

• 论 著 •

CaR 调节 TRPC6 介导的自噬对软骨细胞 SOD 及 NOX2 的影响*

秦星星¹, 占承志¹, 陈俊¹, 胡丽¹, 张柘², 庞李贺¹, 吴剑^{1△}

(1. 湖北科技学院第一附属医院/咸宁市中心医院, 湖北咸宁 437100;

2. 湖北科技学院医学院, 湖北咸宁 437100)

[摘要] 目的 观察钙感受受体(CaR)调节瞬时感受器电位通道6(TRPC6)介导的自噬对软骨细胞超氧化物歧化酶(SOD)、NADPH 氧化酶-2(NOX2)的影响。方法 2023 年 7 月将出生 3~5 d SD 大鼠关节软骨用胶原酶消化后进行传代培养,取第 3 代培养的细胞接种于 96 孔板,用白细胞介素-1 β (10 ng/mL)诱导软骨细胞,分为对照组、CaR(10 μ g/L)组、U73122(5 μ g/L)组和 CaR(10 μ g/L)+U73122(5 μ g/L)组,共培养 24 h 后应用酶联免疫吸附试验检测各组上清液 SOD、NOX2 水平,采用实时定量-聚合酶链反应检测各组 SOD、NOX2、人自噬基因 Beclin-1 mRNA 表达,Western-blot 检测 SOD、NOX2、Beclin-1 蛋白表达。结果 原代关节软骨细胞在显微镜下呈三角形或不规则形或多角形,分布稀疏,培养 24 h 后可见贴壁生长;第 3 代软骨细胞显示其蓝染的细胞核,细胞间质及细胞质内偶见紫红色异染颗粒;细胞核染成蓝色,细胞质区呈棕黄色。对照组软骨细胞上清液 SOD 水平,SOD、Beclin-1 mRNA 及其蛋白相对表达量,NOX2 mRNA 相对表达量均明显低于 CaR(10 μ g/L)组,NOX2 水平、NOX2 蛋白相对表达量均明显高于 CaR(10 μ g/L)组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);U73122(5 μ g/L)组和 CaR(10 μ g/L)+U73122(5 μ g/L)组软骨细胞上清液 SOD 水平,SOD、Beclin-1 mRNA 及蛋白相对表达量均明显低于对照组,NOX2 水平、NOX2 mRNA 及蛋白相对表达量均明显高于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 CaR 通过 TRPC6 介导的自噬降低软骨细胞氧化应激水平,可能是延缓骨关节炎发生、发展的重要机制。

[关键词] 钙感受受体; 瞬时感受器电位通道 6; 自噬; 软骨细胞; 超氧化物歧化酶; NADPH 氧化酶-2

DOI:10.3969/j.issn.1009-5519.2024.23.001

中图法分类号:R681.3;R684.3

文章编号:1009-5519(2024)23-3961-06

文献标识码:A

Effect of CaR regulating TRPC6 mediated autophagy on superoxide dismutase (SOD) and NADPH oxidase 2 (NOX2) in chondrocytes*

QIN Xingxing¹, ZHAN Chengzhi¹, CHEN Jun¹, HU Li¹, ZHANG Zhe², PANG Lihe¹, WU Jian^{1△}

(1. The First Affiliated Hospital of Hubei University of Science and Technology/Xianning Central Hospital, Xianning, Hubei 437100, China; 2. College of Medicine, Hubei University of Science and Technology, Xianning, Hubei 437100, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effect of calcium-sensing receptor (CaR) regulating TRPC6-mediated autophagy on superoxide dismutase (SOD) and NADPH oxidase 2 (NOX2) in chondrocytes. **Methods** The articular cartilage of 3–5 day old SD rats was digested with collagenase and subcultured. The third-generation cultured cells were inoculated into 96-well plates and induced with interleukin-1 β (10 ng/mL). The chondrocytes were divided into control group, CaR (10 μ g/L) group, U73122 (5 μ g/L) group and CaR (10 μ g/L) + U73122 (5 μ g/L) group. After 24 hours of co-culture, the levels of SOD and NOX2 in the supernatant of each group were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Real-time quantitative polymerase chain reaction was used to detect the expression of SOD, NOX2 and Beclin1 mRNA in each group, and Western-blot was used to detect the expression of SOD, NOX2 and Beclin-1 protein. **Results** The primary articular chondrocytes were triangular or irregular or polygonal under the microscope, and the distribution was sparse.

* 基金项目:湖北省自然科学基金项目(2022CFB551)。

作者简介:秦星星(1985—),硕士研究生,主管护师,主要从事骨与关节损伤及退行性疾病的研究。△ 通信作者, E-mail: jianyi8286@

After 24 hours of culture, adherent growth was observed. The third generation of chondrocytes showed blue-stained nuclei, occasionally purple-red heterochromatic granules in the intercellular substance and cytoplasm. The nucleus was stained blue, and the cytoplasmic region was brownish yellow. The level of SOD in the supernatant of chondrocytes, the relative expression of SOD, Beclin-1 mRNA and protein, and the relative expression of NOX2 mRNA in the control group were significantly lower than those in the CaR (10 $\mu\text{g/L}$) group. The level of NOX2 and the relative expression of NOX2 protein were significantly higher than those in the CaR (10 $\mu\text{g/L}$) group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The levels of SOD, the relative expression of SOD, Beclin-1 mRNA and protein in the supernatant of chondrocytes in the U73122 (5 $\mu\text{g/L}$) group and CaR (10 $\mu\text{g/L}$) + U73122 (5 $\mu\text{g/L}$) group were significantly lower than those in the control group, and the levels of NOX2, the relative expression of NOX2 mRNA and protein were significantly higher than those in the control group, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** CaR reduces the level of oxidative stress in chondrocytes through TRPC6-mediated autophagy, which may be an important mechanism to delay the occurrence and development of osteoarthritis.

[Key words] Calcium sensitive receptor; Transient receptor potential cation channel 6; Autophagy; Chondrocytes; Superoxide dismutase; NADPH oxidase-2

骨关节炎(OA)是最常见累及中老年人运动系统的一种慢性退行性疾病之一^[1],其病因尚未完全明确。目前,有研究表明,OA 的发生、发展与软骨细胞氧化应激反应和自噬水平降低有关^[2-3]。钙感受受体(CaR)是调节机体钙稳态的主要受体之一^[4],细胞外钙是第一个被确认的通过激活 CaR 而起作用的物质^[5],其发挥生物活性与瞬时感受器电位离子通道蛋白(TRP)有关^[6],钙离子(Ca^{2+})内流主要通道是瞬时感受器电位通道(TRPC)^[7],TRPC6 基因突变或过表达能引起胞内 Ca^{2+} 信号通路异常,影响 Ca^{2+} 内流,继而调控细胞增殖、凋亡和自噬等重要的生理活动^[8-9]。氧化应激被认为是软骨细胞损伤的最重要的始动因素之一,氧化应激可自发激活细胞自噬信号通路,在营养缺乏和氧化应激等异常生理情况下使 TRPC6 表达增加,导致 Ca^{2+} 内流,增强细胞自噬功能^[10-11]。本研究从细胞水平观察了 CaR 调节 TRPC6 介导的自噬对软骨细胞中超氧化物歧化酶(SOD)及 NADPH 氧化酶-2(NOX2)的影响,旨在为进一步探索 OA 的发病机制和治疗方案提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 2023 年 7 月将出生 3~5 d SD 大鼠关节软骨用胶原酶消化后进行传代培养,取第 3 代培养的细胞接种于 96 孔板,采用白细胞介素-1 β (10 ng/mL)诱导软骨细胞。本研究获湖北科技学院第一附属医院伦理委员会批准(2024-01-101)。

1.1.2 主要试剂和仪器 CaR 抗体(Sigma-Aldrich, 美国)、TRPC6 抑制剂 U73122(Gibco, 美国)、核蛋白及细胞质蛋白提取试剂盒、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺电泳液、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺 RIPA 裂解液(Sigma-Aldrich, 美国)、蛋白上样缓冲液和凝胶配制

试剂盒、蛋白质免疫印迹(Western-blot)转膜液、胎牛血清(Gibco, 美国)、软骨细胞培养基(Gibco, 美国)、酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒(Boster Bio, 中国)、聚合酶链反应(PCR)Master Mix、Trizol 试剂盒(Biyuntian, 中国)、Olympus 光学显微镜(Olympus, 日本)等。

1.2 方法

1.2.1 软骨细胞培养、鉴定及分组 参照文献[6]软骨细胞培养方案,将出生 3~5 d SD 大鼠放入 75%酒精浸泡 30 s,镊子夹出,放入 15 cm 的无菌培养皿中;快速剪头处死,分离后肢膝关节,保留软骨,分离出透明状关节软骨,漂洗 3 次。然后剪成 1 mm \times 1 mm \times 1 mm 的小组织块;将剪好的组织块用镊子转移至无菌 15 mL 离心管中,加入 3 mL 0.25%胰蛋白酶-乙二胺四乙酸,37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 30 min;1 500 r/min 离心 5 min;加入 0.25% II 型胶原酶 3 mL,37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 90 min;3 mL 完全培养基终止消化,混匀后过细胞筛;1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液;每管加入 4 mL 杜氏改良 Eagle 培养基高糖+20%胎牛血清+1%P/S 培养基,混匀后加入 6 孔板中;37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%二氧化碳培养 90 min,以致软骨细胞贴壁,轻晃培养液后吸取上清液至新培养皿中继续培养,显微镜下观察软骨细胞状态。培养软骨细胞 4~6 d 传代,3.6 d 显微镜下拍照。传代后用杜氏改良 Eagle 培养基高糖+10%胎牛血清+1%P/S 培养,使用第 2 代软骨细胞。采用甲苯胺蓝染色和 II 型胶原免疫组织化学(免疫组化)鉴定软骨细胞并计数,以 1:3(5×10^5 个/mL)进行传代培养。将软骨细胞分为对照组、CaR(10 $\mu\text{g/L}$)组、U73122(5 $\mu\text{g/L}$)组和 CaR(10 $\mu\text{g/L}$) + U73122(5 $\mu\text{g/L}$)组,分别用生理盐水、CaR(10 $\mu\text{g/L}$)、U73122(5 $\mu\text{g/L}$)、CaR(10 $\mu\text{g/L}$) + U73122(5 $\mu\text{g/L}$)培养

24 h。

1.2.2 ELISA 检测各组上清液 SOD、NOX2 水平

按 ELISA 试剂盒说明书检测各组软骨细胞培养上清液 SOD、NOX2 水平。

1.2.3 实时定量-PCR 检测各组 SOD、NOX2、人自噬基因 Beclin-1 mRNA 表达

取第 2 代培养的软骨细胞,按 Trizol 试剂盒说明书提取各组软骨细胞总 RNA,测定 RNA 纯度及浓度。按反转录试剂盒说明

书合成 cDNA。应用 SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒 (Perfect Real-Time, TaKaRa, 日本) 进行实时定量-PCR 检测。应用 FTC-2000 实时定量-PCR 系统 (Biotechnology, 美国) 分析 SOD、NOX2、Beclin-1 mRNA 相对表达量,PCR 体系: Mix 12.5 μ L, 上、下游引物各 0.5 μ L, cDNA 1.0 μ L, 剩余用无 RNA 酶水补足 25.0 μ L。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

名称	上游引物	下游引物
SOD	CCAACCGATAGTGAAAGACACGT	CTCATTGCCTCCCTTCCCCAAGT
NOX2	GTGTGTGAATGCCAGAGTCG	TTCAAAGTAAGACCTCCGAATGG
Beclin-1	ATGGAGGGGTCTAAGGCGTC	TCCTCTCTGAOTTAGCCTCT
GAPDH	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	GGGGTCGTTGATGGCAACA

1.2.4 Western-blot 检测各组 SOD、NOX2、Beclin-1 蛋白表达

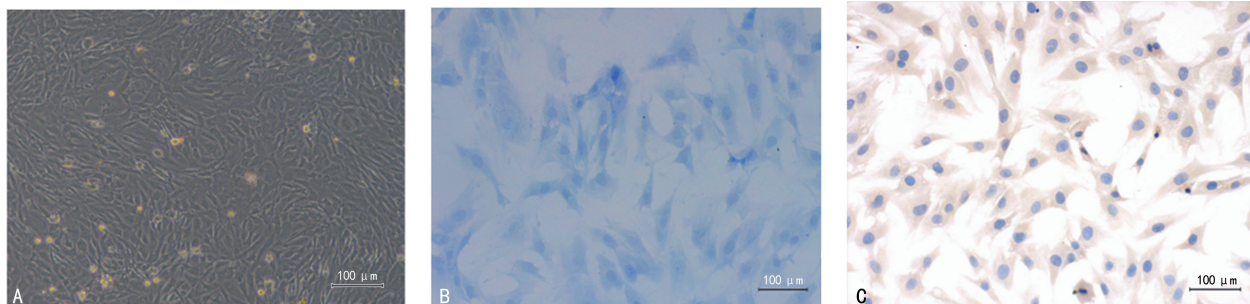
(1) 提取各组软骨细胞总蛋白: 取培养的第 2 代软骨细胞, 调整细胞浓度至 2×10^6 个/mL 接种到培养瓶中, 消化、收集、离心、重悬、计数, 放入培养箱中继续培养过夜。第 2 天取出培养板, 去培养液, 加入新培养液, 收集细胞至 1.5 mL 离心管中, 用 $1 \times$ 磷酸盐缓冲液洗 1~2 次, 加入 200 μ L RIPA 液, 吹打细胞使其充分裂解; 4°C 、7 200 r/min 离心 10 min, 取上清液至新离心管中, 取 10 μ L 稀释 5 倍进行蛋白定量 (BCA 法蛋白定量), 剩下的标本中加入蛋白上样缓冲液, 95°C 水浴 5 min, 变性其蛋白。(2) 采用 Western-blot 法检测各组软骨细胞中 SOD、NOX2、Beclin-1 蛋白相对表达量: 按蛋白分子大小分别配制 4% 的浓缩胶和 10% 的分离胶, 取出变性后的蛋白样品, 上样量每孔 10 μ L, 量少的用 $1 \times$ buffer 缓冲液补齐, 用微量加样枪吸取软骨细胞样品, 缓慢加入样品。稳流 35 mA/板电泳 60 min, 当 loading 或溴酚蓝快跑出胶时结束电泳。转膜, 将用洗涤液漂洗 3 min 后硝酸纤维素膜进行封闭; 将抗体倒入孵育盒中, 再将膜浸入对应的抗体中, 4°C 孵育过夜。第 2 天用 $1 \times$

TBST 缓冲液洗 3 次, 每次 5~10 min。用 $10 \text{ cm} \times 10 \text{ cm}$ 杂交袋进行二抗孵育 60 min, 漂洗液冲洗 3 次, 每次 10 min。用 Bio-Rad 成像分析软件分析并计算各组检测蛋白与内参 (β -actin) 的光密度比值, 即各组蛋白相对表达量。

1.3 统计学处理 应用 SPSS20.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较, 方差不齐时采用 Kruskal-Wallis H 非参数检验, 方差齐时采用单因素方差分析 (one-way ANOVA); 组间多重比较, 方差齐时采用 LSD 检验, 方差不齐时采用 Dunnett's T_3 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 软骨细胞鉴定及形态学观察 原代关节软骨细胞在显微镜下呈不规则形、多角形或三角形、分布稀疏, 培养 24 h 后可见贴壁生长的、轮廓较清楚的软骨细胞。见图 1A。第 3 代软骨细胞采用甲苯胺蓝染色显示其蓝染的细胞间质、细胞核及细胞质内偶见紫红色异染颗粒。见图 1B。软骨细胞的细胞质区呈棕黄色、细胞核染成蓝色。见图 1C。软骨细胞分泌 II 型胶原是其典型特征, 培养的软骨细胞可用于本研究。



注: A. 倒置显微镜下软骨细胞; B. 甲苯胺蓝染色; C. II 型胶原免疫组化染色。

图 1 软骨细胞鉴定及形态学观察

2.2 各组软骨细胞上清液 SOD、NOX2 水平比较
 对照组软骨细胞上清液 SOD 水平明显低于 CaR(10 μg/L)组, NOX2 水平明显高于 CaR(10 μg/L)组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); U73122(5 μg/L)组和 CaR(10 μg/L)+U73122(5 μg/L)组软骨细胞上清液 SOD 水平均明显低于对照组, NOX2 水平明显高于对照组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组软骨细胞上清液 SOD、NOX2 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, ng/mL)

组别	SOD	NOX2
对照组	45.458±2.631	48.368±2.593
CaR(10 μg/L)组	59.714±4.739 ^a	41.566±2.637 ^a
U73122(5 μg/L)组	29.353±2.286 ^a	62.146±4.937 ^a
CaR(10 μg/L)+U73122(5 μg/L)组	35.351±3.362 ^a	55.265±3.326 ^a
F	76.952	103.677
P	0.037	0.002

注:与对照组比较, ^a $P < 0.05$ 。

2.3 各组软骨细胞上清液 SOD、NOX2、Beclin-1 mRNA 相对表达量比较
 对照组软骨细胞上清液 SOD、Beclin-1、NOX2 mRNA 相对表达量均明显低于 CaR(10 μg/L)组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); U73122(5 μg/L)组和 CaR(10 μg/L)+U73122(5 μg/L)组软骨细胞上清液 NOX2 mRNA 相对表达量明显高于对照组, SOD、Beclin-1 mRNA 相对表达量均明显低于对照组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 各组软骨细胞上清液 SOD、NOX2、Beclin-1 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	SOD	NOX2	Beclin-1
对照组	0.338±0.011	0.259±0.015	0.424±0.014
CaR(10 μg/L)组	0.469±0.026 ^a	0.408±0.025 ^a	0.736±0.035 ^a
U73122(5 μg/L)组	0.168±0.015 ^a	0.672±0.042 ^a	0.205±0.017 ^a
CaR(10 μg/L)+U73122(5 μg/L)组	0.215±0.012 ^a	0.542±0.026 ^a	0.302±0.012 ^a
F	98.753	153.547	129.672
P	0.032	0.002	0.003

注:与对照组比较, ^a $P < 0.05$ 。

2.4 各组软骨细胞上清液 SOD、NOX2、Beclin-1 蛋白相对表达量比较
 对照组软骨细胞上清液 SOD、Beclin-1 蛋白相对表达量均明显低于 CaR(10 μg/L)组, NOX2 蛋白相对表达量明显高于 CaR(10 μg/L)组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); U73122(5 μg/L)组和 CaR(10 μg/L)+U73122(5 μg/L)组 SOD、Beclin-1 蛋白相对表达量明显低于对照组, NOX2 蛋白相对表达量明显高于对照组, 差异均有统

计学意义($P < 0.05$)。见表 4、图 2。

表 4 各组软骨细胞上清液 SOD、NOX2、Beclin-1 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	SOD	NOX2	Beclin-1
对照组	0.265±0.007	0.287±0.012	0.307±0.009
CaR(10 μg/L)组	0.568±0.015 ^a	0.403±0.013 ^a	0.409±0.017 ^a
U73122(5 μg/L)组	0.126±0.005 ^a	0.116±0.004 ^a	0.137±0.007 ^a
CaR(10 μg/L)+U73122(5 μg/L)组	0.143±0.008 ^a	0.139±0.008 ^a	0.158±0.009 ^a
F	132.730	173.590	206.340
P	0.002	0.018	0.029

注:与对照组比较, ^a $P < 0.05$ 。

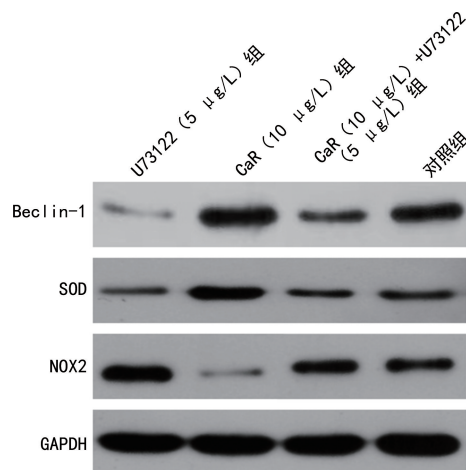


图 2 各组软骨细胞上清液 SOD、NOX2、Beclin-1 蛋白相对表达量的 Western-blot 检测情况

3 讨论

OA 是一种常见的慢性关节疾病, 多发于中老年人, 造成关节活动障碍, 影响日常生活, 但其机理不明^[12-15]。膝关节是 OA 最常受累部位之一。目前, 有研究表明, OA 的发生、发展与异常氧化应激反应和软骨细胞自噬水平降低有关^[2]。软骨细胞稳定的机体钙水平依赖于 CaR 的调节, 通过激活 CaR 可发挥细胞外钙的生物作用, 游离 Ca^{2+} 自由通过依赖细胞膜上 TRPC, 其是 Ca^{2+} 内流的主要通道^[7, 16]。TRPC6 基因突变或过表达影响 Ca^{2+} 内流, 使细胞内 Ca^{2+} 浓度或 Ca^{2+} 细胞内外分布异常, 继而调控细胞凋亡、增殖和自噬等重要的生理活动^[17-19]。OA 患者在局部及全身炎症因子刺激下或软骨细胞微环境改变的情况下软骨细胞出现自噬和氧化应激的异常^[20-21], 在细胞水平研究其自噬机制必须使培养的软骨细胞稳定传代。本研究观察到大鼠关节软骨细胞在传代培养过程中可保持表型的稳定, 培养的软骨细胞在显微镜下呈不规则形、多角形、个别近似圆形, 分布稀疏, 培养 24 h 后 80%~85% 软骨细胞贴壁生长, 轮廓清楚、折光性较好。培养的第 2、3 代软骨细胞成对数增殖。本研

究用Ⅱ型胶原免疫组化和甲苯胺蓝染色对软骨细胞进行鉴定发现,培养的细胞具有软骨细胞的典型特征,可供用于进一步的研究。

有学者认为,氧化应激异常是 OA 软骨细胞损伤的最重要的始动因素之一^[10,22],氧化应激可激活细胞自噬信号通路,营养缺乏和氧化应激刺激使 TRPC6 表达增加,导致 Ca^{2+} 内流,增强细胞自噬^[23-24]。本研究采用 TRPC6 抑制剂 U73122 观察了 CaR 调节 TRPC6 介导的自噬对软骨细胞氧化应激的影响,结果显示,应用 U73122 可降低软骨细胞上清液 SOD 水平,减少氧化应激对软骨细胞带来的损伤。本研究还发现,CaR 可明显促进自噬 Beclin-1 mRNA 及蛋白的表达,因此,推测 OA 患者软骨退变的发生可能与 CaR 水平下降有关。Beclin-1 蛋白相对表达量增加的同时氧化应激代表物质 SOD 水平也升高,当使用 U73122 抑制 TRPC6 活性则 SOD mRNA 及蛋白相对表达量均明显降低,而软骨细胞上清液 NOX2 mRNA 及蛋白相对表达量升高,提示氧化应激可能与软骨细胞的自噬活性存在关联,但使用 CaR 联合 U73122 共培养软骨细胞后 SOD mRNA 及蛋白相对表达量较单纯应用 U73122 组升高,提示 CaR 可能活化了其他的自噬网络,其具体是什么通路尚有待于进一步研究。

自噬是关节软骨细胞维持稳态发挥正常生物学功能不可或缺的生物效应,随着年龄的增长或全身/局部微环境的改变(慢性炎症的刺激),机体改变了 Ca^{2+} 的分布或流向,可能会出现自噬的丧失或自噬抑制,导致软骨细胞异常死亡或凋亡,致使 OA 的发生、发展^[25-26]。国内学者 CHENG 等^[27]发现,在复制的 OA 动物模型中维持软骨细胞的自噬可显著降低软骨细胞的 Mankin 评分;国外有学者发现,在动物体内关节腔局部激活软骨细胞的自噬,在一定程度上可缓解 OA 的严重程度或病情进展^[28]。近年来,关于自噬机制的探讨是 OA 基础研究的一个热点^[2,29],激活或维持一定程度的软骨细胞自噬水平可能是防治 OA 的一个潜在机制。本研究检测了自噬过程中最重要的 Beclin-1 mRNA 及蛋白相对表达量,用 CaR 与软骨细胞共培养发现,Beclin-1 mRNA 及蛋白相对表达量明显高于对照组,同时应用 U73122 与软骨细胞共培养发现,Beclin-1 mRNA 及蛋白相对表达量均明显低于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。上述研究结果在一定程度上揭示了 CaR 可调节 TRPC6 介导的软骨细胞自噬。有研究表明,间充质干细胞联合 CaR 应用治疗 OA 可激活更多的血管内皮生长因子,从而触发磷酸肌醇-3 激酶/蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路参与自噬^[30-31]。软骨细胞自噬的缺失是导致软骨细胞功能障碍甚至凋亡的一个

关键机制,CaR 可调节 TRPC6 介导的软骨细胞自噬,进而调控软骨细胞正常生理功能,在软骨细胞自噬与 CaR 和细胞膜上 TRPC 之间存在着复杂的调控网络,可能会增强或减弱某些信号通路的作用,进而影响自噬与软骨细胞的功能。

参考文献

- [1] HUNTER D J, MARCH L, CHEW M. Osteoarthritis in 2020 and beyond: A lancet commission[J]. Lancet, 2020, 396(10264): 1711-1712.
- [2] ARIAS C, SALAZAR L A. Autophagy and polyphenols in osteoarthritis: A focus on epigenetic regulation[J]. Int J Mol Sci, 2021, 23(1): 421.
- [3] LIU Z, WANG T, SUN X, et al. Autophagy and apoptosis: Regulatory factors of chondrocyte phenotype transition in osteoarthritis[J]. Human cell, 2023, 36(4): 1326-1335.
- [4] ALFADDA T I, SALEH A M A, HOUILLIER P, et al. Calcium-sensing receptor 20 years later [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2014, 307(3): C221-C231.
- [5] WERNER L E, WAGNER U. Calcium-sensing receptor-mediated NLRP3 inflammasome activation in rheumatoid arthritis and autoinflammation[J]. Front Physiol, 2022, 13: 1078569.
- [6] KO W, SUH B C. Differential regulation of Ca^{2+} -activated Cl^- channel TMEM16A splice variants by membrane PI(4,5)P2[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(8): 4088.
- [7] GUO W J, TANG Q L, WEI M, et al. Structural mechanism of human TRPC3 and TRPC6 Channel regulation by their intracellular calcium-binding sites [J]. Neuron, 2022, 110(6): 1023-1035. e5.
- [8] DIETRICH A, GUDERMANN T. TRPC6[J]. Handb Exp Pharmacol, 2007(179): 125-141.
- [9] PRIKHODKO V, CHERNYUK D, SYSOEV Y, et al. Potential drug candidates to treat TRPC6 Channel deficiencies in the pathophysiology of Alzheimer's disease and brain ischemia [J]. Cells, 2020, 9(11): 2351.
- [10] GAO Q. Oxidative stress and autophagy[J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1206: 179-198.
- [11] SHARMA P, KAUSHAL N, SALETH L R, et al. Oxidative stress-induced apoptosis and autophagy: Balancing the contrary forces in spermatogenesis[J]. Biochim Biophys Acta Mol Ba-

- sis Dis, 2023, 1869(6):166742.
- [12] MOTTA F, BARONE E, SICA A, et al. Inflammaging and osteoarthritis[J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2023, 64(2):222-238.
- [13] GIORGINO R, ALBANO D, FUSCO S, et al. Knee osteoarthritis: Epidemiology, pathogenesis, and mesenchymal stem cells: What else is new? An update[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(7):6405.
- [14] KNIGHTS A J, REDDING S J, MAERZ T. Inflammation in osteoarthritis: The latest progress and ongoing challenges[J]. Curr Opin Rheumatol, 2023, 35(2):128-134.
- [15] CHENG C L, WU Y J, HUANG Y R, et al. Epigenetic modification and exosome effects on autophagy in osteoarthritis[J]. Biochem Pharmacol, 2023, 218:115930.
- [16] MAHMOUD O, SOARES G B, YOSIPOVITCH G. Transient receptor potential channels and itch[J]. Int J Mol Sci, 2022, 24(1):420.
- [17] WANG H B, CHENG X D, TIAN J B, et al. TRPC channels: Structure, function, regulation and recent advances in small molecular probes[J]. Pharmacol Ther, 2020, 209:107497.
- [18] ZHAO T T, PARMISANO S, SOROURDIN Z, et al. Mechanosensitive cation currents through TRPC6 and Piezo1 channels in human pulmonary arterial endothelial cells[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2022, 323(4):C959-C973.
- [19] LIN B L, SHIN J Y, JEFFREYS W P, et al. Pharmacological TRPC6 inhibition improves survival and muscle function in mice with Duchenne muscular dystrophy[J]. JCI Insight, 2022, 7(19):e158906.
- [20] LOESER R F, COLLINS J A, DIEKMAN B O. Ageing and the pathogenesis of osteoarthritis[J]. Nat Rev Rheumatol, 2016, 12(7):412-420.
- [21] PORTAL-NÚÑEZ S, ESBRIT P, ALCARAZ M J, et al. Oxidative stress, autophagy, epigenetic changes and regulation by miRNAs as potential therapeutic targets in osteoarthritis[J]. Biochem Pharmacol, 2016, 108:1-10.
- [22] CORYELL P R, DIEKMAN B O, LOESER R F. Mechanisms and therapeutic implications of cellular senescence in osteoarthritis[J]. Nat Rev Rheumatol, 2021, 17(1):47-57.
- [23] SCHOTTLENDER N, GOTTFRIED I, ASHERY U. Hyperbaric oxygen treatment: Effects on mitochondrial function and oxidative stress[J]. Biomolecules, 2021, 11(12):1827.
- [24] DANIELI M G, ANTONELLI E, PIGA M A, et al. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and respiratory chain enzyme defects in inflammatory myopathies[J]. Autoimmun Rev, 2023, 22(5):103308.
- [25] WANG S, DENG Z T, MA Y C, et al. The role of autophagy and mitophagy in bone metabolic disorders[J]. Int J Biol Sci, 2020, 16(14):2675-2691.
- [26] SAENGSIWARITT W, NGAMTIPAKON P, UDOMSINPRASERT W. Vitamin D and autophagy in knee osteoarthritis: A review[J]. Int Immunopharmacol, 2023, 123:110712.
- [27] CHENG N T, MENG H, MA L F, et al. Role of autophagy in the progression of osteoarthritis: The autophagy inhibitor, 3-methyladenine, aggravates the severity of experimental osteoarthritis[J]. Int J Mol Med, 2017, 39(5):1224-1232.
- [28] LI B C, GUAN G Z, MEI L, et al. Pathological mechanism of chondrocytes and the surrounding environment during osteoarthritis of temporomandibular joint[J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(11):4902-4911.
- [29] VAN DEN BOSCH M H J. Osteoarthritis year in review 2020: Biology[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2021, 29(2):143-150.
- [30] VALENTI M T, DALLE CARBONARE L, ZIPETO D, et al. Control of the autophagy pathway in osteoarthritis: Key regulators, therapeutic targets and therapeutic strategies[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(5):2700.
- [31] MADHU V, GUNTUR A R, RISBUD M V. Role of autophagy in intervertebral disc and cartilage function: Implications in health and disease[J]. Matrix Biol, 2021, 100/101:207-220.

(收稿日期:2024-06-06 修回日期:2024-09-28)