the serum levels of IFN- γ and IL-2 were increased ($P < 0.05$), the levels of IL-4, IL-5, IL-13 and OVA-sIgE were decreased ($P < 0.05$), the level of MyD88 ubiquitination was increased ($P < 0.05$), the level of MyD88 non-ubiquitination was decreased ($P < 0.05$), the level of SPOP was increased ($P < 0.05$), and the MyD88 level and p-P65/P65 were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the luteolin high-dose group, the level of MyD88 ubiquitination in nasal mucosa of the luteolin + AAV-shRNA-SPOP group was increased ($P < 0.05$), the level of MyD88 and p-P65/P65 were increased ($P < 0.05$), the levels of IFN- γ and IL-2 in serum were decreased ($P < 0.05$), while the levels of IL-4, IL-5, IL-13, OVA-sIgE and behavioral score were increased ($P < 0.05$). There were no significant differences in the levels of MyD88 ubiquitination, MyD88, p-P65/P65, IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-13 and OVA-sIgE between AR group and AAV-shRNA-SPOP group ($P > 0.05$). **Conclusion** Luteolin can inhibit the activation of NF- κ B by regulating SPOP/MyD88/NF- κ B pathway, and improve the inflammatory injury and Th1/Th2 imbalance of allergic rhinitis induced by OVA.

Key words: luteolin; allergic rhinitis; inflammatory injury; T helper cell 1/T helper cell 2 imbalance; speckled POZ protein/myeloid differentiation factor/nuclear factor- κ B pathway

过敏性鼻炎(AR)是一种由变应原暴露引发的免疫球蛋白 E(IgE)依赖性鼻黏膜炎症反应性疾病,临床表现为气流阻塞、鼻痒、鼻溢液、喷嚏等^[1]。近年来 AR 发病率急剧上升,而当前的一线治疗药物只能暂时缓解症状,停药后症状复发^[2]。因此迫切需要为 AR 患者寻找更安全有效的治疗策略。辅助性 T 细胞(Th)1/Th2 细胞因子失衡是 AR 的关键特征^[2]。在过敏原暴露过程中,AR 患者外周血单个核细胞异常分泌高水平的 Th2 细胞因子和趋化因子^[3]。这些促进嗜酸性粒细胞和肥大细胞在鼻黏膜内过度浸润,释放大量的白三烯、组胺等促炎因子,从而诱发局部炎症,造成黏膜损伤。木犀草素(3',4',5,7-四羟基黄酮)是一种典型的黄酮类化合物,发挥抗氧化、抗炎、增强免疫等作用,具有较高的医学价值^[4]。既往研究表明,木犀草素可明显降低过敏性哮喘支气管肺泡液中嗜酸性粒细胞数量和促炎因子分泌,减轻气道炎症^[5]。但其对 AR 的作用效果尚不明确。Toll 样受体(TLR)是免疫系统的固有受体,在抵御病原微生物感染和外源性过敏原刺激方面发挥着关键作用^[6]。几乎所有的 TLR 信号都能够通过髓样分化因子(MyD88)依赖的通路激活经典的核因子(NF)- κ B 级联,从而产生促炎细胞因子^[6]。抑制 MyD88/NF- κ B

通路可调控 Th1/Th2 平衡^[7]。斑点型 POZ 蛋白(SPOP)是 POZ 家族的一员,有研究表明,SPOP 作为 CUL3-RBX1 E3 泛素连接酶复合物(CRL3)的底物衔接子可触发 MyD88 泛素化降解,控制全身炎症消退^[8]。然而,木犀草素是否可通过调控 SPOP/MyD88/NF- κ B 通路改善 AR 后 Th1/Th2 失衡尚未明确。鉴于此,本研究旨在利用卵白蛋白(OVA)诱导构建 AR 大鼠模型,探讨木犀草素对 AR 的可能作用及机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 56 只雄性 SD 大鼠,无特定病原体级,8 周龄,体重 250~300 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,生产许可证号:SYXK(京)2021-0010。饲养环境温度为 22~25 °C,相对湿度在 40%~60%,通风良好,12 h 光照/黑暗周期,自由饮食,适应 1 周后进行实验。动物实验遵守国际实验动物伦理学要求,本研究获得河南中医药大学伦理委员会的审批(审批号:HNSZYY-2024-032)。

1.2 仪器与试剂 木犀草素购自美国 Targetmol 公司,OVA 购自美国 Sigma 公司,氢氧化铝购自美国 Pierce chemical 公司,苏木精-伊红(HE)染色试剂盒购自北京索莱宝生物技术有限公司,干扰素(IFN)- γ 、

白细胞介素(IL)-2、IL-4、IL-5、IL-13 和 OVA-特异性免疫球蛋白 E(sIgE)酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒购自美国 R&D 公司, SPOP、MyD88、p-P65、P65、Tubulin 和 Ub 一抗购于美国 CST 公司, AAV-shRNA 腺病毒均由上海基因制药有限公司设计合成。

1.3 方法

1.3.1 模型构建及实验分组 将 56 只 SD 大鼠按照数字随机表法分为对照组、模型(AR)组、木犀草素低剂量组、木犀草素高剂量组、AAV-shRNA-NC 组、AAV-shRNA-SPOP 组和木犀草素 + AAV-shRNA-SPOP 组, 每组各 8 只。除对照组外, 其他组大鼠均参照研究已报道的 OVA 致敏法诱导建立 AR 模型^[9]。基础致敏阶段: 将 100 μg OVA 和 1 mg 氢氧化铝溶于 100 μL 0.9% 氯化钠溶液, 在第 0、7、14 天通过腹腔注射 100 μL OVA 悬浊液致敏。局部激发阶段: 从第 15 天开始, 使用微量移液枪在大鼠每侧鼻孔滴入 100 mg/mL OVA 溶液, 每侧每次 50 μL , 连续 20 d。以鼻部症状评分标准^[10-11], 总分 >5 分视为造模成功。之后, 木犀草素低、高剂量组大鼠分别给予 20 和 40 [mg/(kg·g)] 的木犀草素腹腔注射, 每日 1 次, 连续 3 周; AAV-shRNA-NC 和 AAV-shRNA-SPOP 组分别于造模成功后第 0 天和第 2 天每侧鼻腔滴入 50 μL 的脂质体与 AAV 病毒混合物。对照组大鼠不造模, 仅给予等量 0.9% 氯化钠溶液腹腔注射和 pcDNA 脂质体混合物滴鼻; 木犀草素 + AAV-shRNA-SPOP 组给予 40 [mg/(kg·g)] 木犀草素和 50 μL 的脂质体与质粒混合物处理同样时间。

1.3.2 鼻炎症状评分 在实验大鼠治疗的最后一天, 根据鼻痒、打喷嚏、流鼻水等典型临床症状, 参照文献^[11], 由 3 名不知情大鼠分组和治疗的观察者对 AR 进行评价。用 4 分制对症状进行分级, 并对每种症状进行数值评分(0~3 分)。(1)鼻痒: 0 分表示大鼠在 10 min 内没有揉鼻; 1 分指大鼠在 1 min 内揉鼻 1~3 次; 2 分指大鼠在 1 min 内揉鼻 4~6 次; 3 分表示大鼠在 1 min 内揉鼻子 6 次以上。(2)打喷嚏: 0 分表示大鼠在 10 min 内没有打喷嚏; 1 分表示大鼠在 10 min 内打喷嚏 1~3 次; 2 分表示大鼠在 10 min 内打喷嚏 4~9 次; 3 分指 10 min 内打喷嚏 10 次以上。(3)鼻分泌物: 0 分表示无鼻分泌物; 1 分表示大鼠的鼻孔里有鼻分泌物; 2 分表示大鼠在鼻孔外有鼻分泌物; 3 分意味着大鼠的鼻孔里有溢出的鼻分泌物。总分超过 5 分即认为 AR 模型成功。

1.3.3 HE 染色检测鼻黏膜病理损伤 行为学检测结束后, 禁食 24 h, 用 1% 戊巴比妥钠(150 mg/kg)腹腔注射深度麻醉大鼠, 摘眼球取血。固定头部, 剔除上颌部和鼻腔上方皮毛, 沿双侧鼻孔上缘掀起鼻骨, 剥离鼻中隔两侧鼻黏膜, 一侧鼻黏膜置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存

备用; 另一侧鼻黏膜置于 4% 多聚甲醛固定 24 h, 经脱水、透明、浸蜡、包埋后, 4 μm 厚连续切片。按照试剂盒说明书进行 HE 染色, 并评估鼻黏膜组织病理形态。在 200 倍光学显微镜下随机选择 5 个不同视野, 拍照并分析。

1.3.4 ELISA 检测血清中 Th1、Th2 型细胞因子及 OVA-sIgE 水平 将全血室温静置 1 h 以上, 3 000 r/min 离心 30 min, 取上层血清。按照相应 ELISA 试剂盒说明书, 测定各组大鼠血清中 Th1 型细胞因子(IFN- γ 和 IL-2)、Th2 型细胞因子(IL-4、IL-5 和 IL-13)和 OVA-sIgE 水平。

1.3.5 免疫共沉淀(Co-IP)实验检测 MyD88 泛素化水平 取适量鼻黏膜组织, 用含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解缓冲液冰上裂解组织 20 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 10 min 以去除组织颗粒。接下来, 取 1/10 的细胞裂解缓冲液作为 Input, 剩余部分与抗-MyD88(稀释比例为 1:30)和蛋白 A/G-Sepharose 抗体在 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。沉淀蛋白用裂解液洗涤 5 次后, 用 SDS-loading 缓冲液洗脱, 然后与抗-Ub(稀释比为 1:1 000)抗体孵育, 进行蛋白质印迹法(Western Blot)分析。

1.3.6 Western Blot 检测 SPOP/MyD88/NF- κB 通路相关蛋白表达 各组大鼠鼻黏膜组织中加入含 PMSF 的蛋白裂解液, 冰上裂解, 离心并收集上清液。BCA 法测定蛋白浓度, 然后加入 5 \times 上样缓冲液, 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸变性。每组取 40 μg 蛋白样品, 行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白, 并将蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜上。5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h 后, 用抗 SPOP(1:200)、MyD88(1:200)、p-P65(1:200)、P65(1:300)和 Tubulin(1:1 000)一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日, 清洗膜 3 次后, 加入 HRP 山羊抗兔 IgG 二抗(1:10 000)室温孵育 1 h, 采用 ECL 法进行曝光显影, Image J 软件定量蛋白灰度值。

1.4 统计学处理 所有数据均采用 SPSS26.0 统计软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组比较采用独立样本 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 木犀草素对 AR 大鼠的临床症状的影响 与对照组(0 分)比较, AR 组大鼠行为学评分[(6.89 \pm 0.45)分]升高, 差异有统计学意义($P < 0.001$)。与 AR 组比较, 木犀草素低剂量组[(4.15 \pm 0.23)分]和木犀草素高剂量组[(1.32 \pm 0.08)分]大鼠行为学评分均降低, 差异有统计学意义($P < 0.001$)。

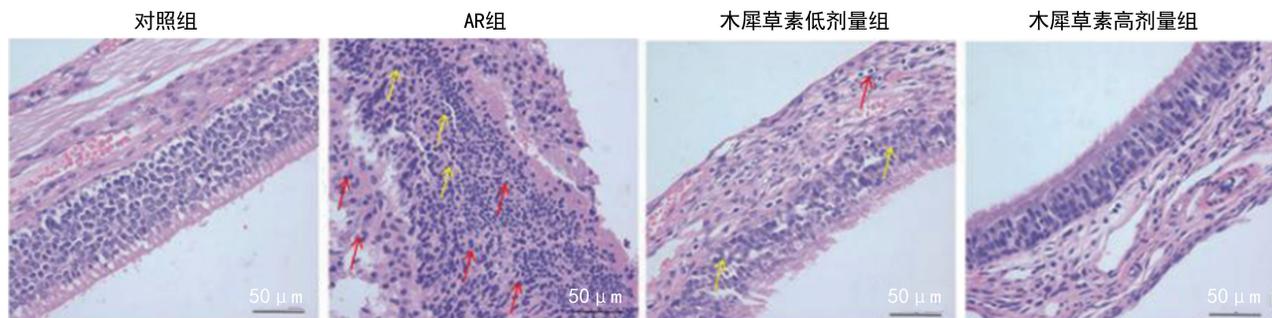
2.2 木犀草素对 AR 大鼠鼻黏膜组织病理学损伤的影响 对照组大鼠鼻黏膜上皮细胞及纤毛组织排列整齐, 固有层血管及纤维结构正常。AR 组大鼠鼻黏膜大部分上皮脱落, 固有层血管扩张, 腺体增生, 伴嗜

酸性粒细胞及淋巴细胞浸润。与 AR 组比较,木犀草素低、高剂量组大鼠鼻黏膜上皮病变、腺体增生和炎症反应均逐渐减轻。见图 1。

2.3 木犀草素对 AR 大鼠血清 Th1/Th2 失衡的影响

与对照组比较,AR 组大鼠血清 Th1 型细胞因子

(IFN- γ 、IL-2)水平降低($P < 0.001$),而 Th2 型细胞因子(IL-4、IL-5、IL-13)和 OVA-sIgE 水平升高($P < 0.001$)。与 AR 组比较,木犀草素低、高剂量组大鼠血清 IFN- γ 、IL-2 水平升高($P < 0.001$),IL-4、IL-5、IL-13、OVA-sIgE 水平降低($P < 0.001$)。见表 1。



注:黄色箭头为淋巴细胞浸润;红色箭头为嗜酸性粒细胞浸润。

图 1 HE 染色检测各组大鼠鼻黏膜组织病理学损伤

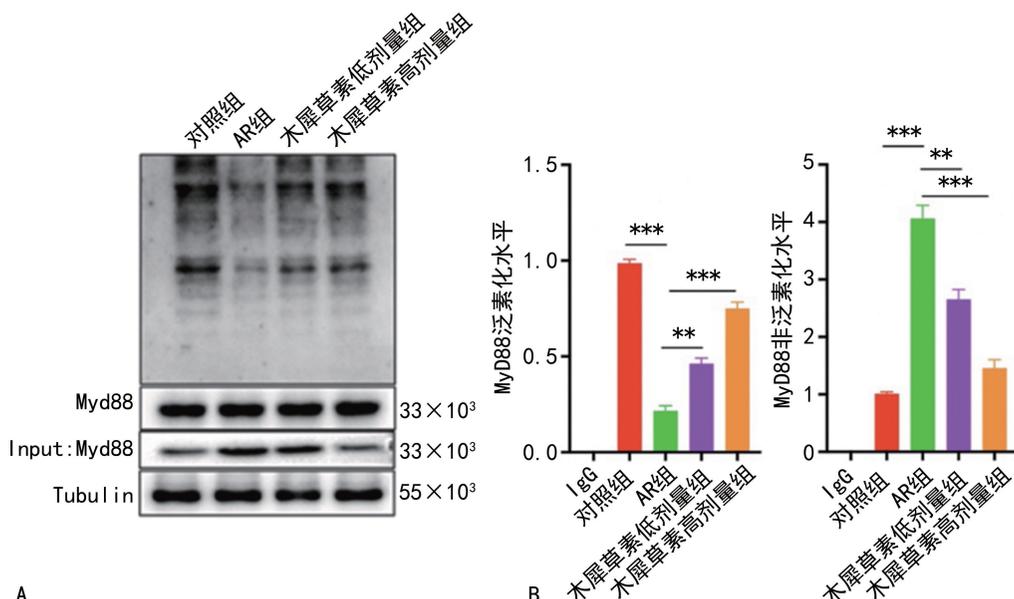
表 1 各组大鼠血清 Th1/Th2 相关因子水平比较($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	IFN- γ (pg/mL)	IL-2 (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)	IL-5 (pg/mL)	IL-13 (pg/mL)	OVA-sIgE (ng/L)
对照组	736.87 \pm 38.29	17.35 \pm 4.38	9.36 \pm 0.97	27.38 \pm 0.89	237.26 \pm 18.37	100.36 \pm 5.27
AR 组	332.17 \pm 14.38	7.83 \pm 1.65	20.35 \pm 2.13	83.26 \pm 4.36	483.62 \pm 23.21	389.26 \pm 37.26
木犀草素低剂量组	527.18 \pm 17.29	14.24 \pm 1.83	15.37 \pm 1.35	58.27 \pm 2.36	383.26 \pm 18.36	168.37 \pm 26.38
木犀草素高剂量组	688.37 \pm 18.27	16.98 \pm 1.89	11.37 \pm 0.78	33.26 \pm 1.38	289.36 \pm 21.22	132.16 \pm 14.36

2.4 木犀草素对 AR 大鼠鼻黏膜 MyD88 泛素化的影响 与对照组比较,AR 组大鼠鼻黏膜 MyD88 泛素化水平降低,MyD88 非泛素化水平升高($P < 0.001$)。与 AR 组比较,木犀草素低、高剂量组大鼠鼻黏膜 MyD88 泛素化水平升高,MyD88 非泛素化水平降低($P < 0.01$)。见图 2、表 2。

表 2 各组大鼠鼻黏膜 MyD88 泛素化水平比较($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	MyD88 泛素化	MyD88 非泛素化
对照组	1.03 \pm 0.06	1.01 \pm 0.03
AR 组	0.22 \pm 0.05	4.06 \pm 0.17
木犀草素低剂量组	0.46 \pm 0.04	2.68 \pm 0.13
木犀草素高剂量组	0.77 \pm 0.08	1.38 \pm 0.11



注:A、B 分别为 Co-IP 检测木犀草素对 MyD88 泛素化影响的蛋白图、柱状图; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 2 Co-IP 检测木犀草素对 MyD88 泛素化的影响

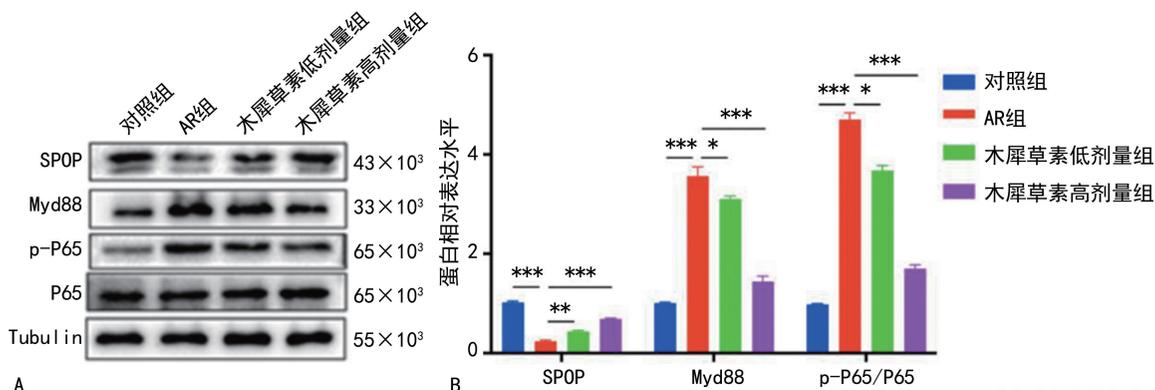
2.5 木犀草素对 AR 大鼠鼻黏膜 SPOP/MyD88/NF-κB 通路的影响 与对照组比较, AR 组大鼠鼻黏膜 SPOP 水平降低, MyD88 水平、p-P65/P65 升高 ($P < 0.001$)。与 AR 组比较, 木犀草素低、高剂量组大鼠鼻黏膜 SPOP 水平升高 ($P < 0.001$), MyD88 水平、p-P65/P65 降低 ($P < 0.05$)。见表 3、图 3。

2.6 AAV-shRNA-SPOP 对 SPOP 的抑制效率验证 与 AAV-shRNA-NC 组比较, AAV-shRNA-SPOP 组大鼠鼻黏膜 SPOP 水平降低 (0.36 ± 0.02 vs. 1.03 ± 0.04), 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。

见图 4。

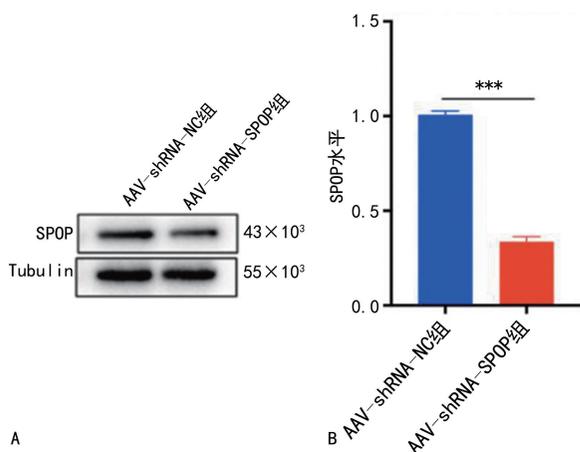
表 3 各组大鼠鼻黏膜 SPOP/MyD88/NF-κB 通路相关蛋白表达比较 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	SPOP	MyD88	p-P65/P65
对照组	1.03±0.02	1.01±0.03	0.99±0.04
AR 组	0.13±0.01	3.82±0.17	4.79±0.13
木犀草素低剂量组	0.35±0.02	3.12±0.11	3.78±0.16
木犀草素高剂量组	0.68±0.04	1.78±0.09	1.89±0.07



注: A、B 分别为 Western Blot 检测木犀草素对 SPOP/MyD88/NF-κB 通路的蛋白图、柱状图; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 3 Western Blot 检测木犀草素对 SPOP/MyD88/NF-κB 通路的影响



注: A、B 分别为 Western Blot 验证 AAV-shRNA-SPOP 对 SPOP 抑制效率的蛋白图、柱状图; *** $P < 0.001$ 。

图 4 Western Blot 验证 AAV-shRNA-SPOP 对 SPOP 的抑制效率

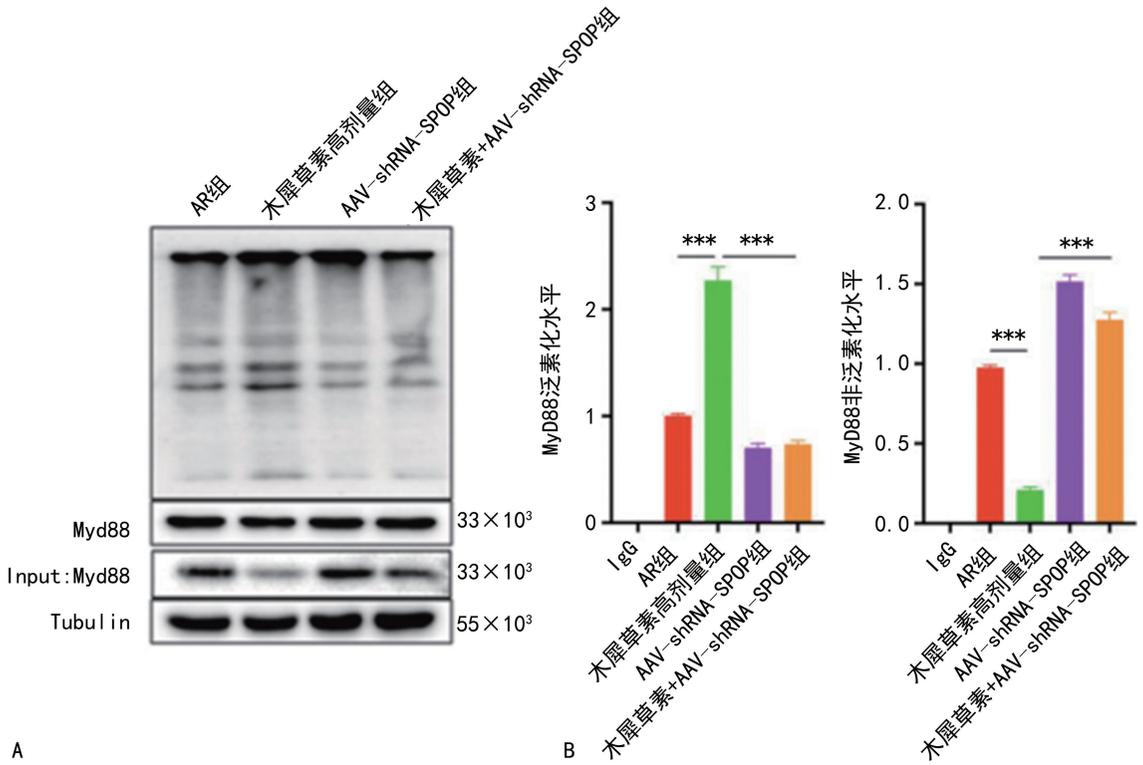
2.7 干扰 SPOP 表达可抑制 AR 大鼠鼻黏膜 MyD88

泛素化并激活下游 NF-κB 信号通路 与木犀草素高剂量组比较, 木犀草素 + AAV-shRNA-SPOP 组鼻黏膜 MyD88 泛素化水平降低 ($P < 0.001$), MyD88 水平、p-P65/P65 升高 ($P < 0.001$)。而 AR 组与 AAV-shRNA-SPOP 组大鼠鼻黏膜 MyD88 泛素化水平、MyD88 水平、p-P65/P65 比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 4、图 5、6。

2.8 干扰 SPOP 表达可逆转木犀草素对 AR 大鼠临床症状和血清 Th1/Th2 失衡的改善作用 与木犀草素高剂量组比较, 木犀草素 + AAV-shRNA-SPOP 组大鼠血清 IFN-γ、IL-2 水平降低 ($P < 0.001$), IL-4、IL-5、IL-13、OVA-sIgE 水平及行为学评分升高 ($P < 0.001$)。而 AR 组与 AAV-shRNA-SPOP 组大鼠血清 IFN-γ、IL-2、IL-4、IL-5、IL-13、OVA-sIgE 水平及行为学评分比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 5、图 7。

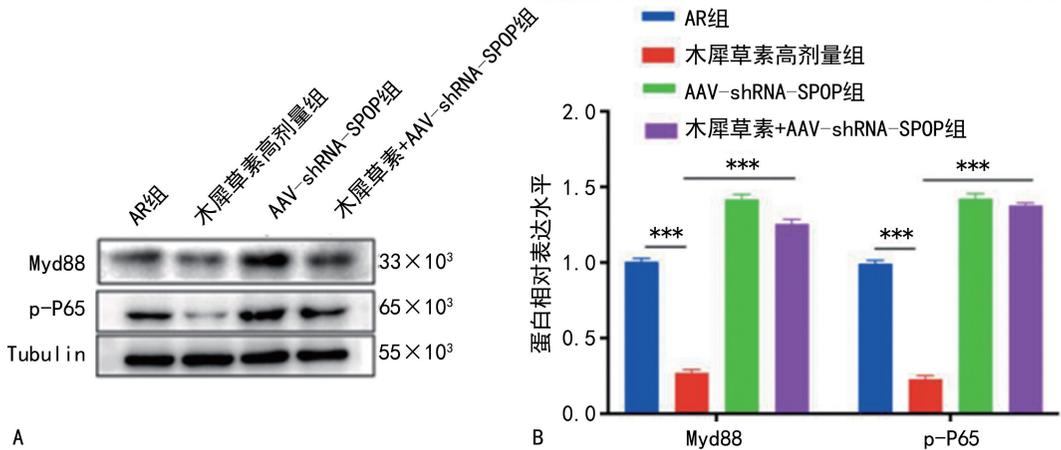
表 4 干扰 SPOP 表达后 MyD88 泛素化和 MyD88/NF-κB 通路表达比较 ($n=4, \bar{x} \pm s$)

组别	MyD88 泛素化	MyD88 非泛素化	MyD88	p-P65/P65
AR 组	1.03±0.03	0.96±0.04	0.99±0.05	1.02±0.04
木犀草素高剂量组	2.27±0.14	0.21±0.03	0.22±0.03	0.23±0.04
AAV-shRNA-SPOP 组	0.68±0.05	1.55±0.07	1.41±0.05	1.42±0.06
木犀草素 + AAV-shRNA-SPOP 组	0.71±0.05	1.21±0.02	1.28±0.03	1.40±0.04



注: A、B 分别为 Co-IP 检测干扰 SPOP 表达对 MyD88 泛素化影响的蛋白图、柱状图; *** $P < 0.001$ 。

图 5 Co-IP 检测干扰 SPOP 表达对 MyD88 泛素化的影响

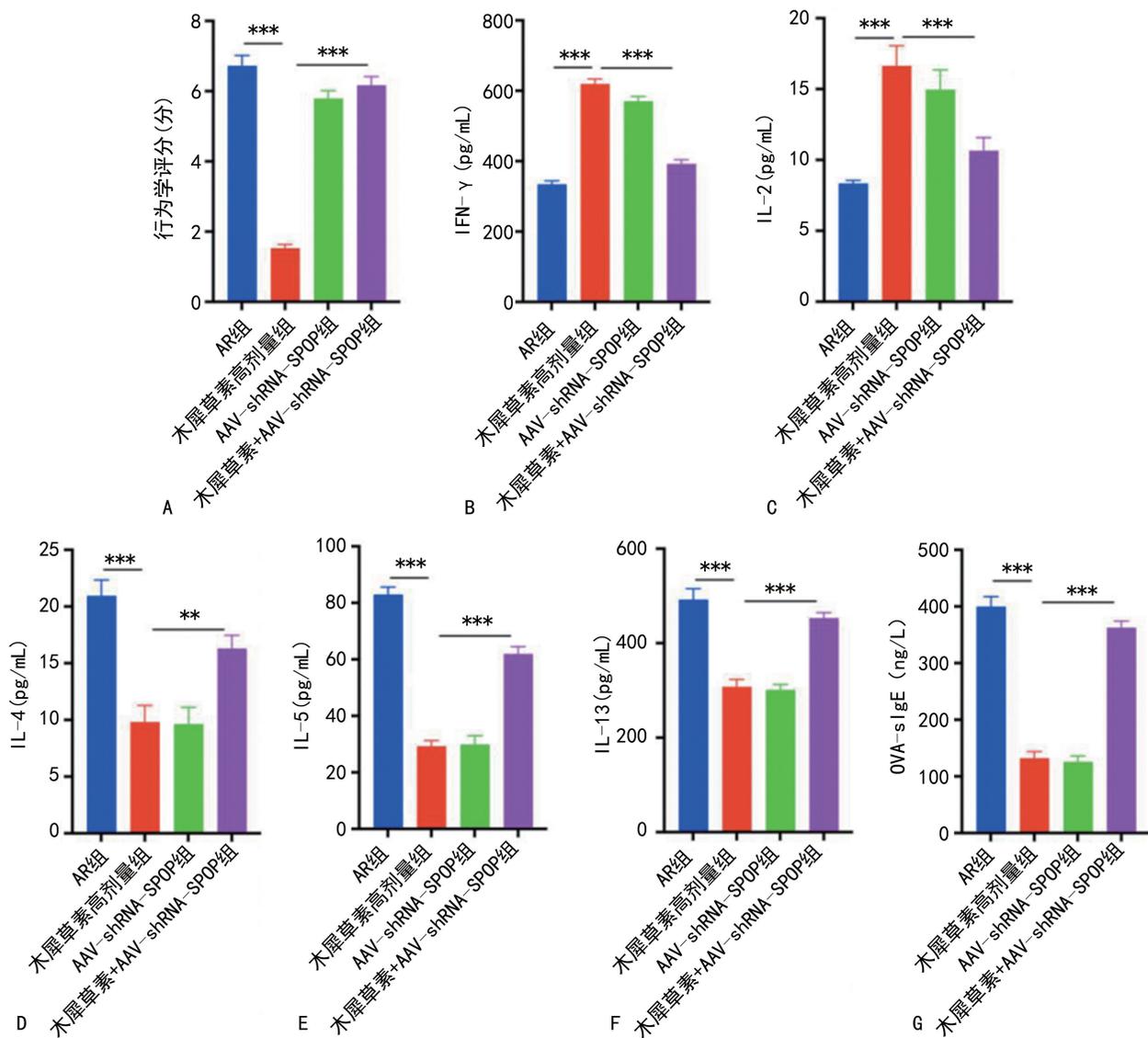


注: A、B 分别为 Western Blot 检测干扰 SPOP 表达对 MyD88/NF- κ B 信号通路影响的蛋白图、柱状图; *** $P < 0.001$ 。

图 6 Western Blot 检测干扰 SPOP 表达对 MyD88/NF- κ B 信号通路的影响

表 5 干扰 SPOP 表达后 AR 大鼠临床症状和血清 Th1/Th2 水平比较 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别	行为学评分(分)	IFN- γ (pg/mL)	IL-2(pg/mL)	IL-4(pg/mL)
AR 组	6.68 \pm 0.47	338.26 \pm 15.27	7.73 \pm 0.08	21.68 \pm 2.23
木犀草素高剂量组	1.37 \pm 0.06	613.27 \pm 18.27	16.76 \pm 1.21	9.76 \pm 2.68
AAV-shRNA-SPOP 组	5.87 \pm 0.43	579.26 \pm 13.28	15.22 \pm 1.33	9.81 \pm 2.59
木犀草素 + AAV-shRNA-SPOP 组	6.12 \pm 0.52	397.26 \pm 15.45	10.76 \pm 0.87	16.34 \pm 2.11
组别	IL-5(pg/mL)	IL-13(pg/mL)	OVA-sIgE(ng/L)	
AR 组	83.25 \pm 4.36	486.37 \pm 23.26	395.25 \pm 32.36	
木犀草素高剂量组	31.26 \pm 2.33	312.36 \pm 18.27	142.36 \pm 13.23	
AAV-shRNA-SPOP 组	32.76 \pm 3.68	308.26 \pm 14.37	139.26 \pm 12.35	
木犀草素 + AAV-shRNA-SPOP 组	62.16 \pm 3.86	448.27 \pm 19.37	372.36 \pm 18.27	



注：A~G 分别为各组行为学评分、IFN-γ、IL-2、IL-4、IL-5、IL-13、OVA-sIgE 水平比较；* $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ 。

图 7 干扰 SPOP 表达对临床症状和血清 Th1/Th2 的影响

3 讨论

目前临床治疗 AR 的方法包括组胺受体拮抗剂、激素和抗胆碱能药物^[2]。虽然病情可以缓解或控制，但目前的治疗方法不良反应大、耐药和复发率高。确定适当的 AR 治疗方法已成为耳鼻喉科的一个焦点，也是一个挑战。

木犀草素是一种天然类黄酮，发挥抗氧化、抗炎、增强免疫等作用^[4]，对变应性鼻炎大鼠具有显著改善作用^[12]。然而，其作用机制鲜见报道，本研究采用 OVA 致敏法成功构建 AR 大鼠模型。与对照组比较，AR 组大鼠表现出显著的行为学改变。病理学检查可见 AR 大鼠鼻黏膜层现典型变态反应特征，上皮细胞排列紊乱伴表层剥脱，固有层内嗜酸性粒细胞广泛浸润，腺体呈代偿性增生肿胀，黏膜下血管扩张充血。上述多维度评价指标的阳性改变，证实 AR 动物模型构建成功。AR 的典型临床症状包括阵发性打喷嚏、流鼻涕、鼻痒^[1]。因此，笔者在建立 AR 模型大鼠

并给予不同剂量木犀草素治疗后，也对其鼻炎症状进行了评分。结果表明，木犀草素可减轻 AR 大鼠的高鼻炎症状评分。此外，AR 是由鼻黏膜分泌 sIgE 引起的特异性炎症反应。因此，笔者检测了 AR 大鼠血清中 OVA-sIgE 水平，并观察了 AR 大鼠鼻黏膜的组织病理学变化。结果显示，木犀草素下调了 OVA-sIgE 水平，减轻鼻黏膜炎症，进一步说明木犀草素具有改善 AR 的作用。

过敏性疾病的关键因素是 Th1、Th2 型细胞分化和细胞因子分泌失衡，且 Th2 型细胞的免疫应答强于 Th1 型细胞（Th1/Th2 细胞因子平衡向 Th2 型细胞因子激活方向发展）^[13]。在机体过敏原的刺激下，Th0 细胞被诱导分化为 Th2 细胞，导致 Th2 细胞增多，Th1 细胞减少（Th1/Th2 失衡），进而导致 AR^[14]。Th1 细胞主要产生 IFN-γ、IL-2 等与延迟过敏反应和病毒清除细胞免疫有关的细胞因子；Th2 细胞主要产生 IL-4、IL-5、IL-13 等细胞因子，参与过敏性炎症反

应^[14-15]。对于 Th1/Th2 失衡的检测,临床常用的指标是血清中 Th1、Th2 型细胞分泌的细胞因子水平^[16]。因此,本研究检测了 AR 大鼠血清中 Th1、Th2 型细胞因子水平。结果表明,AR 大鼠存在 Th1/Th2 失衡,木犀草素可改善该失衡,提示木犀草素改善 AR 的作用可能是通过调节 Th1/Th2 平衡介导的。

本研究进一步探讨木犀草素在 AR 中的作用机制。NF- κ B 是 AR 过敏反应过程中的热点核转录因子之一,不仅在许多组织的凋亡和分化过程中起关键作用,在宿主炎症和免疫反应中也起关键作用^[17]。NF- κ B 的活化受上游 MyD88 信号调控。在细胞外信号的刺激下,上游转导信号 MyD88 促进 NF- κ B 磷酸化,NF- κ B 被释放并迁移到细胞核中,从而在生物效应和免疫中诱导基因转录^[18]。WU 等^[19]发现,小青龙汤可通过调节 MyD88/NF- κ B 通路减轻 AR 炎症反应和线粒体损伤。此外,几乎所有的 TLR 信号都能够通过 MyD88 依赖的通路激活经典的 NF- κ B 级联,从而产生促炎细胞因子^[6]。据报道,多种 TLR 抑制剂可调节 Th1/Th2 失衡,抑制过敏性炎症^[6]。因此,基于 TLR 的免疫疗法为 AR 的治疗提供了新思路。然而,目前 80% 的 TLR 抑制剂数据来源于肿瘤或自身免疫性疾病研究,其在变应性疾病(如 AR)中的长期安全性仍未完全明确^[20]。因此,靶向干预 TLR 的下游信号通路可能是治疗 AR 的有效措施。近期研究发现,SPOP 主要通过 MyD88 依赖性途径改善炎症反应,其缺失会导致造血干细胞及早期祖细胞(HSPCs)中炎症持续存在,并损害炎症消退机制^[21]。另有研究证实,SPOP 与 MyD88 的泛素结合位点位于 Toll/IL-1 受体结构域(TIR),且 SPOP 可通过抑制 Myddosome 组装进而阻断下游 NF- κ B 活化^[8]。上述研究共同提示,SPOP 介导的 MyD88 泛素化修饰通过破坏 TIR 结构域寡聚化和 Myddosome 募集,最终抑制下游 NF- κ B 信号通路的激活,这与本研究结论高度吻合。本研究以 p-P65 磷酸化水平作为 NF- κ B 活化指标,发现 AR 组大鼠 SPOP 及 MyD88 泛素化表达降低,而 p-P65 及炎症因子水平升高。经木犀草素干预后,可通过上调 SPOP 表达促进 MyD88 泛素化,并降低 p-P65 及炎症因子水平。

值得注意的是,SPOP 作为炎症的关键调控因子,其作用位点位于信号通路上游,通过 K48 连接的 MyD88 泛素化修饰实现炎症反应的负向调控^[22]。为验证 SPOP 在 AR 病理中的核心作用,本研究通过大鼠鼻腔给予包含 AAV-shRNA-SPOP 的脂质体与质粒混合物成功使鼻黏膜 SPOP 表达显著降低。该基因沉默效应导致高剂量木犀草素无法显著改善 OVA 刺激诱导的行为学异常,进一步印证 SPOP 在 AR 病理机制中的关键地位。此外,AAV-shRNA-SPOP 不

仅抑制泛素化 MyD88 表达和 NF- κ B 活化,还导致炎症因子表达升高及 Th1/Th2 失衡,且木犀草素干预未能缓解炎症状态。这些结果表明,SPOP 缺失会引起 MyD88/NF- κ B 信号异常激活并诱发鼻黏膜炎症,而 SPOP 正是木犀草素发挥抗炎作用的主要靶标。

综上所述,木犀草素可通过 SPOP/MyD88/NF- κ B 通路抑制 NF- κ B 活化,改善 OVA 诱导的 AR 炎症损伤及 Th1/Th2 失衡。

参考文献

- [1] BERNSTEIN J A, BERNSTEIN J S, MAKOL R, et al. Allergic rhinitis: a review[J]. *Jama*, 2024, 331(10): 866.
- [2] ZHANG Y, LAN F, ZHANG L. Update on pathomechanisms and treatments in allergic rhinitis[J]. *Allergy*, 2022, 77(11): 3309-3319.
- [3] MAO G, ZHU Q, ZENG Y, et al. Exosomal LncRNA and CircRNA regulate peripheral blood mononuclear cell function through a competitive endogenous RNA mechanism in allergic rhinitis[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2025, 186(6): 509-521.
- [4] ZHU M, SUN Y, SU Y, et al. Luteolin: a promising multifunctional natural flavonoid for human diseases[J]. *Phytother Res*, 2024, 38(7): 3417-3443.
- [5] WANG S, WUNIQIEMU T, TANG W, et al. Luteolin inhibits autophagy in allergic asthma by activating PI3K/Akt/mTOR signaling and inhibiting Beclin-1-PI3KC3 complex[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 94: 107460.
- [6] LIU M, HU Z, WANG C, et al. The TLR/MyD88 signaling cascade in inflammation and gastric cancer: the immune regulatory network of *Helicobacter pylori*[J]. *J Mol Med*, 2023, 101(7): 767-781.
- [7] WANG L, ZHU J, MENG M, et al. Inhibition of the MyD88/NF- κ B pathway alters the Th1/Th2 balance to exacerbate liver injury and hepatic fibrosis in alveolar echinococcosis[J]. *FASEB J*, 2025, 39(6): e70472.
- [8] JIN X, SHI Q, LI Q, et al. CRL3-SPOP ubiquitin ligase complex suppresses the growth of diffuse large B-cell lymphoma by negatively regulating the MyD88/NF- κ B signaling[J]. *Leukemia*, 2020, 34(5): 1305-1314.
- [9] ZHANG J J, HE X C, ZHOU M, et al. Xiao-Qing-long-Tang ameliorates OVA-induced allergic rhinitis by inhibiting ILC2s through the IL-33/ST2 and JAK/STAT pathways[J]. *Phytomedicine*, 2023, 119: 155012.
- [10] TAMASAUSKIENE L, GASIUNIENE E, SITKAUSKIENE B. Translation, adaption and validation of the total nasal symptom score (TNSS) for Lithuanian population [J]. *Health Qual Life Outcomes*, 2021, 19(1): 54.
- [11] ZHOU Y, CHEN B, FU Y, et al. Cang-ai volatile oil alleviates nasal inflammation via Th1/Th2 cell imbalance regulation in a rat model of ovalbumin-induced allergic rhinitis[J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1332036. (下转第 398 页)

• 论 著 •

血清 AFP 联合 PTX3、sAxl 水平对慢性乙型肝炎 相关肝细胞癌的诊断价值*

田晓华^{1,2}, 刘小芳², 杨 慧^{1△}

1. 山西医科大学第一医院感染病科, 山西太原 030001; 2. 吕梁市人民医院感染性疾病科, 山西吕梁 033000

摘要:目的 探讨血清甲胎蛋白(AFP)联合正五聚蛋白 3(PTX3)、可溶性 Anexelexto(sAxl)水平对慢性乙型肝炎相关肝细胞癌(CHB-HCC)的诊断价值。方法 选取 2022 年 1 月至 2024 年 12 月吕梁市人民医院收治的 CHB-HCC 患者 100 例为 CHB-HCC 组,根据中国肝癌分期将其分为 I 期组 20 例、II 期组 17 例、III 期组 22 例、IV 期组 41 例。另按照 1:1 比例选取同期收治的肝硬化患者 100 例为肝硬化组、乙型肝炎病毒(HBV)感染患者 100 例为 HBV 组和体检健康者 100 例为对照组。采用酶联免疫吸附试验检测血清 AFP、PTX3、sAxl 水平,通过多因素 Logistic 回归分析 CHB-HCC 的影响因素,采用受试者工作特征(ROC)曲线分析和计算曲线下面积(AUC)评价血清 AFP、PTX3、sAxl 水平对 CHB-HCC 的诊断价值。结果 AFP、PTX3、sAxl 水平在 HCC 组、肝硬化组、HBV 组、对照组中依次降低($P < 0.05$)。血清 PTX3、sAxl 水平在 I 期组、II 期组、III 期组、IV 期组中依次升高($P < 0.05$)。AFP($OR = 1.017, 95\%CI 1.004 \sim 1.031$)、PTX3($OR = 1.412, 95\%CI 1.240 \sim 1.608$)、sAxl($OR = 1.519, 95\%CI 1.288 \sim 1.792$)为 CHB-HCC 的独立危险因素($P < 0.05$)。血清 AFP、PTX3、sAxl 水平诊断 CHB-HCC 的 AUC 分别为 0.832、0.860、0.888,PTX3+sAxl 诊断 CHB-HCC 的 AUC 大于血清 PTX3、sAxl 单独诊断($P < 0.05$),AFP+PTX3+sAxl 诊断 CHB-HCC 的 AUC 大于血清 AFP、PTX3、sAxl 和 PTX3+sAxl 诊断($P < 0.05$)。结论 血清 AFP、PTX3、sAxl 水平升高为 CHB-HCC 的独立危险因素,在 AFP 基础上联合 PTX3、sAxl 能提升 CHB-HCC 的诊断价值。

关键词:慢性乙型肝炎相关肝细胞癌; 甲胎蛋白; 正五聚蛋白 3; 可溶性 Anexelexto; 诊断价值

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2026.04.002 **中图法分类号:**R735.7

文章编号:1673-4130(2026)04-0393-06 **文献标志码:**A

Diagnostic value of serum AFP combined with PTX3 and sAxl levels in chronic hepatitis B-related hepatocellular carcinoma*

TIAN Xiaohua^{1,2}, LIU Xiaofang², YANG Hui^{1△}

1. Department of Infectious Diseases, First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China; 2. Department of Infectious Diseases, Lyuliang People's Hospital, Lyuliang, Shanxi 033000, China

Abstract: Objective To investigate the diagnostic value of serum alpha-fetoprotein (AFP) combined with pentraxin 3 (PTX3) and soluble Anexelexto (sAxl) in chronic hepatitis B-related hepatocellular carcinoma (CHB-HCC). **Methods** A total of 100 patients with CHB-HCC admitted to Lyuliang People's Hospital from January 2022 to December 2024 were selected as the CHB-HCC group. According to the China Liver Cancer staging, the patients were divided into stage I group (20 cases), stage II group (17 cases), stage III group (22 cases) and stage IV group (41 cases). According to the ratio of 1:1, 100 patients with liver cirrhosis who were admitted during the same period were selected as the liver cirrhosis group, 100 patients with hepatitis B virus (HBV) infection were selected as the HBV group, and 100 healthy people were selected as the control group. Serum AFP, PTX3 and sAxl levels were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Multivariate Logistic regression was used to analyze the influencing factors of CHB-HCC. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis and area under the curve (AUC) were used to evaluate the diagnostic value of serum AFP, PTX3 and sAxl levels for CHB-HCC. **Results** The levels of AFP, PTX3, and sAxl were decreased in the HCC group, the cirrhosis group, the HBV group, and the control group in turn ($P < 0.05$). The levels of ser-

* 基金项目:山西省青年科技研究基金项目(202301D321258)。

作者简介:田晓华,女,主治医师,主要从事慢性乙型肝炎相关研究。△ 通信作者,E-mail:sydyyyh@163.com。