

异槲皮苷对叔丁基过氧化氢诱导的 L-02 细胞氧化损伤的保护作用

雷 鸣¹, 徐应淑¹, 孙静波², 刘 双³, 龚其海³, 高健美^{1*}

¹遵义医学院药学院, 遵义 563000; ²北京煤炭总医院药学部, 北京 100028;

³遵义医学院 基础药理省部共建教育部重点实验室, 遵义 563000

摘要: 研究异槲皮苷对叔丁基过氧化氢(t-BHP)诱导的 L-02 细胞氧化损伤的保护作用。体外培养 L-02 细胞, 采用 t-BHP(100 $\mu\text{mol/L}$) 作用 24 h, 建立 L-02 细胞氧化损伤模型, 分为正常对照组、模型组(100 $\mu\text{mol/L}$ t-BHP)、阳性对照(10 $\mu\text{mol/L}$ 维生素 E)组和不同浓度异槲皮苷(1、10、100 $\mu\text{mol/L}$) 预处理组。采用 MTT 法检测细胞活力, 通过酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测丙二醛(MDA)含量, 活性氧(ROS)、乳酸脱氢酶(LDH)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和超氧化物歧化酶(SOD)的活性。与模型组比较, 异槲皮苷显著提高细胞存活率($P < 0.05$), 降低 ROS 和 MDA 含量及 LDH 的外漏($P < 0.05$), 明显增加 GSH-Px 和 SOD 活性($P < 0.05$)。异槲皮苷能够上调 Sirt6 表达, 降低 NF- κ Bp65 含量。异槲皮苷能够保护 t-BHP 诱导的 L-02 细胞氧化损伤, 其作用可能与提高清除 ROS 能力, 调控 Sirt6 和 NF- κ Bp65 水平相关。

关键词: 异槲皮苷; L-02 细胞; 氧化损伤

中图分类号: R965.1

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.4.005

Protective Effect of Isoquercitrin on t-BHP-induced Oxidative Damage of L-02 Cells

LEI ming¹, XU Ying-shu¹, SUN Jing-bo², LIU Shuang³, GONG Qi-hai³, GAO Jian-mei^{1*}

¹School of Pharmacy, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China; ²Department of Pharmacy, China Meitan General Hospital of Beijing, Beijing 100028, China; ³Key Laboratory of Basic Pharmacology of Ministry of Education, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China

Abstract: To investigate the protective effect of isoquercitrin on t-BHP-induced oxidative damage of L-02 cells. *In vitro* oxidative stress damage model was established by treating L-02 cells with t-BHP(100 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h. Cells were divided into control case, model case(100 $\mu\text{mol/L}$ t-BHP), positive control case(10 $\mu\text{mol/L}$ Vitamin E, VE) and isoquercitrin(1, 10 and 100 $\mu\text{mol/L}$) cases. Cell viability was determined by MTT assay. Contents of LDH, ROS, MDA, GSH-Px and SOD activities were detected by ELISA methods. The protein expressions of sirtuin 6 (Sirt6) and nuclear factor-k-gene binding p65 (NF- κ Bp65) were determined by Western blot technology. Compared with model case, isoquercitrin significantly enhanced cell viability, GSH-Px and SOD activities, and decreased LDH activity, contents of ROS and MDA. Western blot showed isoquercitrin upregulated the expression of Sirt6 and downregulated the expression of NF- κ Bp65. Isoquercitrin showed the protective effect on t-BHP-induced oxidative damage of L-02 cells and its protective effects may be related with increasing in ROS removal ability and regulation of Sirt6 and NF- κ Bp65 level.

Key words: isoquercitrin; L-02 cells; oxidative damage

近年来研究证实, 氧化应激是多种肝脏疾病的共同发病途径, 肝脏中含有丰富的线粒体, 易受到活性氧的攻击^[1]。氧化应激在脂肪肝、病毒性肝炎、

肝纤维化等肝脏疾病中产生不容忽视的作用。因此, 寻求安全有效的抗氧化剂迫在眉睫。

异槲皮苷是含有多个酚羟基的黄酮醇苷类化合物, 现代药理研究表明异槲皮苷具有降压、抗炎、抗氧化、抗癌等药理作用^[2]。但是其对叔丁基过氧化氢导致的肝细胞氧化损伤作用尚不清楚。因此, 本研究采用叔丁基过氧化氢损伤 L-02 细胞建立体外

收稿日期: 2017-01-09 接受日期: 2017-03-10

基金项目: 贵州省中医药、民族医药科学技术研究专项(QZzy-2014-029); 贵州省科技创新人才团队[2015-4023]; 贵州省高层次创新人才“百”层次(20165684)

* 通讯作者 Tel: 86-851-28642337; E-mail: gaojianmei@zmc.edu.cn

氧化应激模型,观察异槲皮苷对肝细胞氧化损伤的保护作用,并探讨其机制是否通过调控依赖 Sirt6/NF- κ Bp65 信号通路发挥作用,为临床防治氧化应激所致肝损伤提供理论基础。

1 材料与仪器

1.1 细胞株

人正常肝细胞 L-02(中科院细胞库)。

1.2 药物与试剂

异槲皮苷(批号 PS000510,成都普思生物科技股份有限公司,纯度 $\geq 98\%$),见图 1。叔丁基过氧化氢(tert-butyl hydroperoxide solution, t-BHP,批号 SHSH2804V, Sigma 公司), RPMI1640 培养液(批号 8116408, Gibco 公司),胎牛血清(批号 1618862, Gibco 公司),噻唑蓝(Thiazolyl blue tetrazolium bromid,批号 M2128, Sigma 公司),罗丹明 123(Rhodamine 123,批号 628B051,索莱宝公司),活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒(批号 20150118,上海江莱生物科技有限公司),乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH,批号 20141220),丙二醛(malonaldehyde, MDA,批号 20150109),谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px,批号 20150306)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。Anti-沉默信息调节因子 6(sirtuin6, Sirt6,批号 ab88494)抗体,核转录调控因子 p65(NF- κ Bp65,批号 ab16502)和 Anti-beta actin(β -actin,批号 ab8226)抗体均购自 abcam 公司。

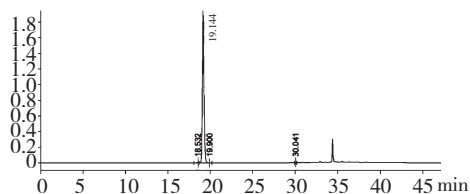


图 1 异槲皮苷高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of isoquercitrin

1.3 仪器

Midi40 二氧化碳培养箱(Thermo Fisher Scientific 公司), Olympus IX73 荧光显微镜(Olympus 公司), DDY-10 型三恒电泳仪(Bio-Rad 公司),半干转印槽(Bio-Rad 公司),全自动电泳凝胶成像分析系统(Bio-Rad 公司)。

2 实验方法

2.1 L-02 细胞的培养

将 L-02 细胞接种于含 10% 胎牛血清, RP-

MI1640 培养液培养液中,在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ 培养箱中培养。

2.2 建立 L-02 细胞氧化损伤模型

取处于对数生长期的 L-02 细胞,以 1×10^5 个/mL 细胞密度,每孔 100 μ L 接种于 96 孔培养板中,在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ 培养箱中培养 12 h 后,分别加入浓度为 25、50、100、200、400 μ mol/L t-BHP 分别作用 24 h 后,每孔加入 25 μ L MTT(5 g/L),继续培养 4 h 后,弃上清,每孔加入 120 μ L DMSO 溶解,酶标仪 490 nm 处检测吸光度(A),并计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = \frac{A_{\text{药物处理组}}}{A_{\text{空白对照组}}} \times 100\%$$

2.3 异槲皮苷预处理对细胞活力的影响

L-02 细胞按照 2.2 项方法接种于 96 孔板中,培养 12 h 后,加入 1、10、100 μ mol/L 异槲皮苷和 10 μ mol/L 阳性对照药维生素 E(Vitamin E, VE)预处理 1 h,加入 100 μ mol/L t-BHP 继续作用 24 h 后,每孔加入 25 μ L MTT(5 g/L),继续培养 4 h 后,弃上清,每孔加入 120 μ L DMSO 溶解,酶标仪 490 nm 处检测吸光度(A),并计算细胞存活率。

2.4 细胞形态观察

取对数生长期的 L-02 细胞,以 1×10^5 个/mL 细胞密度,每孔 2 mL 接种于 6 孔培养板中,在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ 培养箱中培养 12 h 后,按 2.3 项方法给药处理细胞后,在倒置显微镜下观察细胞形态。

2.5 LDH 活性、ROS、MDA 含量和 GSH-Px、SOD 活力的测定

将 L-02 细胞按 2.2 项方法接种于 96 孔细胞培养板中,药物作用 24 h 后。严格按照试剂盒说明书检测各组中 LDH 的活性,ROS、MDA 含量,GSH-Px 和 SOD 活力。

2.6 线粒体膜电位检测

将 L-02 细胞按 2.2 项方法接种于 6 孔细胞培养板中,药物作用 24 h 后,加入 400 μ L 终浓度为 2 μ g/L 的罗丹明 123 染色液,在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ 培养箱中避光染色 30 min 后,PBS 洗 3 次,在荧光显微镜下观察并拍照记录并采用 Image Pro Plus 软件测定相对荧光强度。

2.7 Western blot 测定 Sirt6、NF- κ Bp65 蛋白

将药物作用后的 L-02 细胞用 PBS 洗涤后,加入 RIPA 细胞裂解液于冰上裂解 30 min,离心取上清,采用 BCA 试剂盒进行蛋白定量后,将蛋白变性后取 20 μ g 蛋白上样,采用 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白后,将蛋白转印至 PVDF 膜,用 5% 脱脂

奶粉封闭 2 h 后,加入相应一抗(Sirt6, 1: 1000; NF- κ Bp65, 1: 1000)4 $^{\circ}$ C 封闭过夜, TBST 洗 3 次, 加二抗(1: 5000)封闭液封闭 1 h, 采用 ECL 发光法显色, ChemiDoc XRS + 系统成像, 扫描记录, 用 Quantity One 软件进行分析。

2.8 统计学分析

计量资料以均数 \pm 标准差 ($\pm s$) 表示。数据采用 SPSS 17.0 统计软件 One-Way ANOVA 分析处理, 方差齐用 LSD 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 实验结果

3.1 不同浓度 t-BHP 对 L-O2 细胞存活率的影响

实验结果表明 25 ~ 400 $\mu\text{mol/L}$ 的 t-BHP 作用 L-O2 细胞 24 h 后能够显著降低细胞存活率并呈浓度依赖性。100 $\mu\text{mol/L}$ t-BHP 使 L-O2 存活率降低 50% 左右 ($[F(6, 14) = 736.224, P < 0.001]$), 实验结果重复性好, 因此, 确定 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 t-BHP 建立氧化应激损伤模型。见图 2。

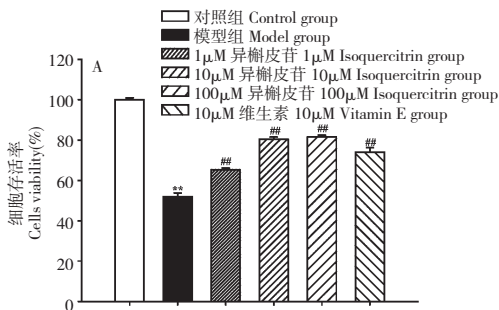


图 3 异槲皮苷预处理对 t-BHP 诱导的 L-O2 氧化损伤细胞活力(A)和 LDH 释放率(B)的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Survival rate of t-BHP induced L-O2 cells and release rate of LDH with different concentrations of isoquercitrin ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注:与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

Note: Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

3.3 异槲皮苷预处理对 L-O2 细胞形态的影响

空白对照组 L-O2 细胞聚团生长, 大小均一。t-BHP (100 $\mu\text{mol/L}$) 模型组细胞数量骤减, 大小不规整, 部分悬浮于培养液中。异槲皮苷 (1、10、100 $\mu\text{mol/L}$) 预处理组细胞数量增加, 接近空白对照组细胞状态, 见图 4。

3.4 异槲皮苷预处理对 ROS 和 MDA 含量的影响

LDH 活性能够反映细胞氧化损伤后的死亡情况, ROS 和脂质过氧化物 MDA 含量能够反映细胞内氧化应激的损伤程度。t-BHP (100 $\mu\text{mol/L}$) 模型组较空白组 ROS 及 MDA 含量显著增高; 而异槲皮

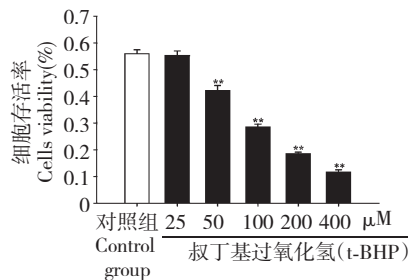


图 2 过氧化氢对 L-O2 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effects of t-BHP on L-O2 cells viability ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注:与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Note: Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3.2 异槲皮苷预处理对 t-BHP 诱导的 L-O2 细胞氧化损伤存活率和 LDH 释放率的影响

与模型组比较, 1 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$ 异槲皮苷预处理后, 细胞存活率明显上升 ($[F(5, 12) = 147.053, P < 0.001]$); t-BHP (100 $\mu\text{mol/L}$) 模型组较空白组 LDH 活性显著增高 ($[F(5, 12) = 922.482, P < 0.001]$), 见图 3。

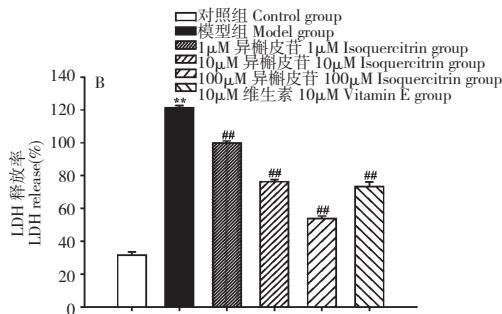


图 3 异槲皮苷预处理对 t-BHP 诱导的 L-O2 氧化损伤细胞活力(A)和 LDH 释放率(B)的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Survival rate of t-BHP induced L-O2 cells and release rate of LDH with different concentrations of isoquercitrin ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注:与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

Note: Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

苷 (1、10、100 $\mu\text{mol/L}$) 预处理组明显降低 ROS 和 MDA 含量 ($[F(5, 12) = 255.232, P < 0.001; F(5, 12) = 51.171, P < 0.001]$), 见图 5。

3.5 异槲皮苷预处理对 GSH-Px 和 SOD 活性的影响

t-BHP (100 $\mu\text{mol/L}$) 模型组较空白对照组 GSH-Px 和 SOD 活性显著降低; 而异槲皮苷 (1、10、100 $\mu\text{mol/L}$) 预处理组不同程度的升高 GSH-Px 和 SOD 的活性 ($[F(5, 12) = 71.307, P < 0.001; F(5, 12) = 33.045, P < 0.001]$), 见图 6。

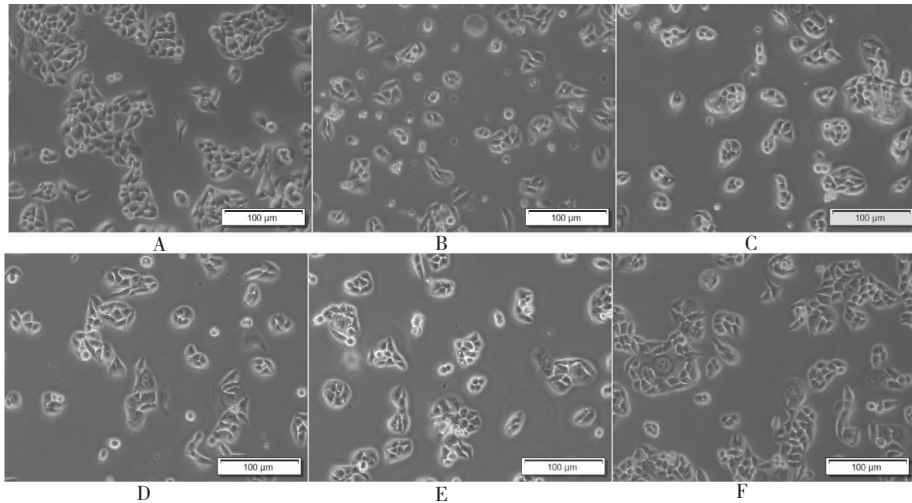


图4 异槲皮苷预处理对 t-BHP 诱导的 L-02 细胞形态学的影响

Fig. 4 The effect of isoquercitrin pretreatment on t-BHP -induced morphological changes in L-02 cells

注: A. 空白对照组; B. 模型组; C. 异槲皮苷 1 $\mu\text{mol/L}$; D. 异槲皮苷 10 $\mu\text{mol/L}$; E. 异槲皮苷 100 $\mu\text{mol/L}$; F. 10 $\mu\text{mol/L}$ 维生素 E

Note: A; Control group; B; Model group; C; 1 $\mu\text{mol/L}$ Isoquercitrin group; D; 10 $\mu\text{mol/L}$ Isoquercitrin group; E; 100 $\mu\text{mol/L}$ Isoquercitrin group; F; 10 $\mu\text{mol/L}$ Vitamin E

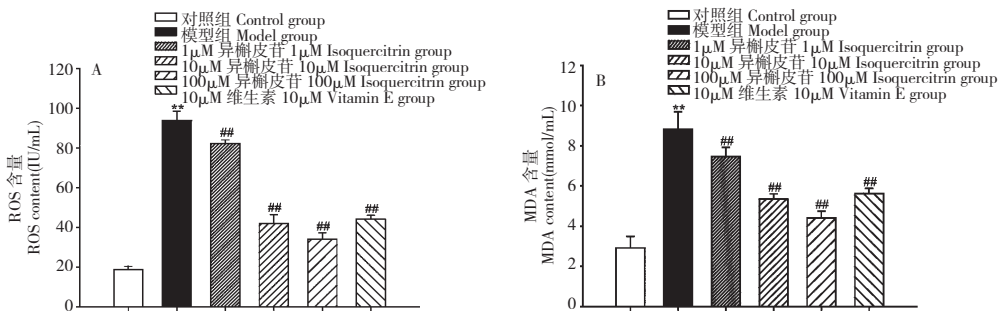


图5 异槲皮苷预处理对 ROS (A) 及 MDA (B) 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effects of isoquercitrin pretreatment on contents of ROS and MDA and LDH activity in L-02 cells treated with t-BHP ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注: 与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

Note: Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

3.6 异槲皮苷预处理 t-BHP 诱导的 L-02 细胞氧化损伤线粒体膜电位的影响

t-BHP (100 $\mu\text{mol/L}$) 模型组较空白组荧光强度明显降低, 表明氧化损伤后线粒体膜电位降低; 而异槲皮苷 (1、10、100 $\mu\text{mol/L}$) 预处理组不同程度的使荧光强度增强, 表明异槲皮苷能够提高线粒体膜电位, 见图 7。

3.7 异槲皮苷预处理 t-BHP 损伤的 L-02 细胞中 Sirt6 和 NF- κ Bp65 蛋白表达的影响

与空白对照组相比较, 单独用 t-BHP (100 $\mu\text{mol/L}$) 刺激细胞后, Sirt6 表达下降、NF- κ B 核转位

增强, NF- κ Bp65 含量升高; 而经过异槲皮苷 (1、10、100 $\mu\text{mol/L}$) 预处理再用 t-BHP 刺激细胞后, 与模型组比较, 给药组会不同程度上调 Sirt6 水平、降低 NF- κ Bp65 水平。见图 8。

4 讨论与结论

机体正常代谢过程会不断产生氧自由基, 但通过抗氧化系统可以清除多余自由基。氧化系统和抗氧化系统失衡, 会造成细胞或组织损伤, 这一现象称为氧化应激^[3,4]。ROS 产生过多会引起脂质过氧化、降低超氧化物歧化酶活性等^[5]。研究证实, 氧

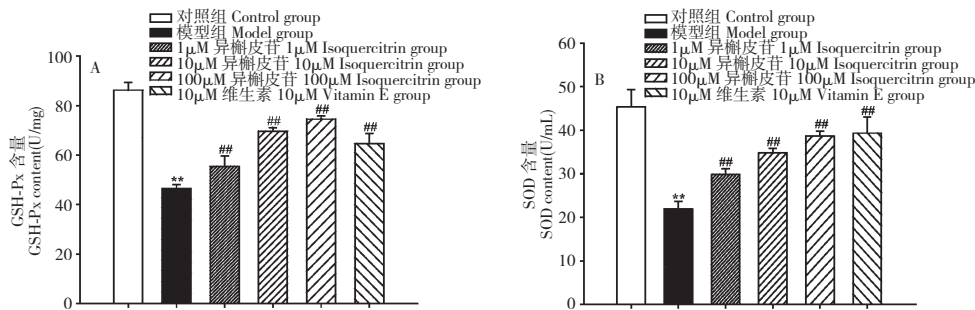


图 6 异槲皮苷预处理对 GSH-Px (A)、SOD (B) 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effects of isoquercitrin pretreatment on GSH-Px and SOD activity in L-02 cells treated with t-BHP ($\pm sm, n = 3$)

注:与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

Note: Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

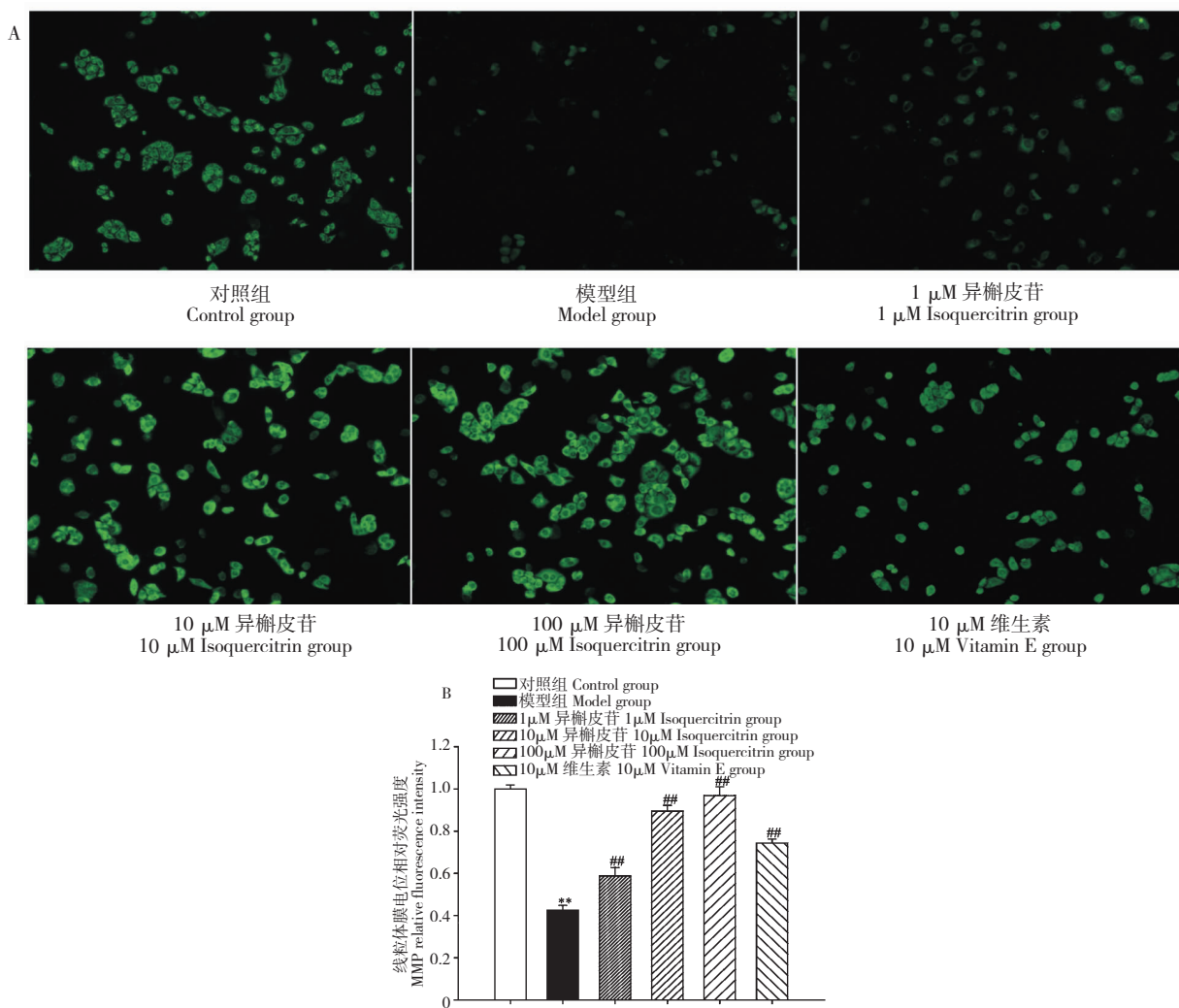


图 7 异槲皮苷预处理对 t-BHP 诱导的 L-02 细胞线粒体膜电位的影响 (A) 及相对荧光强度 (B)

Fig. 7 The effect of isoquercitrin pretreatment on t-BHP-induced mitochondrial membrane potential changes in L-02 cells (A) and the mean fluorescence intensity (B)

注:与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

Note: Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

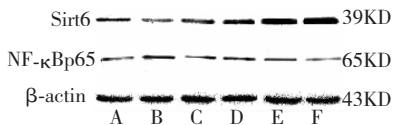


图8 异槲皮苷预处理对 t-BHP 损伤的 L-02 细胞中 Sirt6, NF-κBp65 蛋白相对表达的影响

Fig. 8 Effect of isoquercitrin pretreatment on expression of Sirt6, NF-κBp65 protein in L-02 cells treated with t-BHP

注: A. 空白对照组; B. 模型组; C. 异槲皮苷 1 μmol/L; D. 异槲皮苷 10 μmol/L; E. 异槲皮苷 100 μmol/L; F. 10 μmol/L 维生素 E

Note: A: Control group; B: Model group; C: 1 μmol/L Isoquercitrin group; D: 10 μmol/L Isoquercitrin group; E: 100 μmol/L Isoquercitrin group; F: 10 μmol/L Vitamin E

化应激会诱发一系列的细胞功能障碍, 最终导致细胞死亡^[6]。本实验研究结果表明, 异槲皮苷能够使 tBHP 诱导的肝细胞内 MDA 和 ROS 含量趋于正常水平, 升高 GSH-Px 和 SOD 活力。这提示异槲皮苷具有保护氧化应激诱导的 L-02 细胞氧化损伤的作用。

氧化应激诱导的肝氧化损伤与炎症可能存在着紧密联系^[7]。肝细胞内发生氧化应激是因为肝脏内巨噬细胞、中性粒细胞的激活^[8]。肝脏内巨噬细胞的激活会导致促炎症因子 (TNF-α、NF-κB 等) 的释放, 进一步加重肝脏损伤^[9]。近年来研究发现, 沉默信息调节因子 2 (silent information regulator 2, SIR2) 家族成员之一的 Sirt6 在抗细胞氧化损伤方面发挥重要作用, 同时也是炎症调节因子^[10]。Sirt6 能够阻断 NF-κB 信号的转录调控, 从而抑制靶基因的表达^[11,12]。Sirt6 过度表达可以降低 ROS 的生成, 可以抑制 TNF-α 等炎症因子的表达^[13]。本研究结果表明异槲皮苷能够上调 Sirt6 表达, 同时抑制 NF-κBp65 表达, 直接或间接的提高 GSH-Px 和 SOD 的活力增强清除 ROS 的能力, 发挥抗氧化应激作用。说明 Sirt6 能够调控 NF-κB, 与文献报道一致。异槲皮苷对 t-BHP 诱导的肝氧化损伤具有保护作用, 一定程度上可能是与其增加 Sirt6 蛋白表达, 进而抑制 NF-κBp65 蛋白表达相关。

综上所述, 异槲皮苷对 t-BHP 诱导的 L-02 细胞氧化损伤具有保护作用, 其作用可能与提高肝细胞抗氧化能力, 调控 Sirt6 和 NF-κBp65 蛋白表达有关, 但是, 其具体作用机制有待于进一步研究。本研究旨在为临床应用异槲皮苷治疗肝氧化损伤提供药理学依据。

参考文献

- 1 Wu N (吴娜), Cai GM (蔡光明), He Q (何群). Oxidative stress and hepatic injury. *World Chin J Digestol* (世界华人消化杂志), 2008, 16: 3310-3315.
- 2 Xie W, Wang M, Chen C, *et al.* Hepatoprotective effect of isoquercitrin against acetaminophen-induced liver injury. *Life Sci*, 2016, 152: 180-189.
- 3 Yuan HP (原慧萍), Yang Z (杨泽). Oxidative stress and aging. *Chin J Geriatric Care* (中国老年保健医学), 2015, 13 (5): 14-17.
- 4 Rolo AP, Teodoro JS, Palmeira CM. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radical Biol Med*, 2012, 52 (1): 59-69.
- 5 Ghatak S, Biswas A, Dhali GK, *et al.* Oxidative stress and hepatic stellate cell activation are key events in arsenic induced liver fibrosis in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2011, 251 (1): 59-69.
- 6 Jannat S, Ali MY, Kim HR, *et al.* Protective effects of sweet orange, Unshiu Mikan, and Mini Tomato Juice powders on t-BHP-induced oxidative stress in HepG2 cells. *Preventive Nutr Food Sci*, 2016, 21: 208-220.
- 7 Larsen FS, Wendon J. Understanding paracetamol-induced liver failure. *Intensive Care Med*, 2014, 40: 888-890.
- 8 Krenkel O, Mossanen JC, Tacke F. Immune mechanisms in acetaminophen-induced acute liver failure. *Hepatobil Surgery Nutr*, 2014, 3: 331-343.
- 9 Rolando N, Wade J, Davalos M, *et al.* The systemic inflammatory response syndrome in acute liver failure. *Hepatology*, 2000, 32: 734-739.
- 10 Lv ZZ (吕泽中), Yuan D (袁丁), Zhang CC (张长城), *et al.* The research progress and functional analysis of SIRT6. *Chin Bull Life Sci* (生命科学), 2016, 28: 1370-1376.
- 11 Cheng MY, Cheng YW, Yan J, *et al.* SIRT6 suppresses mitochondrial defects and cell death via the NF-κB pathway in myocardial hypoxia/reoxygenation induced injury. *Am J Transl Res*, 2016, 8: 5005-5015.
- 12 Tian K, Liu Z, Wang J, *et al.* Sirtuin-6 inhibits cardiac fibroblasts differentiation into myofibroblasts via inactivation of nuclear factor κB signaling. *Translat Res J Lab Clin Med*, 2015, 165: 374-386.
- 13 Wu Y, Chen L, Wang Y, *et al.* Overexpression of Sirtuin 6 suppresses cellular senescence and NF-κB mediated inflammatory responses in osteoarthritis development. *Sci Reports*, 2015, 5: 1019-1023.