

· 临床论著 ·

膝关节骨性关节炎患者软骨组织中 α 激酶1的表达变化及意义

耿庆贺^{1,2}, 兰俊赞³, 王申⁴, 衡科⁵, 宋星辰¹, 聂培如⁶, 张环宇¹, 刘艳红¹, 郭依龙¹

1. 徐州医科大学附属邳州医院中心实验室 徐州医科大学骨质疏松症临床研究重点实验室, 江苏 邳州 221300;

2. 徐州医科大学附属邳州医院骨科, 江苏 邳州 221300; 3. 青海省兴海县人民医院外科, 青海 海南州 813300;

4. 北京大学医学部, 北京 100000; 5. 南京医科大学附属常州二院骨科, 江苏 常州 213000;

6. 南京医科大学康达学院, 江苏 连云港 222000

摘要: **目的** 探讨 α 激酶家族成员之一的 α 激酶1(ALPK1)在膝关节骨性关节炎(OA)的软骨组织中的表达变化及意义。**方法** 回顾性选择2018年7月至2022年10月于徐州医科大学附属邳州医院因膝关节OA住院手术的25例患者,收集患者膝关节软骨组织标本。另选择该院生物样品库中10例因创伤行“下肢截肢术”患者的胫骨平台软骨作为对照。采用免疫组化染色、Western blotting、实时定量PCR(RT-qPCR)检测ALPK1在软骨中的表达变化。**结果** 免疫组化染色、Western blotting及RT-qPCR检测结果显示,与对照组相比,膝关节OA患者软骨中ALPK1 mRNA表达水平(2.126 ± 0.930 vs 0.995 ± 0.049 , $t=4.112$, $P<0.01$)、蛋白表达水平(1.880 ± 0.722 vs 1.025 ± 0.062 , $t=3.706$, $P<0.01$)和免疫组化阳性细胞率($P<0.01$)均显著增高,差异有统计学意义。**结论** 膝关节OA患者软骨中ALPK1呈现高表达,ALPK1表达增加可能是关节软骨炎性增加、软骨破坏的原因之一。ALPK1有望作为膝关节OA的诊断标志物和治疗靶标。

关键词: 骨关节炎; 软骨; α 激酶1; 标志物; 靶标

中图分类号: R684.3 文献标识码: A 文章编号: 1674-8182(2024)01-0085-04

Changes and significance of α kinase 1 expression in cartilage tissue of patients with knee osteoarthritis

GENG Qinghe*, LAN Junyun, WANG Shen, HENG Ke, SONG Xingchen, NIE Peiru, ZHANG Huanyu, LIU Yanhong, GUO Yilong

* Central Laboratory, Pizhou Hospital Affiliated to Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221300, China

Corresponding author: GUO Yilong, E-mail: guoyilong888@163.com

Abstract: **Objective** To investigate the expression changes and significance of α kinase 1 (ALPK1), a member of the α kinase family, in cartilage tissue of knee osteoarthritis (OA). **Methods** Twenty-five patients who underwent knee OA surgery in Pizhou Hospital affiliated to Xuzhou Medical University from July 2018 to October 2022 were retrospectively selected, and cartilage tissue samples of the patients' knee joints were collected. In addition, the tibial plateau cartilage of 10 patients who underwent lower limb amputation due to trauma in the biological sample of the hospital was selected as the control. Immunohistochemical (IHC) staining, Western blotting and real-time quantitative PCR (RT-qPCR) were used to detect the expression of ALPK1 in cartilage. **Results** The results of IHC staining, Western blotting and RT-qPCR showed that compared with the control group, the mRNA expression level of ALPK1 (2.126 ± 0.930 vs 0.995 ± 0.049 , $t=4.112$, $P<0.01$), protein expression level (1.880 ± 0.722 vs 1.025 ± 0.062 , $t=3.706$, $P<0.01$) and IHC-positive cell rate ($P<0.01$) in the cartilage of knee OA patients were significantly increased. **Conclusion** The high expression of ALPK1 in cartilage of patients with knee OA may be one of the reasons for the increase of inflammation

DOI: 10.13429/j.cnki.cjcr.2024.01.018

基金项目: 中国国家博士后基金面上项目(2020M681739); 江苏省卫健委医学科研项目(LKM2022048, Z2021046); 徐州市科技局科研项目(KC22273); 徐州医科大学江苏省重点实验室开放课题(XZSYSKF2020004, XZSYSKF2020033)

通信作者: 郭依龙, E-mail: guoyilong888@163.com

出版日期: 2024-01-20

and destruction of articular cartilage. ALPK1 is expected to be a diagnostic marker and therapeutic target of knee OA.

Keywords: Osteoarthritis; Cartilage; α kinase 1; Markers; Target

Fund program: General Program of National Postdoctoral Foundation of China (2020M681739); Medical Research Project of Jiangsu Provincial Health Commission (LKM2022048, Z2021046); Research Project of Xuzhou Science and Technology Bureau (KC22273); Open Project of Jiangsu Provincial Key Laboratory of Xuzhou Medical University (XZSYSKF202004, XZSYSKF2020033)

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 作为一种中老年人群中高度流行的退行性关节疾病,是发达国家十大致残疾病之一,目前全世界有 2.5 亿人患有 OA^[1]。OA 的特点是进行性关节退化,包括软骨退化、滑膜炎、骨赘形成和关节畸形^[2]。OA 可导致关节疼痛、功能障碍。年龄、创伤、营养、遗传倾向、机械负荷异常、养分供应短缺等诸多因素均可导致 OA 发生。但是,仍然无法得知确切的发病机制,缺少有效阻断疾病发展的手段。目前临床用于治疗 OA 的药物仅仅只能够缓解关节疼痛、减轻症状,病情无法得到根本性改善,严重影响患者的健康和生活质量。因此,发现 OA 的发病机制,并在此基础上开展新的治疗措施对治疗 OA 意义重大。 α 激酶 1 (α kinase 1, ALPK1) 是 α 激酶家族的成员,已被证明参与介导炎症反应并与痛风密切相关^[3],但其对 OA 的作用尚未得知。本研究对 20 例行膝关节置换术患者的 OA 软骨组织及 10 例正常软骨组织作为对照进行研究,旨在探讨 ALPK1 在 OA 软骨中的表达变化,以期为临床治疗 OA 提供新的思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料 回顾性收集 2018 年 7 月至 2022 年 10 月于徐州医科大学附属邳州医院骨科行人工膝关节置换的 25 例 OA 患者的胫骨平台软骨组织 (OA 组)。25 例 OA 患者中,男 5 例,女 20 例,年龄 61~75 (68.00±3.86) 岁。同时采用该院生物样品库内创伤科因外伤截肢的 10 例患者 (无任何类型的关节疾病) 的健康膝关节胫骨平台样本作为对照组。截肢后 2 h 内取出胫骨平台,立即置于 -80 °C 的液氮中保存。10 例截肢患者中,男 2 例,女 8 例,年龄 60~74 (66.00±4.90) 岁。所有研究对象均签署知情同意书,本研究经徐州医科大学附属邳州医院伦理委员会批准 (伦审批件号:2023-02-001)。

1.2 入组标准 (1) 对照组入组标准:因外伤截肢;膝关节无明显外伤;年龄大于 60 岁。(2) OA 组入组标准:患者均符合美国风湿病协会 1995 年修订的 OA 诊断标准;年龄大于 60 岁。

1.3 排除标准 (1) 合并化脓性关节炎、风湿或类风湿性关节炎或代谢性骨病;(2) 合并骨肿瘤;(3) 近半年内服用影响骨重塑的药物者;(4) 合并全身系统性疾病;(5) 未包含足够的软骨胫骨平台 (软骨板和软骨下小梁骨的总厚度 < 5 mm) 者。

1.4 实时定量 PCR (RT-qPCR) 检测 ALPK1 mRNA 的表达 取 0.5 cm×1.0 cm 大小的 OA 胫骨平台软骨组织和正常膝关节胫骨平台软骨组织样本,于液氮中充分研磨,分别加入 1 mL Trizol (美国,赛默飞) 提取胫骨平台组织总 RNA,使用 SuperScript™ First-Strand Synthesis System (美国,赛默飞) 反转录为 cDNA。以 cDNA 为模板,行 RT-qPCR 检测。以 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析 ALPK1 相对表达水平。

1.5 Western Blot 检测 ALPK1 蛋白的表达 取胫骨平台软骨组织标本,NS 清洗干净后剪碎,于液氮中研磨成粉末状。加入裂解液抽提蛋白。使用 BCA 法测定蛋白浓度。按照每孔蛋白总上样量 30 μ g 加入凝胶泳道进行电泳、转膜;加入 ALPK1 兔抗人单克隆抗体 (1 : 500)、GAPDH 兔抗人单克隆抗体 (1 : 2 000),4 °C 孵育过夜;加入 Biotin 标记的羊抗兔二抗 (1 : 1 000),室温下孵育。洗膜后显影。使用 Image J 软件,计算 ALPK1 条带与 GAPDH 条带灰度值的比值,求得 ALPK1 蛋白相对表达量。ALBK1 (ab236626) 和 GAPDH (ab9485) 均购自 Abcam 公司。

1.6 免疫组化 石蜡切片常规脱蜡、流水冲洗;高压蒸汽修复抗原。4% H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶;滴加马血清 50 μ L 进行封闭;滴加 100 μ L 一抗 ALPK1 (1 : 500, ab197801, Abcam 公司) 工作液于组织上,4 °C 冰箱孵育过夜;按照免疫组化试剂盒 (PK-6 200 VECTASTAIN Elite ABC-HRP Kit, Vector Laboratories, 美国) 及 DAB 显色试剂盒 (Biosharp, 上海) 操作说明,行免疫组化染色。使用 Leica 显微镜,在 40× 镜下观察、拍照,ALPK1 阳性细胞呈棕黄色染色,阳性率 = 阳性细胞数 / 总细胞数 × 100%。

1.7 统计学方法 采用 Graphpad 9.0 (GraphPad, CA, USA) 软件进行统计分析。计数资料用例表示,组间比较采用 Fisher 确切概率检验;符合正态分布的

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者一般情况 两组性别、年龄、身体质量指数 (BMI) 指数差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1。

2.2 两组软骨中 ALPK1 mRNA 表达情况 RT-qPCR 检测结果显示, 与对照组比较, OA 组软骨中 ALPK1 mRNA 相对表达水平升高 ($P < 0.01$), 见表 2。

2.3 各组软骨中 ALPK1 蛋白表达情况 Western blotting 检测结果显示, 与对照组比较, OA 组软骨中 ALPK1 蛋白表达水平升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 详细结果见表 2, 典型蛋白条带见图 1A。

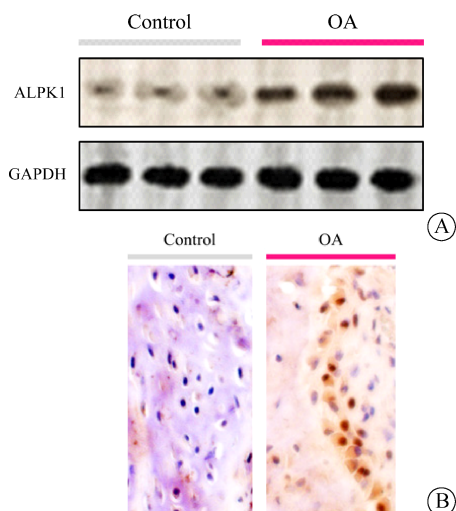
2.4 各组软骨中 ALPK1 免疫组化结果 ALPK1 免疫组化染色结果显示, 与对照组比较, OA 组软骨中阳性细胞率明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 详细结果见表 2, 典型免疫组化图见图 1B。

表 1 两组患者一般情况

Tab. 1 General information of patients between two groups

组别	例数	男/女(例)	年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	BMI(kg/cm ² , $\bar{x} \pm s$)
对照组	10	2/8	68.00±3.86	29.46±1.66
OA组	25	5/20	66.00±4.90	30.29±1.54
t 值			1.152	1.410
P 值		1.000 ^a	0.255	0.166

注: 表示采用 Fisher 确切概率检验。



注: A 为 AKPK1 蛋白表达电泳图; B 为免疫组化结果($\times 40$)。

图 1 两组患者膝关节软骨 AKPK1 蛋白表达电泳图和免疫组化图

Fig. 1 Electrophoresis and IHC staining of AKPK1 protein expression in knee cartilage of two groups

表 2 两组患者膝关节软骨中 ALPK1 的 mRNA、蛋白表达水平及免疫组化情况

Tab. 2 The mRNA and protein expression levels and immunohistochemistry of ALPK1 in knee joint cartilage between two groups of patients

组别	例数	ALPK1 mRNA 表达	ALPK1 蛋白表达	免疫组化阳性率(%)
对照组	10	0.995±0.049	1.025±0.062	5.570±0.770
OA组	25	2.126±0.930	1.880±0.722	12.06±5.152
t 值		4.112	3.706	3.931
P 值		<0.01	<0.01	<0.01

3 讨论

在健康人体内, 关节软骨合成以及分解一直维系着精妙的动态平衡, 从而保证关节功能稳定。如果这一动态平衡被打破, 就会引起各种各样的临床症状。细胞外基质的逐步分解和关节软骨加速丢失被认为是 OA 主要原因及特点^[4]。随着人群老龄化, OA 已成为导致全球老年人残疾的重要因素。因为对 OA 的发病机制仍不十分清楚, 目前对 OA 的治疗仅能控制症状, 不能彻底治愈, 故研究 OA 的发病机制对预防、减缓及治疗 OA 具有积极的意义。

ALPK1 是新发现的 α 激酶家族的成员, 参与介导该蛋白运输、肌球蛋白 IIA 磷酸化和肿瘤坏死因子 (TNF)- α 分泌^[5]。ALPK1 已证实与痛风密切相关^[4], 痛风是一种慢性关节炎, 为高尿酸血症相关尿酸钠 (MSU) 晶体诱导的关节炎反应^[6]。痛风患者的白细胞中 ALPK1 水平高于健康人。在培养的人单核细胞白血病细胞系和人胚肾细胞中, ALPK1 上调细胞因子的产生, 包括白介素 (IL)-1 β 、TNF- α 和 IL-8^[7]。ALPK1 促进 TNF 受体相关因子 (TRAF) 与叉头相关结构域 (TIFA) 相互作用蛋白形成复合物并激活转录因子核因子 κ B (NF- κ B), 加速 IL-8 的产生对感染的反应^[8-10]。ALPK1 敲除小鼠在感染刺激后表现出抑制的炎症反应, IL-8 和 TNF- α 下调^[11-12]。此外, 新的证据表明 ALPK1 与患有某些慢性疾病有关, 包括癌症^[13-14]、慢性肾病^[15] 和 2 型糖尿病^[16]。考虑到 ALPK1 在炎症和先天免疫中的重要调节作用, 有理由假设 ALPK1 参与 OA 期间关节软骨的降解。

迄今为止, ALPK1 已被证明在细菌感染的先天免疫应答中, 具有促进炎性细胞因子的作用^[10-11]。以往研究集中于 ALPK1 在微生物感染中的促炎反应。ALPK1 已被作为病原体相关分子模式 (PAMP) 经典模式识别受体^[17-19]。本研究结果表明 OA 患者关节软骨中 ALPK1 升高, 因为 OA 是一种非细菌性炎症性疾病, OA 期间产生的某些损伤相关分子模式

(DAMP),可能是关节软骨中 ALPK1 的潜在刺激因子,仍需进一步研究。NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3) 信号传导在 OA 中发挥作用,产生降解酶和促炎细胞因子,包括基质金属蛋白酶 3 (MMP-3)、IL-1 β 和 TNF- α ,它们能够促使软骨变性和滑膜炎^[20]。以往研究证明,ALPK1 能够通过 NF- κ B/NLRP3 信号通路促进软骨细胞分解^[21]。在关节炎模型小鼠的关节内给药重组人 ALPK1,加剧了关节炎,而 ALPK1 敲除则能够逆转这一过程^[21]。体外研究表明 ALPK1 通过增加 NLRP3 的产生,一种驱动 IL-1 β 介导的炎症状态的炎症小体传感器,加重软骨细胞的代谢紊乱。总之,这些结果证明 ALPK1 是一种新的分解代谢产物并且靶向该信号可能是 OA 的一种有前途的治疗策略^[21]。

本研究发现,与无 OA 的同龄人群相比,OA 患者膝关节软骨内 ALPK1 在 mRNA 水平和蛋白水平呈高表达;ALPK1 免疫组化染色显示,OA 患者关节软骨内阳性细胞明显增加。ALPK1 表达增加可能是蛋白降解酶活性增强及软骨微结构改变的原因之一,需进一步在细胞培养和动物模型中利用抑制剂加以验证,以期为 OA 的早期诊断及治疗提供更多的参考依据。

利益冲突 无

参考文献

- [1] Hunter DJ, Bierma-Zeinstra S. Osteoarthritis [J]. Lancet, 2019, 393(10182): 1745-1759.
- [2] Glyn-Jones S, Palmer AR, Agricola R, et al. Osteoarthritis [J]. Lancet, 2015, 386(9991): 376-387.
- [3] Ko AM, Tu HP, Liu TT, et al. ALPK1 genetic regulation and risk in relation to gout [J]. Int J Epidemiol, 2013, 42(2): 466-474.
- [4] Peng Z, Sun H, Bunpetch V, et al. The regulation of cartilage extracellular matrix homeostasis in joint cartilage degeneration and regeneration [J]. Biomaterials, 2021, 268: 120555.
- [5] Lee CP, Chiang SL, Ko AM, et al. ALPK1 phosphorylates myosin IIA modulating TNF- α trafficking in gout flares [J]. Sci Rep, 2016, 6: 25740.
- [6] Dalbeth N, Gosling AL, Gaffo A, et al. Gout [J]. Lancet, 2021, 397(10287): 1843-1855.
- [7] Kuo TM, Hsu HT, Chung CM, et al. Enhanced alpha-kinase 1 accelerates multiple early nephropathies in streptozotocin-induced hyperglycemic mice [J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1862(11): 2034-2042.
- [8] Milivojevic M, Dangeard AS, Kasper CA, et al. ALPK1 controls TIFA/TRAF6-dependent innate immunity against heptose-1, 7-bisphosphate of gram-negative bacteria [J]. PLoS Pathog, 2017, 13(2): e1006224.
- [9] Zimmermann S, Pfannkuch L, Al-Zeer MA, et al. ALPK1- and TIFA-dependent innate immune response triggered by the *Helicobacter pylori* type IV secretion system [J]. Cell Rep, 2017, 20(10): 2384-2395.
- [10] Bauer M, Nascakova Z, Mihai AI, et al. The ALPK1/TIFA/NF- κ B axis links a bacterial carcinogen to R-loop-induced replication stress [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 5117.
- [11] Zhou P, She Y, Dong N, et al. Alpha-kinase 1 is a cytosolic innate immune receptor for bacterial ADP-heptose [J]. Nature, 2018, 561(7721): 122-126.
- [12] Brooks P, Zur Bruegge T, Boyle EC, et al. CD14 and ALPK1 affect expression of tight junction components and proinflammatory mediators upon bacterial stimulation in a colonic 3D organoid model [J]. Stem Cells Int, 2020, 2020: 4069354.
- [13] Chen PK, Hua CH, Hsu HT, et al. ALPK1 expression is associated with lymph node metastasis and tumor growth in oral squamous cell carcinoma patients [J]. Am J Pathol, 2019, 189(1): 190-199.
- [14] Rashid M, van der Horst M, Mentzel T, et al. ALPK1 hotspot mutation as a driver of human spiradenoma and spiradenocarcinoma [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 2213.
- [15] Lee CP, Nithiyantham S, Hsu HT, et al. ALPK1 regulates streptozotocin-induced nephropathy through CCL2 and CCL5 expressions [J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(11): 7699-7708.
- [16] Yamada Y, Matsui K, Takeuchi I, et al. Association of genetic variants of the α -kinase 1 gene with type 2 diabetes mellitus in a longitudinal population-based genetic epidemiological study [J]. Biomed Rep, 2015, 3(3): 347-354.
- [17] Garcia-Weber D, Arrieumerlou C. ADP-heptose: a bacterial PAMP detected by the host sensor ALPK1 [J]. Cell Mol Life Sci, 2021, 78(1): 17-29.
- [18] Garcia-Weber D, Dangeard AS, Cornil J, et al. ADP-heptose is a newly identified pathogen-associated molecular pattern of *Shigella flexneri* [J]. EMBO Rep, 2018, 19(12): e46943.
- [19] Pfannkuch L, Hurwitz R, Traulsen J, et al. ADP heptose, a novel pathogen-associated molecular pattern identified in *Helicobacter pylori* [J]. FASEB J, 2019, 33(8): 9087-9099.
- [20] McAllister MJ, Chemaly M, Eakin AJ, et al. NLRP3 as a potentially novel biomarker for the management of osteoarthritis [J]. Osteoarthr Cartil, 2018, 26(5): 612-619.
- [21] Liu X, Zhao J, Jiang H, et al. ALPK1 Accelerates the Pathogenesis of Osteoarthritis by Activating NLRP3 Signaling [J]. J Bone Miner Res, 2022, 37(10): 1973-1985.

收稿日期:2023-06-11 修回日期:2023-07-24 编辑:石嘉莹