

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.18.002

蒙花苷消除衰老骨髓间充质干细胞的衰老表型发挥抗衰老作用*

崔 直 王珮琳 滕松松 马春晖 俞银贤 易诚青[△]

(上海市第一人民医院骨科 上海交通大学 上海 200000)

摘要 目的:探讨蒙花苷(Linarin, LR)是否可以消除衰老骨髓间充质干细胞(BMSC)的衰老表型发挥抗衰老作用。**方法:**取 4 周龄 80 g-100 g 的雄性 SD 大鼠大腿骨髓腔内的骨髓间充质干细胞,用含 10 %胎牛血清的 DMEM/F12 培养基培养至三代,使用 D-gal 诱导骨髓间充质干细胞衰老,使用 SA- β -gal 染色、活性氧检测、蛋白免疫印迹验证骨髓间充质干细胞细胞衰老状态,通过蛋白免疫印迹检测衰老 BMSC 与正常 BMSC 中细胞保护性蛋白 sirt1、sirt6 及衰老相关蛋白 p16、p21、p53 的表达水平。之后,我们通过不同浓度 LR 处理衰老骨髓间充质干细胞。最后,通过蛋白印迹分析检测未处理组与 LR 处理组衰老相关蛋白表达情况。观察蒙花苷是否可以消除衰老的大鼠骨髓间充质干细胞衰老表型。**结果:**衰老的骨髓间充质干细胞细胞保护性蛋白 sirt1、sirt6 降低及衰老相关蛋白 p16、p21、p53 明显增高,衰老细胞中与 DNA 损伤相关的细胞核内蛋白 γ -H2AX 表达明显增加。而蒙花苷处理后,衰老细胞组衰老相关蛋白 p16、p21、p53 明显降低, γ -H2AX 蛋白阳性细胞明显减少。**结论:**蒙花苷可以剂量依赖性的消除衰老的大鼠骨髓间充质干细胞的衰老表型发挥抗衰老作用。

关键词:蒙花苷;抗衰老;骨髓间充质干细胞;细胞衰老

中图分类号:R-33;R339.38;R331.2;Q255 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)18-3407-06

Linarin Play an Anti-aging Role by Eliminates the Senescent Phenotype of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells *

CUI Zhi, WANG Pei-lin, TENG Song-song, MA Chun-hui, YU Yin-xian, YI Cheng-qing[△]

(Department of Orthopaedics, Shanghai First People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 200000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate whether linarin (LR) can eliminate the aging phenotype of aging bone marrow mesenchymal stem cells (BMSC) and play an anti-aging role. **Methods:** The bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) in the thigh marrow cavity of male SD rats aged from 80 g to 100 g were used %DMEM / F12 medium of fetal bovine serum was cultured to the third generation. D-gal was used to induce the aging of BMSCs. SA- β -gal staining, active oxygen detection and Western blotting were used to verify the aging state of BMSCs. The expression of SIRT1, SIRT6 and p16, p21 and p53 were detected by western blotting Level. After that, we treated the aged BMSCs with different concentrations of LR. Finally, Western blot analysis was used to detect the expression of aging related proteins in the untreated and LR treated groups. To observe whether Linarin can eliminate the aging phenotype of bone marrow mesenchymal stem cells in aging BMSC. **Results:** In senescent cells, SIRT1 and SIRT6 decreased, p16, p21 and p53 increased, and the expression of γ -H2AX related to DNA damage increased significantly. However, after LR treatment, p16, p21, p53 and γ -H2AX protein positive cells were significantly decreased. **Conclusions:** Linarin can eliminate the aging phenotype of aging bone marrow mesenchymal stem cells in a dose-dependent manner and play an anti-aging role.

Key words: Linarin; Anti-aging; Bone marrow mesenchymal stem cells; Cell senescence

Chinese library classification(CLC): R-33; R339.38; R331.2; Q255 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2020)18-3407-06

前言

细胞衰老是一种细胞生长停滞的状态^[1],衰老通常是由于细胞应激而引发的免疫应答^[2]。细胞衰老能够有效防止细胞的异常复制(如癌变)^[3],但另一方面,细胞衰老是导致人类退行性疾病和功能缺陷的主要病理因素^[4]。据最近文献报道,细胞衰老会激活 cGAS/STING 信号通路^[5],进而表现出溶酶体、 β -半乳糖苷酶活性的增加,促炎因子、趋化因子、生长因子和基质重塑

酶等一系列衰老相关分泌表型(SASP)的分泌^[6],细胞核 DNA 损伤反应蛋白的表达等^[7]。衰老细胞的逐渐累积并长期存活会导致组织功能障碍,影响细胞微环境,持续存在的 SASP 会产生局部的慢性炎症、组织老化破坏以及加速周围细胞衰老等病理作用^[8]。因此,对细胞衰老及年龄相关疾病的相关研究具有重要意义^[9,10]。

蒙花苷(Linarin, LR)是一种来源于野菊的天然成分,也是野菊中活性最高的黄酮类成分,分子式为 $C_{28}H_{32}O_{14}$,分子量为

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81371979)

作者简介:崔直(1993-),硕士研究生,主要研究方向:骨关节与运动医学, E-mail: czsju@hotmail.com

[△] 通讯作者:易诚青(1974-),博士生导师,教授,主要研究方向:骨关节与运动医学, E-mail: chengqing.yi@shgh.cn, 电话:15316954091

(收稿日期:2020-03-06 接受日期:2020-03-30)

592.54, 属于 Flavonoids 黄酮类^[11]。据文献报道, LR 具有抗菌、抗衰老作用^[12]、抗缺氧作用、抗不良刺激作用、对机体双向调节作用、抗疲劳作用等多种药理作用^[13,14]。尽管 LR 具有上述多种有益作用, 但目前, 几乎没有文献及报告阐述其对骨髓间充质干细胞(BMSC)的抗衰老作用效果。因此, 我们通过使用 LR 处理不同状态 BMSC, 并观察衰老相关分泌表型, 对 LR 是否可以起到抵御 BMSC 衰老及作用效果进行研究。为研发新型抗衰老及治疗年龄相关性疾病药物提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验所用的 SD 大鼠由上海交通大学附属第一人民医院动物实验中心购买。DMEM/F12 培养基, 胎牛血清, 双抗购自美国 Gibco 公司。P16 抗体、P21 抗体、P53 抗体、Sirt1 抗体、Sirt6 抗体和 GAPDH 抗体购自英国 abcam 公司。 γ -H2AX 抗体购自于美国 CST 公司。蒙花苷药物购自于上海源叶生物科技有限公司。

1.2 大鼠原代 BMSCs 的分离培养

取 4 周龄 80 g-100 g 的雄性 SD 大鼠, 麻醉处死后, 用 75 %酒精浸泡 5 min, 无菌条件下分离出大鼠双下肢的股骨和胫骨, 仔细剔除肌肉等软组织, 将完整的腿骨放入灭菌的 PBS 缓冲液培养皿中, 用灭菌 PBS 缓冲液冲洗三次, 转入含 10 %胎牛血清的 DMEM/F12 培养基的培养皿中。用灭菌手术剪剪去两侧干骺端, 显露骨髓腔, 用 1 mL 注射器吸取培养基反复冲洗骨髓腔至骨髓腔内骨髓冲净。将混有骨髓冲洗液的培养基转移至 15 mL 离心管中, 1000 r/min, 离心 3 min, 弃上清, 用培养基反复吹打沉淀成细胞悬液, 将悬液转移至新无菌 10 cm 培养皿中, 置于 37 °C、5 %CO₂ 的细胞培养箱内培养。48 h 后换液, 以后每两天换液一次, 倒置显微镜下每天观察细胞状态。

1.3 细胞培养

将 BMSCs 接种于直径 10 cm 的培养皿中 (含 89 % DMEM/F12 培养基, 10 %胎牛血清, 1 %双抗), 置于 37 °C、5 % CO₂ 的细胞培养箱内培养, 每隔两天换液一次。当培养皿内细胞密度超过 90 %时用 0.25 %胰蛋白酶消化, 并重悬于新 10 cm 培养皿中, 传代至第三代开始实验。

1.4 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖活力

用 96 孔板重悬细胞, 每孔 100 μ L 细胞悬液, 约 10000 个细胞, 用不同浓度(0、1、5、10、50、100 μ M)LR 处理不同时间(48 h、72 h), 按不同处理时间分组, 每组设三个复孔, 到达预定时间后每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液, 2 h 后在酶标仪下测定吸光度。

1.5 β -半乳糖苷酶染色

将正常 BMSCs 与衰老 BMSCs 接种于六孔板中, 细胞贴壁且密度达到 70 %后进行下一步实验。清除细胞培养基, 用 PBS 清洗一遍, 加入 1 mL 固定液, 室温固定 15 min 后吸掉固定液, PBS 清洗三遍, 每孔加入 1 mL 工作液, 放置于 37 °C 温箱中孵育过夜。12 h 后清除工作液, 再用 PBS 清洗三遍, 将 6 孔板置于普通光学显微镜下, 随机选取 6 个视野, 统计衰老细胞比例。

1.6 免疫荧光

培养细胞贴壁后用 4 %对甲醛(PFA)固定 30 min, 加入 10 %

山羊血清和 1 %牛血清白蛋白(BSA)封闭缓冲液, 室温孵育 1 h, γ -H2AX 抗体(1:200 稀释), 细胞在 4 °C 孵育过夜, 然后用 PBST 溶液洗涤细胞 3 次, 每次 5 分钟, 然后用 Alexa Fluor 488 (美国 Life Technologies 公司) 结合羊抗兔 IgG 抗体在 PBS 中在暗室中孵育温度 30 min, 用 PBST 溶液洗涤细胞 3 次, 每次 5 min, 用 DAPI(日本多津多)染色 5 min, 洗涤 3 次, 每次 5 min, 用 PBS 覆盖培养皿, 用荧光共聚焦显微镜(日本奥林巴斯)拍摄图像。

1.7 Western blot 蛋白印迹分析

细胞密度达到 90 %以上进行下一步实验, 将培养皿置于冰上, 吸液器吸出培养基后加入蛋白裂解液提取各组细胞总蛋白, 然后使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。使用 10 %SDS-PAGE 凝胶电泳, 蛋白分离后, 转膜至 PVDF 膜, 在封闭液中室温下封闭 30 min, 并在装有匹配的一抗孵育盒中孵育, 4 °C 摇床孵育过夜。12 h 后 TBST 洗膜, 三次, 每次 15 min。室温下孵育二抗 60 min, TBST 再次洗涤三次, 使用化学发光试剂盒检测信号条带。

1.8 统计学分析

采用 GraphPad prism 5 绘制柱状图, 采用 SPSS21.0 统计软件对数据进行统计分析, 数据表示为平均值 $\pm$ 标准差。多组之间采用单因素方差分析, 两组之间采用 t 检验。认为 $P < 0.05$ 是统计显著性的标准。

2 结果

2.1 D-gal 诱导骨髓间充质干细胞衰老

实验所用细胞为正常骨髓间充质干细胞(BMSCs)及其衰老状态的细胞。我们通过 10 g/L 剂量的 D-gal 诱导 BMSCs 48 h 使其达到衰老状态。之后, 我们使用 SA- β -gal 染色来确认细胞处于衰老状态, 并进一步使用免疫荧光来确认衰老细胞与正常细胞的状态区别。发现与正常细胞相比, 衰老细胞组中 SA- β -gal 阳性细胞比例明显升高(图 1A)。根据文献报道, 衰老细胞中氧自由基等超氧化物累积, 我们通过活性氧检测试剂盒检测发现, 衰老细胞组的活性氧阳性细胞比例较正常 3 代 BMSCs 明显增高(图 1B)。免疫荧光显示, 衰老细胞中与 DNA 损伤相关的细胞核内蛋白 γ -H2AX 表达明显增加 (图 1C)。结果表明 D-gal 能够诱导正常 BMSCs 衰老。

2.2 衰老细胞的衰老相关分泌表型 p16、p21、p53 等表达增高

p53/p21/WAF1 和 p16Ink4a 细胞周期抑制途径的激活被认为是衰老的标志。我们观察到, 与正常 3 代 BMSCs 相比, 在衰老细胞中, p16、p21、p53 蛋白表达均显著增加 (图 2A)。Sirt1、Sirt6 蛋白为细胞中起保护作用的蛋白, 在衰老细胞中, 二者表达减少。因此, 我们认为, 细胞衰老会激活上述两种细胞周期抑制途径, 使衰老相关分泌表型(SASP)表达增高。而抑制细胞保护蛋白的表达。

2.3 蒙花苷消除衰老骨髓间充质干细胞的衰老表型

我们用不同浓度(0、1、10、25、50 μ M)LR 处理衰老 BMSCs 24h。并检测衰老相关蛋白 p16、p21、p53 的表达。结果表明, 随着 LR 浓度的升高, p16、p21、p53 表达量均降低, 且差异具有统计学意义(图 3A)。随后, 我们再一次使用免疫荧光观察 γ -H2AX 的表达情况, 与未使用 LR 处理的衰老细胞相比, LR 处理后的

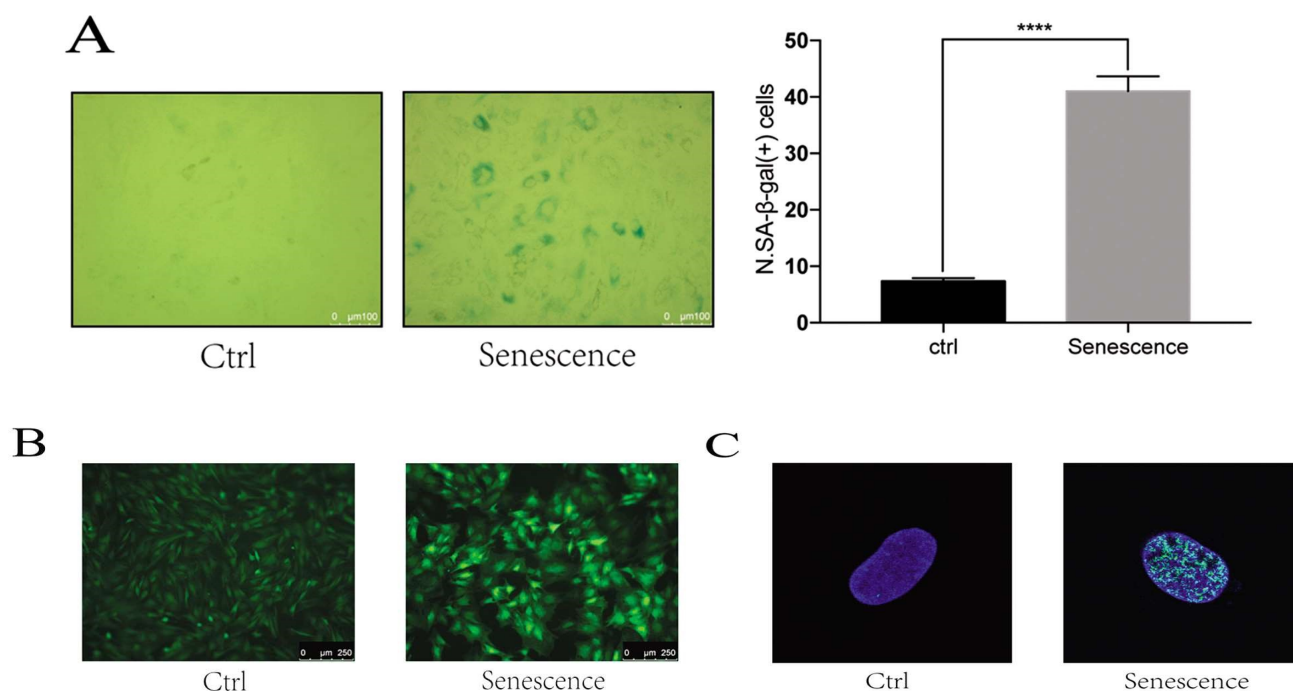


图1 正常三代 BMSCs 与衰老 BMSCs 的 β -半乳糖染色及定量(A);活性氧检测正常三代 BMSCs 与衰老 BMSCs 活性氧等代谢产物差异(B);免疫荧光显示衰老细胞细胞核内蛋白 γ 免疫荧光显示表达明显增加(C)

Fig. 1 β -galactose staining and quantification of normal third generation BMSCs and aging BMSCs(a); the difference of active oxygen and other metabolites between normal third generation BMSCs and aging BMSCs was detected by active oxygen (b); immunofluorescence showed that the expression of protein γ -H2AX in the nucleus of aging cells increased significantly (c)

Note: Data were expressed as the mean $\pm$ SD, $n=6$, $P<0.05$, compared with Control group.

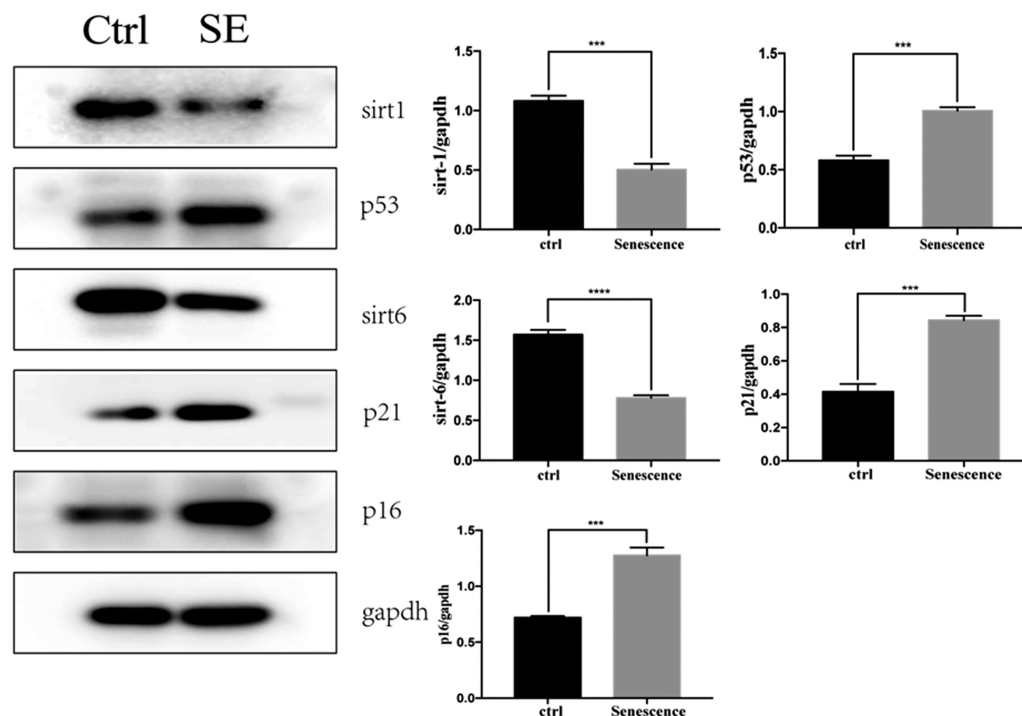


图2 衰老细胞与正常三代 BMSCs 中的 p16、p21、p53、Sirt1、Sirt6 表达差异。通过 Western blotting 分析,衰老细胞中, p16、p21、p53 蛋白表达都增加, Sirt1、Sirt6 蛋白在衰老细胞中表达降低。

Fig. 2 The expression of p16, p21, p53, SIRT1 and SIRT6 in senescent cells was different from that in normal BMSCs of the third generation. By Western blotting analysis, the expression of p16, p21 and p53 protein increased in senescent cells, and the expression of SIRT1 and SIRT6 protein decreased in senescent cells.

Note: Data were expressed as the mean $\pm$ SD, $n=3$, $P<0.05$, compared with Control group.

衰老 BMSCs 细胞核内 γ -H2AX 表达明显下降(图 3B)。因此,我们认为蒙花苷可以降低与衰老相关蛋白的表达情况,从而发挥抗衰老的作用。为了确定 LR 对衰老 BMSC 的影响是否与该药物的潜在毒性有关,我们采用 CCK-8 法检测 LR 的细胞毒性。

结果表明,在 50 μ M 剂量范围内,LR 对衰老 BMSC 细胞活力无明显影响(图 4B),提示 LR 对衰老 BMSC 衰老表型的抑制作用不是由 LR 的细胞毒性产生的。

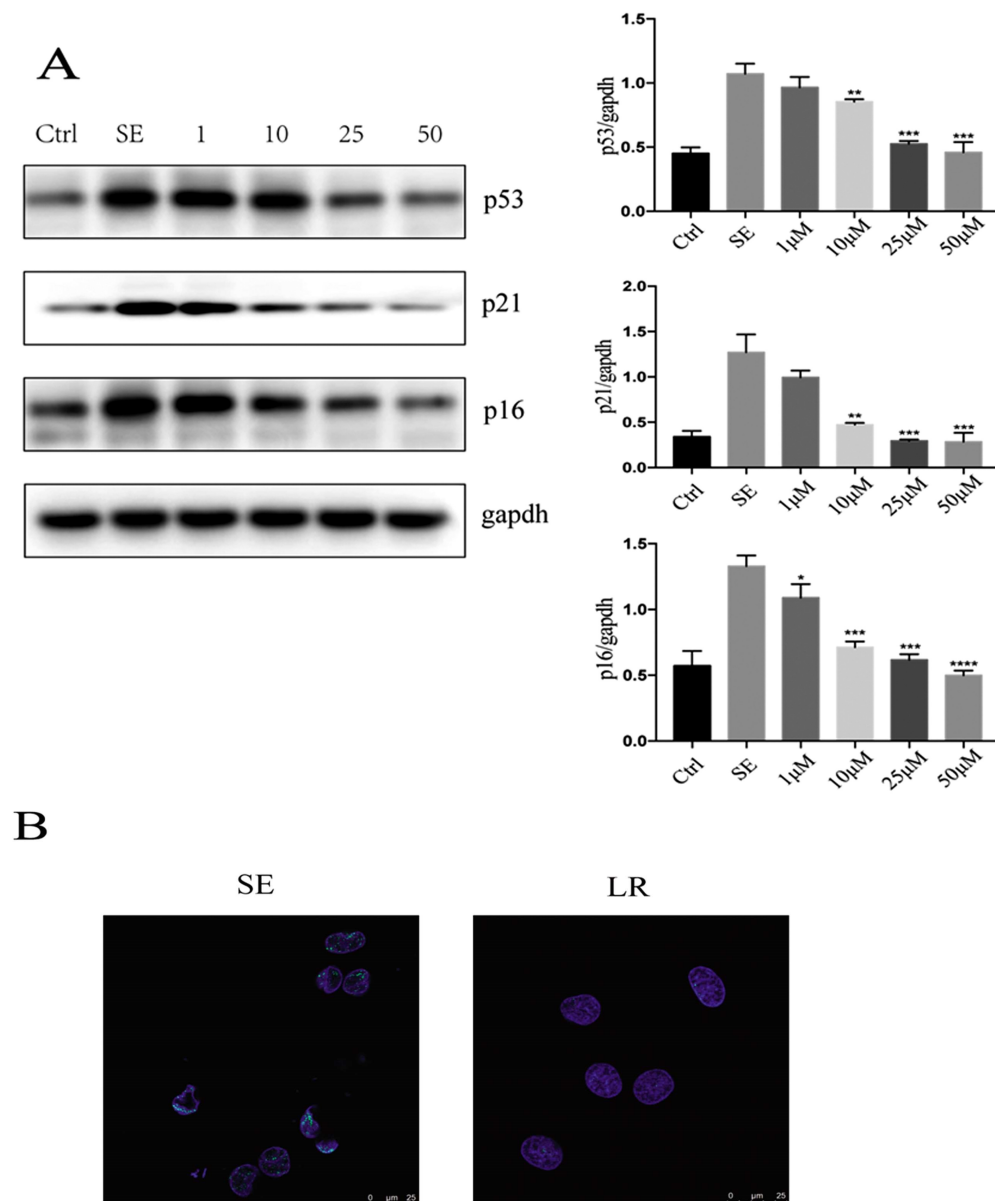


图 3 蒙花苷抑制 BMSCs 衰老。通过 Western blotting 分析,p16、p21、p53 蛋白表达随 LR 浓度增加表达逐渐降低(A);免疫荧光检测 γ 免疫荧光检测表达情况(B)。

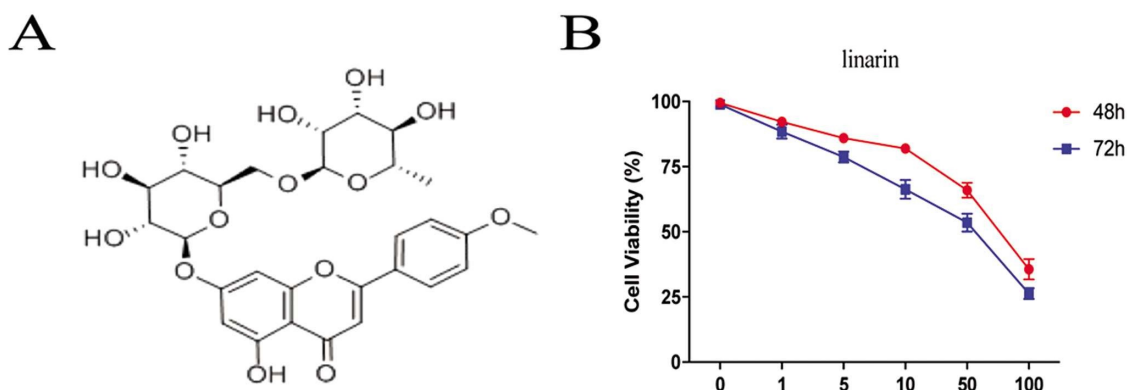
Fig. 3 Linarin inhibited the senescence of BMSCs. Western blotting analysis showed that the expression of p16, p21 and p53 protein decreased gradually with the increase of LR concentration (a); the expression of γ -H2AX was detected by immunofluorescence (b)

Note: Data were expressed as the mean $\pm$ SD, n=3, $P < 0.05$, compared with Control group.

3 讨论

随着社会的进步,医疗条件及水平的提高,人们的平均寿命已经大幅提高。但是,随之带来负面影响就是老龄化问题,社会老龄化使许多年龄相关性疾病的危害逐渐凸显^[3,15,16]。因此,近些年,衰老相关研究已经成为许多学科领域的研究热点。这其中,细胞衰老的相关研究也成为热门,细胞衰老是一种细胞生长停滞状态,衰老细胞的增殖能力由于各种形式的细胞应激而受到限制甚至丧失^[17,18]。细胞的衰老能够相对的防止一

些疾病的发生(如癌前病变)^[2],但是,细胞衰老更是导致人类退行性疾病和功能缺陷的主要病理因素^[19],细胞衰老会表现出溶酶体、D-半乳糖苷酶活性的增加,促炎因子、趋化因子、生长因子和基质重塑酶等一系列衰老相关分泌表型(SASP)的分泌^[6,20],细胞核 DNA 损伤反应蛋白的表达等^[7]。逐渐累积并长期存活的衰老细胞会导致组织功能障碍,影响细胞微环境,持续存在的 SASP 会产生局部的慢性炎症、组织老化破坏以及加速周围细胞衰老等病理作用^[21,22]。许多年龄相关性疾病,如糖尿病^[23],神经系统疾病^[24],骨关节炎等^[7,25],都证实与相关细胞衰老



分子式: $C_{28}H_{32}O_{14}$ 分子量: 592.55

图4 蒙花苷分子结构及细胞毒性检测。蒙花苷分子结构(A); CCK-8 检测 LR 对大鼠衰老 BMSCs 活力的影响(B)

Fig. 4 Molecular structure and cytotoxic test of linarin. Molecular structure of linarin (a);

CCK-8 test the effect of LR on the activity of senescent BMSCs (b)

Note: Data were expressed as the mean $\pm$ SD, $n=3$, $P<0.05$, compared with Control group.

有密切关系。最近有文献报道,骨关节炎疾病的最初病变起始于软骨下骨髓间充质干细胞衰老^[26]。且将衰老细胞移植至正常小鼠体内可产生骨关节炎样的病变^[27]。而清除衰老细胞或抑制细胞衰老,可以明显延缓甚至逆转衰老造成的年龄相关性疾病的发生和进展^[28]。

衰老细胞可以对机体造成严重的损伤,因此,寻找清除或逆转衰老细胞的药物或方法是非常重要的^[29]。本研究也是以寻找抑制细胞衰老的新药物为目的。我们从4周龄80-100 g 雄性大鼠中提取到了原代 BMSC,并培养传代至二代以用于接下来的实验,我们通过 D-gal 诱导方式将正常二代 BMSCs 转变为衰老 BMSCs。为验证我们制备的衰老细胞是否和通常衰老细胞性质相似^[17],我们对一些重要的指标进行了检测,实验方式包括 SA- β -gal 染色、衰老相关表行的蛋白印迹分析、活性氧检测、免疫荧光实验。我们发现,与正常细胞相比。衰老细胞在各方面指标都产生了一定程度的变化,SA- β -gal 染色实验中,衰老细胞组中阳性细胞比例明显增加,而正常细胞组阳性细胞数很少。在蛋白印迹分析中,我们发现,与正常细胞相比,衰老细胞中,保护细胞的蛋白 Sirt1、Sirt6 蛋白表达降低,而 p16、p21、p53 蛋白表达增加。 γ -H2AX 是细胞核内蛋白,是评估 DNA 损伤反应的重要蛋白,衰老细胞多数有 DNA 的损伤累积,免疫荧光实验中,我们观察到,细胞核内蛋白 γ -H2AX 在衰老细胞中表达明显增高^[30],而在正常细胞组中几乎没有表达。这些实验结果与之前文献报道相一致,证实我们制备的衰老细胞符合衰老细胞的特性。随后,我们根据文献报道及前期结果猜想,蒙花苷对衰老细胞具有一定的效果。并进行了接下来的实验对猜想进行验证。

蒙花苷是一种来源于野菊的天然成分,也是野菊中活性最高的黄酮类成分,据文献报道,LR 具有抗菌、抗衰老、抗缺氧等多种药理作用。目前,Han 等人证明,LR 可以抑制 LPS 诱导的急性肺损伤造成的氧化应激和炎症反应^[11],而 Hyun Lim 等人证明 LR 抑制衰老相关炎症的形成^[12]。但是目前,并没有文献明确 LR 对衰老细胞的作用及具体作用机制。因此,为了明确其中的抗衰老作用效果,特别是在对衰老 BMSC 的作用,我们对

LR 的抗衰老作用进行了进一步实验。我们用不同浓度 LR 作用于衰老 BMSCs。并检测衰老相关蛋白 p16、p21、p53 的表达。结果表明,LR 剂量依赖性的降低 p16、p21、p53 的蛋白表达,在免疫荧光实验中,与未处理衰老细胞组相比,细胞核内蛋白 γ -H2AX 在处理组中表达明显降低。随后,我们通过药物毒性实验验证了 LR 可以作用于 BMSCs,证明 LR 对衰老 BMSC 衰老表型的抑制作用不是由 LR 的细胞毒性产生的。通过这些实验结果,并结合文献,我们认为蒙花苷可以特定的清除衰老 BMSC 的衰老表型,具有明确的抗衰老作用。而其是通过何种途径,其作用的具体机制及作用通路仍需进一步实验来探讨。

综上所述,我们研究发现,衰老的 BMSC 与正常 BMSC 相比多种生物学特性发生变化,衰老蛋白表达水平增高,而蒙花苷特定对衰老细胞产生的衰老表型加以清除。利用该作用,我们可以清除衰老细胞分泌的衰老表型,防止衰老细胞对周围组织造成的有害作用。延缓年龄相关性疾病的进展。因此,我们认为,蒙花苷药物有望成为新型抗衰老及治疗年龄相关性疾病药物。

参考文献(References)

- [1] HAYFLICK L, MOORHEAD PS. The serial cultivation of human diploid cell strains[J]. Exp Cell Res, 1961, 25: 585-621
- [2] LAN Y Y, HEATHER J M, EISENHAURE T, et al. Extranuclear DNA accumulates in aged cells and contributes to senescence and inflammation[J]. Aging Cell, 2019, 18 (2)
- [3] BARBARA, BOTTAZZI, ELIO, et al. Aging, inflammation and cancer [J]. Seminars in Immunology, 2018, 40:74-82
- [4] DOU Z, GHOSH K, VIZIOLI M G, et al. Cytoplasmic chromatin triggers inflammation in senescence and cancer [J]. Nature, 2017, 550 (7676): 402
- [5] HUI Y, WANG H, REN J. cGAS is essential for cellular senescence [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2017, 114(23): E4612
- [6] TCHKONIA T, ZHU Y, DEURSEN J V, et al. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: Therapeutic opportunities [J]. Journal of Clinical Investigation, 2013, 123(3): 966-72
- [7] TAKAHASHI A, LOO T M, OKADA R, et al. Downregulation of cytoplasmic DNases is implicated in cytoplasmic DNA accumulation

- and SASP in senescent cells [J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 1249
- [8] Turinetti V, Vitale E, Giachino C. Senescence in Human Mesenchymal Stem Cells: Functional Changes and Implications in Stem Cell-Based Therapy[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(7): 1164
- [9] VARELA-EIRIN M, LOUREIRO J, FONSECA E, et al. Cartilage regeneration and ageing: Targeting cellular plasticity in osteoarthritis [J]. *Ageing Research Reviews*, 2017, 42(56-71)
- [10] Joshua N Farr, Daniel G Fraser, Haitao Wang, et al. Identification of Senescent Cells in the Bone Microenvironment [J]. *J Bone Miner Res*, 2016, 31(11): 1920-1929
- [11] HAN X, YI-CHEN W U, MENG M, et al. Linarin prevents LPS induced acute lung injury by suppressing oxidative stress and inflammation via inhibition of TXNIP/NLRP3 and NF- κ B pathways [J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2018, 42 (3): 1460-1472
- [12] LIM H, PARK B K, SHIN S Y, et al. Methyl caffeate and some plant constituents inhibit age-related inflammation: effects on senescence-associated secretory phenotype (SASP) formation [J]. *Archives of Pharmacol Research*, 2017, 40(4): 524-35
- [13] ZHEN Z G, REN S H, JI H M. Linarin suppresses glioma through inhibition of NF- κ B/p65 and up-regulating p53 expression in vitro and in vivo[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017, 95(363-74)
- [14] YU Q, LI X, CAO X. Linarin could protect myocardial tissue from the injury of Ischemia-reperfusion through activating Nrf-2 [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017, 90(1-7)
- [15] STEFANIE H, STRAUB R H. Disruption of rhythms of molecular clocks in primary synovial fibroblasts of patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis, role of IL-1 β /TNF [J]. *Arthritis Research & Therapy*, 2012, 14(3): R122
- [16] CLAIRE V, EDUARDOD, JEROME G, et al. Role of the Inflammation-Autophagy-Senescence Integrative Network in Osteoarthritis [J]. *Frontiers in Physiology*, 2018, 9: 706
- [17] TAMARA, TCHKONIA, JAMES, et al. Aging, Cell Senescence, and Chronic Disease: Emerging Therapeutic Strategies [J]. *JAMA*, 2018, 320 (13): 1319-1320
- [18] Calcinotto A, Kohli J, Zagato E, et al. Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury[J]. *Physiol Rev*, 2019, 99(2): 1047-1078
- [19] Tchkonina T, Zhu Y, van Deursen J, et al. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(3): 966-972
- [20] Zhang B, Fu D, Xu Q, et al. The senescence-associated secretory phenotype is potentiated by feedforward regulatory mechanisms involving Zscan4 and TAK1[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1723
- [21] HE S, SHARPLESS N E. Senescence in Health and Disease [J]. *Cell*, 2017, 169(6): 1000-11
- [22] Chanhee Kang, Qikai Xu, Timothy D Martin, et al. The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4[J]. *Science*, 2015, 349 (6255): aaa5612
- [23] GUZIK T J, COSENTINO F. Epigenetics and Immunometabolism in Diabetes and Aging[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2017, 29(3): 257-74
- [24] LYROS E R-S A, KOSTOPOULOS P, et al. Normal brain aging and Alzheimer's disease are associated with lower cerebral pH: an in vivo histidine 1H-MR spectroscopy study [J]. *Neurobiol Aging*, 2019, S0197-4580(19): 30411-7
- [25] JOHNSON V L, HUNTER D J. The epidemiology of osteoarthritis [J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2014, 28(1): 5-15
- [26] MATSUZAKI T, ALVAREZ-GARCIA O, MOKUDA S, et al. FoxO transcription factors modulate autophagy and proteoglycan 4 in cartilage homeostasis and osteoarthritis [J]. *Science Translational Medicine*, 2018, 10(428): ean0746
- [27] MING X, BRADLEY E W, WEIVODA M M, et al. Transplanted Senescent Cells Induce an Osteoarthritis-Like Condition in Mice[J]. *Journals of Gerontology*, 2016, 72(6): glw154
- [28] GAO B, LIN X, JING H, et al. Local delivery of tetramethylpyrazine eliminates the senescent phenotype of bone marrow mesenchymal stromal cells and creates an anti-inflammatory and angiogenic environment in aging mice [J]. *Aging Cell*, 2018, Suppl. 1: e12741
- [29] BAKER D J, WIJSHAKE T, TCHKONIA T, et al. Clearance of p16~(Ink4a)-positive senescent cells delays ageing-associated disorders [J]. *Nature*, 2011, 479(7372): p.232-6
- [30] LI M, XIAO Y, LU X, et al. APE1 deficiency promotes cellular senescence and premature aging features [J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 11: 11