HIPK2 调控 NF-κB/MAPK 影响骨关节炎软骨凋亡炎症

白春礼[1]　马 钢[2*]
1. 内蒙古科技大学包头医学院第二附属医院　内蒙古包头　014000
2. 内蒙古医科大学第二附属医院　内蒙古呼和浩特　010030

摘　要：本研究旨在基于临床组织样本，探讨 HIPK2（同源结构域相互作用蛋白激酶 2）在骨关节炎（OA）发生发展中的表达特征及其与 NF-κB 和 MAPKs 信号通路活性和炎症反应的相关性。通过收集 35 例 OA 患者膝关节置换术中的退变软骨组织及 15 例创伤患者的正常软骨组织作为对照，采用 qRT-PCR、Western Blot、免疫组织化学及组织染色技术进行分析。结果显示，与正常对照组相比，OA 退变软骨组织中 HIPK2 的 mRNA 和蛋白表达水平显著升高。同时，NF-κB p65 和 p38 MAPK 的磷酸化水平（p-p65、p-p38）以及下游炎症因子 IL-1β、TNF-α、IL-6 的表达亦显著上调，而总 p65 和总 p38 蛋白表达无显著变化。组织学观察证实 OA 组软骨出现表面不平、基质丢失等典型退行性改变。结果表明，在 OA 病变软骨中，HIPK2 表达上调，且与 NF-κB/MAPKs 信号通路过度激活及炎症反应增强密切相关。本研究为理解 HIPK2 在 OA 临床病理进程中的作用提供了直接的组织学证据。

关键词：HIPK2；骨关节炎；NF-κB 信号通路；MAPKs 信号通路

1 立题背景与目的意义

1.1 立题背景

骨关节炎（OA）是一种以关节软骨退变、软骨下骨硬化、滑膜炎症为主要特征的退行性关节疾病，严重影响着中老年人群的生活质量。OA 的发病机制复杂，其中关节内持续的慢性低度炎症反应是推动软骨降解和疾病进展的核心环节。NF-κB 和 MAPKs 信号通路作为细胞内关键的炎症调控枢纽，其异常激活可显著促进炎症因子（如 IL-1β、TNF-α、IL-6）的表达，进而加剧软骨细胞外基质分解和细胞功能紊乱，在 OA 病理过程中扮演关键角色。HIPK2 作为一种核内丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶，参与调控细胞应激、凋亡和炎症反应等多种生物学过程。近年来有研究提示，HIPK2 可能通过调节转录因子活性影响炎症信号通路，但其在 OA 患者关节软骨这一特定病理环境中的表达状态及与 NF-κB/MAPKs 通路的具体关系尚不明确[1]。因此，基于临床组织样本，系统研究 HIPK2 在 OA 软骨中的表达及其与上述关键炎症通路的相关性，对于从临床病理层面阐明 OA 机制具有重要意义。

1.2 目的意义

本研究旨在明确 HIPK2 在 OA 患者退变软骨组织与正常软骨组织中的表达差异，并探究其表达变化是否与 NF-κB/MAPKs 信号通路关键蛋白的磷酸化激活状态及下游炎症因子水平相关。通过直接对比分析临床来源的 OA 病变组织与对照组织，本研究期望从组织病理学、分子表达水平揭示 HIPK2 在 OA 自然病程中的潜在作用，为将 HIPK2 确立为 OA 相关的生物标志物或潜在干预靶点提供临床前研究依据。

2 所用材料与方法

2.1 实验材料与样本来源

软骨组织样本来源于我院 2023 年 1 月至 2023 年 6 月期间的手术病例。实验组（OA 组）：共 35 例，为因重度原发性膝骨关节炎行全膝关节置换术患者术中获取的退行性变性软骨组织。对照组（Normal 组）：共 15 例，为同期因胫骨平台粉碎性骨折或股骨髁上骨折行切开复位内固定术，且术中所见关节软骨面完好、无退变迹象的创伤患者术中剩余的少量正常软骨组织。所有患者均排除其他炎性关节病、感染及系统性疾病。本研究经医院伦理委员会批准，所有样本获取均知情同意。

主要试剂：RNA 提取试剂（Vazyme），qRT-PCR 相关试剂盒（Vazyme），Western Blot 一抗（针对 HIPK2、p65 NF-κB、p-p65 NF-κB、p38 MAPK、p-p38 MAPK、IL-6、TNF-α、IL-1β、GAPDH/Tubulin，购自 CST 等公司），

免疫组化试剂盒，番红 O- 固绿染液，HE 染液等。

2.2 方法

2.2.1 样本处理与分组

所有软骨组织样本均在获取后立即进行处理，以确保生物分子的完整性。样本经无菌 PBS（北京索莱宝，P1020）漂洗后，在冰上精细分割。

第一部分（约 100 mg）用于分子生物学检测，迅速置于冻存管中，投入液氮（Haier 液氮罐）中快速冷冻，随后转移至 -80℃超低温冰箱（Haier DW-86LT26G）保存，以备后续总 RNA 与总蛋白提取。

第二部分用于组织形态学分析。组织块经 4% 多聚甲醛（国药集团）充分固定后，使用 EDTA 脱钙液（北京索莱宝，C1033）进行脱钙处理。随后，组织经梯度乙醇脱水、二甲苯透明，并最终用石蜡包埋（使用武汉俊杰 JB-P5 包埋机）。包埋好的组织块使用徕卡 RM2016 切片机连续切片，厚度为 4 μm，贴于防脱载玻片上，并于 65℃烘箱（上海慧泰 DHG-9140A）中烘烤。制备好的切片分别用于后续的 HE 染色、番红 O- 固绿染色及免疫组织化学染色。

此处理流程确保了同一样本的分子表达数据与其组织病理学特征能够进行有效关联与分析。

2.2.2 检测指标与方法

（1）组织形态学观察：对石蜡切片分别进行 HE 染色和番红 O- 固绿染色，于光学显微镜下观察并比较两组软骨组织的结构完整性、软骨细胞形态与分布、基质着色情况。

（2）基因表达检测：采用 Trizol 法提取组织总 RNA，逆转录后，使用 qRT-PCR 法检测 HIPK2、p65 NF-κB、p38 MAPK、IL-1β、TNF-α、IL-6 的 mRNA 相对表达量，内参为 GAPDH。

（3）蛋白表达与磷酸化水平检测：采用 Western Blot 法检测组织中 HIPK2、总 p65、磷酸化 p65 (p-p65)、总 p38、磷酸化 p38 (p-p38) 及 IL-1β、TNF-α、IL-6 的蛋白表达水平。

（4）组织原位蛋白检测：采用 ** 免疫组织化学法 ** 检测石蜡切片中 HIPK2、p-p65 NF-κB、p-p38 MAPK、IL-1β、TNF-α、IL-6 蛋白的表达与定位。

2.3 统计学方法

实验数据以均数 ± 标准差（\(\bar{x} \pm s\)）表示。使用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。两组间比较采用独立样本 t 检验。以 \(P < 0.05\) 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 软骨组织形态学比较

通过实验得出，HE 染色与番红 O- 固绿染色结果一致。对照组软骨表面光滑，软骨细胞形态规则，分布均匀，软骨基质番红 O 着色均匀深染，结构层次清晰。OA 组软骨则呈现典型病理改变：表面粗糙不平，出现多处裂隙；软骨细胞排列紊乱，细胞簇集现象明显；细胞外基质严重丢失，番红 O 着色显著减弱甚至缺失。表明 OA 组软骨发生了明确的退行性结构破坏。

3.2 HIPK2 及炎症通路相关分子 mRNA 表达水平

qRT-PCR 检测结果（表 1）显示，与对照组相比，OA 组软骨组织中促炎因子 IL-1β、TNF-α、IL-6 的 mRNA 表达水平均显著升高（P<0.01）。同时，HIPK2 的 mRNA 表达水平在 OA 组中也显著上调（P<0.05）。然而，总 p65 NF-κB 与总 p38 MAPK 的 mRNA 表达在两组间无统计学差异（P>0.05）。

表 1 两组软骨组织 mRNA 相对表达水平比较 (n= 每组样本数)

组别	IL-1β	TNF-α	IL-6	HIPK2	p65 NF-κB	p38 MAPK
对照组	1.00 ± 0.20	1.00 ± 0.18	1.00 ± 0.22	1.00 ± 0.15	1.00 ± 0.12	1.00 ± 0.10
OA 组	5.82 ± 1.05**	6.15 ± 1.20**	4.95 ± 0.88**	2.31 ± 0.40*	1.12 ± 0.25	1.08 ± 0.20

注：与对照组比较，*P<0.05, **P<0.01。

3.3 HIPK2、磷酸化信号蛋白及炎症因子蛋白表达水平

Western Blot 及免疫组化结果相互印证（表 2）。在蛋白水平上，OA 组软骨组织中 HIPK2 的蛋白表达量显著高于对照组。更重要的是，NF-κB 和 MAPKs 通路的关键激活形式——磷酸化 p65 (p-p65) 和磷酸化 p38 (p-p38) 的蛋白水平在 OA 组中均显著上调（P<0.01），而两者的总蛋白（p65, p38）表达量在组间无差异。与此一致，下游炎症效应蛋白 IL-1β、TNF-α、IL-6 在 OA 组中的表达也显著增强（P<0.01）。免疫组化染色进一步显示，这些高表达的蛋白主要定位于 OA 软骨细胞的胞浆和 / 或胞核中。

表 2 两组软骨组织蛋白相对表达水平比较（代表性条带灰度值分析）

组别	HIPK2	p-p65 / p65	p-p38 / p38	IL-1β	TNF-α	IL-6
对照组	0.22 ± 0.05	0.15 ± 0.03	0.18 ± 0.04	0.30 ± 0.06	0.25 ± 0.05	0.28 ± 0.06
OA 组	0.85 ± 0.12**	0.80 ± 0.11**	0.78 ± 0.10**	1.20 ± 0.15**	1.05 ± 0.14**	1.12 ± 0.16**

注：与对照组比较，**P<0.01。

4 讨论

4.1 HIPK2 在 OA 软骨组织中表达上调的病理意义

本研究首次在临床组织样本层面系统报告了 HIPK2 在 OA 退变软骨中的表达特征。与既往部分体外研究推测 HIPK2 可能发挥保护作用的观点不同，我们的数据显示，在 OA 实际病变环境中，HIPK2 在 mRNA 和蛋白水平均显著上调。HIPK2 作为对 DNA 损伤和氧化应激等多种细胞应激敏感的激酶，其表达上调可能反映了 OA 软骨细胞处于一种持续的应激状态 [2]。这种上调可能是细胞试图应对炎症和分解代谢压力的适应性反应，也可能其本身参与了推动病理进程的信号传导。本研究结果提示，HIPK2 在 OA 中的作用可能具有细胞微环境或疾病阶段特异性，其在临床组织中的高表达状态值得重点关注。

4.2 HIPK2 表达与 NF-κB/MAPKs 通路过度激活及炎症微环境正相关

本研究的核心发现是，HIPK2 的上调与 NF-κB 和 p38 MAPK 信号通路的磷酸化激活（p-p65, p-p38）以及下游促炎因子（IL-1β, TNF-α, IL-6）的过量产生呈显著正相关。NF-κB 和 MAPKs 是介导 OA 关节炎症的两条核心信号轴，其磷酸化激活是功能启动的关键步骤。我们的数据显示总 p65 和 p38 蛋白未变，而磷酸化形式大幅增加，证实了通路被“激活”而非简单“表达增多”。HIPK2 与这些活化信号分子的同步上调，强烈提示二者之间存在功能关联 [3]。结合文献报道 HIPK2 可作为转录辅因子调节基因表达，我们推测在 OA 软骨细胞中，高表达的 HIPK2 可能通过直接或间接方式，促进了 NF-κB/MAPKs 信号轴的持续激活，进而放大了炎症级联反应，共同构成了推动软骨退变的重要分子基础 [4]。

4.3 研究的临床启示与未来方向

本研究从临床病理标本出发，将 HIPK2 的表达与 OA 经典的炎症通路活化联系起来，为其在 OA 中的作用提供了新的、更贴近疾病本质的视角。如果 HIPK2 确实是驱动 OA 炎症的关键因子之一，那么它可能成为一个有价值的疾病进展标志物或潜在的治疗靶点 [5]。然而，本研究属于相关性研究，尚不能确定 HIPK2 与 NF-κB/MAPKs 通路间的直接因果调控关系。未来需要利用基因编辑、抑制剂等手段，在细胞或动物模型中进行功能获得与缺失实验，以明确 HIPK2 在 OA 中的具体作用机制是促进还是抑制。同时，扩大样本量，分析 HIPK2 表达与患者临床症状、影像学分期等的相关性，将有助于进一步评估其临床价值。

5 结论

本研究证实，在骨关节炎患者退变的关节软骨组织中，HIPK2 的表达显著上调。其表达水平与 NF-κB p65 和 p38 MAPK 的磷酸化激活程度以及促炎因子 IL-1β、TNF-α、IL-6 的表达升高呈正相关。这些结果提示，HIPK2 可能与 OA 关节内的慢性炎症信号通路激活密切相关，参与了 OA 的病理发展进程。这为深入探索 OA 的分子机制及开发新的干预策略提供了新的线索和靶点。

参考文献：

[1] 白春礼 .HIPK2 介导 NF-κB/MAPKs 信号调节骨关节炎进展的机制研究 [D]. 内蒙古医科大学 ,2024.

[2] 孙一凡 . 同源结构域相互作用蛋白激酶 HPK-1/HIPK 调控秀丽隐杆线虫免疫的分子机制 [D]. 西北农林科技大学 ,2025.

[3] 叶锦霞 , 林亦欣 , 雷晓庆 , 等 . 透骨消痛胶囊调控泛凋亡延缓膝骨关节炎软骨细胞退变的机制 [J/OL]. 中国实验方剂学杂志 ,1-15[2025-12-11].

[4] 刘德仁 , 施蕾 , 刘江宇 , 等 . 杯苋甾酮对膝骨关节炎软骨细胞炎症和凋亡的抑制作用及机制 [J]. 中国病理生理杂志 ,2025,41(09):1775-1783.

[5] 杨坤 , 胡锋 , 闵慧 , 等 . 电热针调控 Wnt/PPARγ 信号通路对膝骨性关节炎大鼠滑膜炎症及软骨细胞凋亡的影响 [J]. 河北医药 ,2025,47(08):1253-1257.

作者简介：白春礼（1996—），男，蒙古族，硕士研究生，内蒙古兴安盟扎赉特旗，职称：医师，研究方向：骨科。

通讯作者：马钢（1977—），男，汉族，内蒙古巴彦淖尔市，博士研究生，职称：主任医师，研究方向：骨科学。

基金项目：（项目编号：YKD2022MS022 项目名称：HIPK2 介导 NF-kB/MAPKs 信号调节骨关节炎进展的机制研究）。