doi:10.11659/jjssx.08E017001

·基础研究·

人参皂苷 Rg1 对白血病干细胞衰老的影响

耿 珊[1],陈雄斌[2],湛 斌[1],季遥鹰[1],谢宝芬[1] (1.重庆市第十三人民医院内科,重庆 400053;2.重庆医科大学干细胞与组织工程实验室,重庆 400032)

[摘 要] **目的** 对比健康人群造血干细胞(HSCs)与白血病患者 HSCs 衰老的生物学特征,并探讨人参皂苷 Rg1 对促进白血病干细胞衰老的效果,为白血病的防治提供新的思路和方法。**方法** 取正常人骨髓 15 例(正常组),慢性髓细胞白血病患者骨髓 16 例(白血病组),正常组与白血病组分别再分为对照组与 Rg1 组。对照组进行常规培养;Rg1 组在培养体系中加 10 μg/mL 的人参皂苷 Rg1,其他条件同对照组。2 d 后提取各组人骨髓单个核细胞(BMNCs),免疫磁性吸附细胞分选法(MACS)分离纯化出 $CD34^+/CD38^-$ 细胞群,流式细胞术检测细胞纯度,台盼蓝染色检测细胞活性,流式细胞术检测细胞周期时相,衰老相关 β-半乳糖苷酶(SA-β-gal)染色观察各组阳性细胞百分比,CCK-8 检测各组 $CD34^+/CD38^-$ 增殖能力。**结果** 分选前每 1×10^6 个 BMNCs 中 $CD34^+/CD38^-$ 细胞群比例为(1.76±0.34)%;免疫磁性分选后每 1×10^6 个细胞中 $CD34^+/CD38^-$ 细胞群比例为(91.15±2.41)%。白血病 Rg1 组人骨髓 $CD34^+/CD38^-$ 细胞的 SA-β-gal 染色阳性率明显高于白血病对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$);正常对照组与正常 Rg1 组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),但均高于白血病对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。CCK-8 结果显示,白血病对照组 $CD34^+/CD38^-$ 细胞增殖速度明显增加,高于其余各组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。各组人骨髓 $CD34^+/CD38^-$ 细胞存活率可达99.1%以上。细胞周期时相结果显示,白血病对照组 $CD34^+/CD38^-$ 细胞 G1 期阻滞明显低于其余 3 组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 慢性髓细胞白血病患者骨髓 $CD34^+/CD38^-$ 细胞增生活跃,出现明显逆衰老现象,这可能是造成一些慢性髓细胞白血病的原因之一,而人参皂苷 Rg1 可以通过促进白血病干细胞衰老延缓这一过程。

[关键词] $CD34^+/CD38^-$ 造血干/祖细胞;人参皂苷 Rg1;CCK-8;慢性髓细胞白血病;细胞周期时相

[中图分类号] R329.2 [文献标识码] A [收稿日期] 2017-08-01

Effect of ginsenoside Rg1 on senescence characteristics of leukemic stem cells

GENG Shan[1], CHEN Xiong-bin[2], ZHAN Bin[1], JI Yao-ying[1], XIE Bao-fen[1] (1. Department of Medicine, 13th People's Hospital of Chongqing, Chongqing 400053, China; 2. Laboratory of Stem Cells and Tissue Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing 400032)

Abstract: Objective To explore the effect of ginsenoside Rg1 on leukemia stem cells through comparing the biological senescence characteristics of HSCs in the patients with leukemia and healthy people, and provide new ideas and methods for leukemia prevention and treatment. **Methods** Fifteen cases of normal bone marrow in normal group and sixteen cases of chronic myeloid leukemia in leukemia group were divided into control group and Rg1 group, respectively. The control group used the conventional culture. The Rg1 group used the culture system with 10 μg/mL ginsenoside Rg1, other conditions were the same as control group. The bone marrow mononuclear cell of all groups were extracted after 2 days, and the $CD34^+/CD38^-$ cells population was isolated and purified by immunomagnetic adsorption cell sorting(MACS). The purity of the cells and cell cycles phase were detected by flow cytometry. Cell viability was detected by trypan blue staining. The percentage of positive cells was detected by SA-β-gal staining. CCK-8 detected the $CD34^+/CD38^-$ proliferation ability of each group. **Results** The ratio of $CD34^+/CD38^-$ cell population was (1.76±0.34)% in every 1×10^6 BMNCs before sorting; the proportion of $CD34^+/CD38^-$ cell population per 1×106 cells after immunomagnetic sorting was (91.15±2.41)%. The positive rate of SA-β-gal staining in human bone marrow $CD34^+/CD38^-$ cells of leukemia Rg1 group was significantly higher than that in leukemia control group, the difference was not significant ($P>0.05$); meanwhile there was no significant difference between normal control group and normal Rg1 group, but higher than that in leukemia control group, the difference was significant ($P<0.05$). CCK-8 results showed that the proliferation of $CD34^+/CD38^-$ cells was significantly increased in leukemia control group than those in the other groups. The survival rate of $CD34^+/CD38^-$ cells in human bone marrow was 99.1% in all groups. Cell cycle phase results showed that the G1 arrest of $CD34^+/CD38^-$ cells in leukemia control group was significantly lower than those in the other three groups. **Conclusion** $CD34^+/CD38^-$ cells in chronic myeloid leukemia patients may be caused by some chronic myeloid leukemia. Ginsenoside Rg1 can effectively delay the process of aging.

Keywords: $CD34^+/CD38^-$ hematopoietic stem/progenitor cells; ginsenoside Rg1; CCK-8; chronic myeloid leukemia; cell cycle phase

---

[基金项目] 重庆市卫生计生委医学科研计划项目(20143021)

[通信作者] 谢宝芬,E-mail:13637888125@163.com

慢性髓细胞白血病(chronic myeloid leukemia,CML)是一组起源于造血干/祖细胞的恶性克隆增殖性疾病,迄今治疗仍主要采用传统的大剂量联合化疗,但此法副作用大、复发率高,而且对正常机体免疫与造血系统有极大的损害。寻找既能抑制白血病细胞恶性增殖、诱导凋亡,副作用又相对较小的天然药物已成为治疗白血病的希望和重要途径。1997 年 Bonnet 等[1]从急性髓细胞白血病患者中分离出 $CD34^+/CD38^-$ 的白血病前体细胞亚群,将这种细胞移植给 NOD/SCID 小鼠后会引发白血病,而能代表绝大多数白血病细胞($CD34^+$,$CD38^+/CD34^-$)的白血病原始细胞不能使 NOD/SCID 小鼠发生白血病。研究进一步发现,移植的 $CD34^+/CD38^-$ 白血病前体细胞亚群可连续被移植给二代受体[1-2],由此可证实该前体细胞具有自我复制能力,因此认为这是白血病干细胞或干细胞样细胞,尽管这种细胞仅占白血病细胞的一小部分,但由于白血病干细胞更能逃逸化疗或放疗,是白血病难以治愈或复发的关键。可见寻找白血病干细胞对治愈白血病至关重要。有研究结果表明,人参皂苷 Rg1 对正常造血细胞和肿瘤细胞增殖分化有双向调节作用,对正常造血细胞有延缓其衰老的作用,而对肿瘤细胞的增殖有明显抑制作用并能诱导其向成熟方向分化[3-4]。但白血病干细胞衰老情况同正常造血干细胞相比有何区别,人参皂苷 Rg1 对白血病干细胞的促衰老作用还未明确,本课题拟运用现代衰老的检测技术,通过测定健康人群及白血病患者骨髓 $CD34^+/CD38^-$ 细胞群,即造血干细胞(hematopoietic stem cells,HSCs)的衰老生物学变化特征并探讨人参皂苷对白血病干细胞是否有促衰老的作用,以期为白血病的防治提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与分组

本研究中无明显血液学异常者的骨髓,已确诊为慢性髓细胞白血病的患者的骨髓,均由重庆医科大学附属第一医院血液科骨穿室提供。标本收集得到重庆医科大学附属第一医院伦理委员会批准并获患者家属知情同意。纳入无血液病异常者 15 例(正常组),其中男6 例,45 ~ 56 岁;女 9 例,49 ~ 58 岁。慢性髓细胞白血病患者 16 例(白血病组),其中男 8 例,40 ~ 56 岁;女8 例,40 ~ 62 岁。取骨髓,将 2 组患者分别再分为对照组与 Rg1 组。对照组进行常规培养,即在含 30% 胎牛血清及 1% 青霉素(或链霉素)的低糖培养基中于37 ℃、5% CO_2 的细胞孵育箱培养 2 d。Rg1 组在上述培养体系中另外加 10 μg/mL 人参皂苷 Rg1,其他条件同对照组,培养2 d。可得到正常对照组、正常 Rg1 组、白血病对照组、白血病 Rg1 组 4 个组细胞进行后续实验。

1.2 药品与试剂

药物与试剂包括:Human Anti-CD34 MicroBead Kit (FITC)(NO. 130-046-703)、Human Anti-CD38 MicroBead Kit(NO. 130-092-263)、MS 磁珠分离柱(NO. 130-042-201),Buffer 缓冲液、细胞衰老 β-半乳糖苷酶染色试剂盒、红细胞裂解液、CCK-8 试剂盒(C0037)、Ficoll 分离液。

1.3 免疫磁珠分离纯化人骨髓 $CD34^+/CD38^-$ 细胞及流式细胞术测定纯度

腰椎穿刺获取 CML 患者骨髓,经过置于抗凝管中,上下反复颠倒混匀,置于冰盒里,将骨髓用生理盐水洗涤 2 次,移入离心管,离心后加入 5 mL 红细胞裂解液置于 4 ℃冰箱 5 min,生理盐水洗涤,参照说明书,分离采集骨髓单个核细胞(bone marrow nucleated cells,BMNCs),离心后用计数板计数细胞个数。取 BMNCs 1×10^8 个细胞加入 800 μL Buffer 及 200 μL human anti-CD38-PE 免疫磁珠抗体,轻轻吹打混匀,避光 4 ℃孵育 10 min,加入 800 μL Buffer 及 200 μL anti-biotin 微珠,再避光 4 ℃孵育 30 min。将 MS 分选柱置于分离器磁场中,用干细胞专用 Buffer 冲洗 MS 柱 2 次。用一次性巴氏管将孵好抗体的细胞加入分选柱中使其自然流下,分选出的细胞即为 $CD38^-$ 细胞,再取1×10^8 个 $CD38^-$ 细胞加入 100 μL Fcr blocking reagent、100 μL CD34 microbeads 和 300 μL Buffer,轻轻吹打混匀后 4 ℃避光孵育 30 min。按之前的方法将孵好抗体的细胞悬液缓缓加到 MS 分选柱中,即将流尽时加1 mL Buffer 冲洗 2 次,向 MS 柱中加入 1 mL Buffer,用美天旎 MS 分选柱配套的活塞迅速推出柱子里的细胞,推出的细胞即为实验需要的人骨髓 $CD34^+/CD38^-$ 细胞。

1.4 台盼蓝染色检测细胞的存活率

分别采集各组 $CD34^+/CD38^-$ 细胞悬液各 90 μL,加入 4 g/L 的台盼蓝染液 10 μL,混匀,静置 3 min,血球计数板计数,透明不着色细胞为活细胞,着色胀大、呈淡蓝色为死细胞,计算活细胞百分比。活细胞率 = [活细胞总数/(活细胞总数 + 死细胞总数) × 100%]。

1.5 各组 $CD34^+/CD38^-$ 细胞衰老相关 β-半乳糖苷酶(SA-β-gal)染色

分别收集各组人骨髓 $CD34^+/CD38^-$ 细胞各 1×10^5 个,参照细胞衰老 β 半乳糖苷酶染色试剂盒说明书方法对各组细胞进行染色。染色阳性细胞呈蓝色,倒置相差显微镜下观察 200 个细胞,计数阳性细胞百分率。

1.6 各组 $CD34^+/CD38^-$ 细胞形成造血干/祖细胞集落能力比较

分别取各组 $CD34^+/CD38^-$ 细胞各 4×10^4 个细胞,用移液枪缓慢吸取并加入 1 mL 混合集落专用培养基,混匀后分别按 0.5 mL/孔加入 24 孔细胞培养板,用显微镜每天观察细胞形态,记录各组集落生长情况,培养至第 7 天后计数各组混合集落数,进行统计分析。

1.7 CCK-8 试剂盒检测各组 $CD34^+/CD38^-$ 细胞的增殖能力

在 96 孔板中分别加入各组 $CD34^+/CD38^-$ 细胞,每孔 2×10^4 个细胞,96 孔板周围一排孔不加细胞,只加 100 μL PBS 缓冲液作为空白对照,每孔再加入 10 μL CCK-8 溶液,在细胞培养箱中 37 ℃孵育 4 d,每天分别用酶标仪调节到 450 nm 波长检测的吸光度值(A450),并进行统计分析。

1.8 各组 $CD34^+/CD38^-$ 细胞的细胞周期时相比较

收集各组 $CD34^+/CD38^-$ 细胞,用 PBS 缓冲液洗涤 1 次,70% 的冰乙醇固定过夜,再用 PBS 缓冲液洗涤 2 次,加入 100 μL 牛胰核糖核酸酶(1 g/L),37 ℃水浴孵育 30 min;加入 50 mg/L 的碘化丙啶染色液避光反应 30 min,流式细胞仪进行检测,再用 Multicycle 软件分析各组细胞的细胞周期时相。

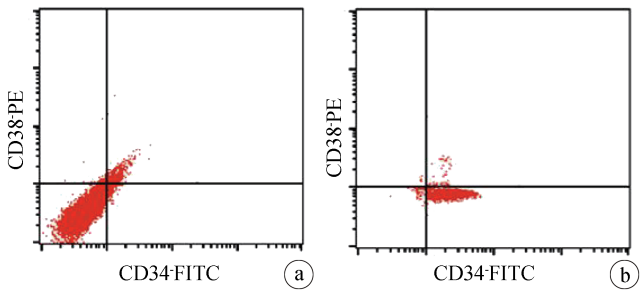
1.9 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件分析,计量数据以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,t 检验及 ANOVA 分析比较不同年龄组各指标差异,相关分析比较各检测指标与年龄变化有无相关性。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MACS 分选前后 $CD34^+/CD38^-$ 细胞纯度比较

按照已发表的免疫磁珠改良分选方法[23]可分选出纯度较高的人骨髓 $CD34^+/CD38^-$ 细胞。流式细胞术(FCM)检测结果显示,分选前每 1×10^6 个 BMNCs 中 $CD34^+/CD38^-$ 细胞群比例为(1.76 ± 0.34)%;免疫磁性分选后每 1×10^6 个细胞中 $CD34^+/CD38^-$ 细胞群比例为(91.15 ± 2.41)%,见图 1。



a:分选前;b:分选后

图 1 各组分选前后 $CD34^+/CD38^-$ 细胞纯度百分比(%)

2.2 台盼蓝染色检测细胞的存活率结果

各组人骨髓 $CD34^+/CD38^-$ 细胞存活率均可达到 98% 以上,正常对照组,正常 Rg1 组,白血病正常组,白血病 Rg1 组分别为(98.06 ± 0.65)%,(99.16 ± 0.52)%,(99.4 ± 0.27)%,(99.0 ± 0.5)%,且各组人骨髓 $CD34^+/CD38^-$ 细胞存活率差异无统计学意义($P>0.05$)。说明分离的细胞纯化高、活性好,各组间无差异,均可用于后续的实验研究。

2.3 骨髓 $CD34^+/CD38^-$ 细胞 SA-β-半乳糖苷酶染色结果

SA-β-半乳糖苷酶染色显示阳性细胞着蓝色,胞浆内可见蓝色颗粒;阴性细胞未着色。白血病对照组 $CD34^+/CD38^-$ 细胞 SA-β-半乳糖苷酶阳性细胞率为(5.45 ± 0.15)%,明显低于正常对照组的(11.5 ± 1.74)%与正常 Rg1 组的(9.81 ± 0.89)%,说明慢性髓细胞白血病患者的 $CD34^+/CD38^-$ 细胞,即白血病干细胞较健康人的 $CD34^+/CD38^-$ 细胞出现逆衰老。而白血病 Rg1 组的 SA-β-半乳糖苷酶阳性细胞率(8.74 ± 0.45)%,相比白血病对照组出现升高,说明人参皂苷 Rg1 可能诱导白血病干细胞趋向了衰老。

2.4 骨髓 $CD34^+/CD38^-$ 细胞 CFU-Mix 形成能力

各组 $CD34^+/CD38^-$ 细胞 CFU-Mix 形成检测结果显示,正常对照组 CFU-Mix 形成(4.58 ± 0.76)个/10^4、正常 Rg1 组(5.34 ± 0.68)个/10^4、白血病对照组(8.69 ± 0.71)个/10^4、白血病 Rg1 组(6.55 ± 0.24)个/10^4。白血病对照组 CFU-Mix 形成率明显高于正常对照组与正常 Rg1 组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。白血病患者的 $CD34^+/CD38^-$ 细胞较健康人的 $CD34^+/CD38^-$ 细胞增殖能力大大增加,集落细胞增大,排列不规则,即出现异常增殖,具有白血病干细胞的特质。而白血病 Rg1 组 $CD34^+/CD38^-$ 的增殖速率相比白血病对照组出现下降,说明人参皂苷 Rg1 可以有效抑制 $CD34^+/CD38^-$ 细胞的异常增殖情况。

2.5 骨髓 $CD34^+/CD38^-$ 细胞增殖生长能力比较

各组 $CD34^+/CD38^-$ 细胞 CCK-8 检测结果提示,白血病对照组增殖能力明显高于正常对照组与正常 Rg1 组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。说明慢性髓细胞白血病患者的 $CD34^+/CD38^-$ 细胞成为白血病干细胞较健康人的 $CD34^+/CD38^-$ 细胞增殖能力大大增加,即出现异常增殖。而白血病 Rg1 组的增殖速率相比白血病对照组出现明显下降,说明人参皂苷 Rg1 可以有效抑制白血病干细胞的异常增殖情况,见图 2。

2.6 各组人骨髓 $CD34^+/CD38^-$ 细胞的细胞周期时相的比较

正常对照组及正常 Rg1 组较白血病对照组出现

明显的 G1 期阻滞，其 G0/G1 期比例明显增高，S 期比例减少，说明白血病对照组的细胞进入分裂期比例高，增殖活跃；白血病 Rg1 组的 G1 期阻滞相比白血病对照组有所升高，说明 Rg1 可以促进白血病干细胞进入 G1 期，减慢白血病干细胞的增殖。而正常 Rg1 组较正常对照组其 G0/G1 期比例明显降低，S 期比例增高，差异具有统计学意义（$P<0.05$），见表 1。说明 Rg1 对正常细胞具有延缓其衰老速度的作用。

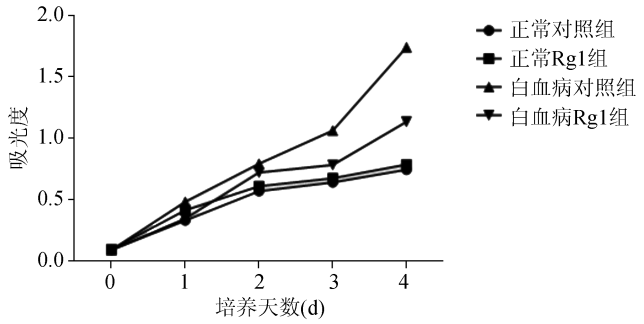


图 2 CCK-8 检测各组人 $CD34^+/CD38^-$ 细胞增殖能力

表 1 各组 $CD34^+/CD38^-$ 细胞的细胞周期分布（$\bar{x}\pm s$，%）

组别	n	G0/G1 期	G2/M 期	S 期
正常对照组	15	90.7±3.3	2.2±1.2	6.1±0.5
正常 Rg1 组	15	85.5±2.9	4.1±1.5	8.9±1.3
白血病对照组	16	71.1±3.2*	8.3±1.9*	19.6±2.7*
白血病 Rg1 组	16	7.3±1.1	6.7±2.1	15.3±0.5

*：与其余各组比较，$P<0.05$

3 讨论

作为造血系统先祖，造血干细胞负责终身生产所有类型的血细胞。这种功能性能力及血细胞数量随年龄显著改变，免疫缺陷和贫血被认为是老年人群发病率和病死率增加的主要因素[5]。适应性和包括淋巴免疫系统（B、T 淋巴细胞）与骨髓白细胞在内的先天免疫系统的协调诱发免疫反应。随着年龄的增加，幼稚 T 细胞的产生显著下降，记忆和效应 T 细胞积累和克隆扩增显著，可导致老年人免疫防御下降，自身免疫增加[6]。B 细胞的数量随着年龄的增长而降低，而且衰老的 B 细胞生成的抗体亲和力和多样性降低[7]。和淋巴系细胞群相比，髓系细胞群随年龄增加而扩大，这使体内形成了一种促炎环境，成为生活的不利因素[8]。此外，其他类免疫细胞，如自然杀伤细胞和树突状抗原呈递细胞，已被证实在老年人机体里数量减少和功能衰退[9-10]。这些“免疫衰老”和“炎性衰老”显型在许多老年人群病理性的重大健康问题中都有涉及，如癌症、自身免疫性疾病、慢性炎症性紊乱。

衰老伴随着基因损伤积累、端粒缩短以及代谢产物的负担。所有这些细胞的变化可激活参与凋亡、衰老或受损细胞增殖的多个信号通路，最终导致衰老干细胞的功能下降[11-16]。老年人（大于 65 岁）骨髓造血干细胞的增殖特性明显高于年轻人（20～30 岁）[11-12]。老年人造血干细胞异种移植到免疫缺陷小鼠不会像年轻人的细胞有效地产生淋巴系后代[11]。

肿瘤干细胞是研究肿瘤极其重要的模型，将干细胞、促肿瘤干细胞衰老与抑制肿瘤生长密切结合，深入研究肿瘤干细胞和促肿瘤干细胞衰老的现代生物学机理，寻找促肿瘤干细胞衰老的方法对抑制肿瘤生长的研究有重大科学意义。慢性髓系白血病是一组起源于造血干/祖细胞的恶性克隆增殖性疾病，迄今治疗仍主要采用大剂量联合化疗，此法副作用大、复发率高，且对正常机体免疫与造血系统有极大的损害。寻找既能抑制白血病细胞恶性增殖、诱导凋亡，副作用又相对较小的天然药物已成为治疗白血病新的思路。白血病干细胞异常增生与分化与白血病有密切的联系。我们最近研究证明，衰老白血病干细胞的 β 半乳糖苷酶（SA-β-gal）表达显著升高；G1 期细胞的百分比增高；体外培养形成 CFU-Mix 能力降低[12-16]。

近年来我们探索了 Rg1 对白血病干细胞衰老调控作用，初步结果已提示，人参皂苷 Rg1 对正常造血干细胞和肿瘤干细胞增殖分化有双向调节作用，对肿瘤干细胞的增殖有明显抑制并能诱导其向成熟方向分化。基于我们既往工作积累和复习文献，我们推测 Rg1 能通过调控 LSCs 等肿瘤干细胞衰老对肿瘤起到辅助治疗作用。如果这一理论被证实，不仅对中医药的衰老与抗衰老理论、中医药对干细胞的认识、建立干细胞衰老研究平台、筛选天然药物抗衰老有效成分均有重要贡献，而且对临床肿瘤治疗新途径摸索也有重要意义[17-23]。

通过本研究得知慢性髓细胞白血病患者的 $CD34^+/CD38^-$ 细胞，即白血病干细胞，较健康人的 $CD34^+/CD38^-$ 细胞出现逆衰老，不仅体现在白血病 Rg1 组 $CD34^+/CD38^-$ 细胞的 SA-β-半乳糖苷酶阳性细胞率比白血病对照组高，还体现在增殖能力，白血病对照组的 $CD34^+/CD38^-$ 细胞集落数量明显高于其他组，集落中的细胞数也高于其他组，细胞杂乱无章，且细胞体积增大。说明慢性髓细胞白血病患者的 $CD34^+/CD38^-$ 细胞较健康人的 $CD34^+/CD38^-$ 细胞增殖能力大大增加，集落细胞增大，排列不规则，即异常增殖。从细胞周期情况来看，正常对照组及正常 Rg1 组较白血病对照组出现明显的 G1 期阻滞，其 G0/G1 期比例明显增高，S 期比例减少，而白血病对照组多数 $CD34^+/CD38^-$ 细胞进入 S 期，意味着其具有活跃的增生能力。CCK-8 增殖曲线可以看出白血病未干预组的

增殖速度远远快于其他两组,且对应时间的细胞数量也高于其他组。而各实验中白血病 Rg1 组的增殖速率及增殖能力相比白血病对照组出现下降,说明人参皂苷 Rg1 可以有效抑制白血病干细胞的异常增殖情况。而在细胞衰老实验中,白血病 Rg1 组的 SA-β-半乳糖苷酶阳性细胞率明显高于白血病对照组,说明人参皂苷 Rg1 可能是通过诱导白血病干细胞趋向了衰老来削弱其增殖能力的。

白血病患者由于某些恶劣因素的影响可能会导致造血干细胞增殖性增强,趋于恶性化,演变成白血病干细胞,导致造血系统恶性肿瘤,这可能是白血病的治疗效果不好,容易复发的根本原因。本研究提示,人参皂苷 Rg1 可诱导白血病干细胞衰老抑制白血病干细胞的增殖分化,控制恶性肿瘤细胞大量扩增,进而控制慢性髓细胞白血病病情的发展,后续研究我们将深入研究其机制及临床应用的可行性,以期为白血病的防治提供参考依据。

[参考文献]

[1] Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell[J]. Nat Med, 1997,3(7):730 - 737.

[2] Wagner W, Bork S, Horn P, et al. Aging and replicative senescence have related effects on human stem and progenitor cells[J]. PloS One, 2009, 4(6):e5846. doi:10.1371/journal.pone.0005846.

[3] Zhu J, Mu X, Zeng J, et al. Ginsenoside Rg1 prevents cognitive impairment and hippocampus senescence in a rat model of D-Galactose-Induced Aging[J]. PloS One, 2014, 9(6):e101291. doi:10.1371/journal.pone.0101291.

[4] Li J, Cai D, Yao X, et al. Protective effect of ginsenoside Rg1 on hematopoietic stem/progenitor cells through attenuating oxidative stress and the Wnt/β-Catenin signaling pathway in a mouse model of d-Galactose-induced aging[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(6):849. doi:10.3390/ijms17060849.

[5] Han S, Yang K, Ozen Z et al. Enhanced differentiation of splenic plasma cells but diminished long-lived high-affinity bone marrow plasma cells in aged mice[J]. J Immunol, 2003, 170(3):1267 - 1273.

[6] Franceschi C, Capri M, Monti D, et al. Inflammaging and anti-inflammaging: A systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans[J]. Mech Ageing Dev, 2007, 128(1):92 - 105. doi:10.1016/j.mad.2006.11.016.

[7] Mocchegiani E, Malavolta M. NK and NKT cell functions in immunosenescence[J]. Aging Cell, 2004, 3(4):177 - 184. doi:10.1111/j.1474 - 9728.2004.00107.x.

[8] Uyemura K, Castle SC, Makinodan T. The frail elderly: role of dendritic cells in the susceptibility of infection[J]. Mech Ageing Dev, 2002, 123(8):955 - 962.

[9] Pang WW, Price EA, Sahoo D et al. Human bone marrow hematopoietic stem cells are increased in frequency and myeloid-biased with age[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(50):20012 - 20017. doi:10.1073/pnas.1116110108.

[10] Kuranda K, Vargaftig J, de la Rochere P, et al. Age-related changes in human hematopoietic stem/progenitor cells[J]. Aging Cell, 2011, 10(3):542 - 546. doi:10.1111/j.1474 - 9726.2011.00675.x.

[11] Notta F, Doulatov S, Laurenti E, et al. Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment[J]. Science, 2011, 333(6039): 218 - 221. doi: 10.1126/science.1201219.

[12] Sahin E, Depinho RA. Linking functional decline of telomeres, mitochondria and stem cells during ageing[J]. Nature, 2010, 464(7288): 520 - 528. doi:10.1038/nature08982.

[13] Yahata T, Takanashi T, Muguruma Y, et al. Accumulation of oxidative DNA damage restricts the self-renewal capacity of human hematopoietic stem cells[J]. Blood, 2011, 118(11):2941 - 2950. doi:10.1182/blood - 2011 - 01 - 330050.

[14] Mantel C, Messina-Graham S, Moh A, et al. Mouse hematopoietic cell-targeted STAT3 deletion: stem/progenitor cell defects, mitochondrial dysfunction, ROS overproduction, and a rapid aging-like phenotype[J]. Blood, 2012, 120(13):2589 - 2599. doi:10.1182/blood - 2012 - 01 - 404004.

[15] Liang Y, Van Zant G, Szilvassy SJ. Effects of aging on the homing and engraftment of murine hematopoietic stem and progenitor cells[J]. Blood, 2005, 106(4):1479 - 1487. doi:10.1182/blood - 2004 - 11 - 4282.

[16] Chen C, Mu X, Zhou Y, et al. Ginsenoside Rg1 enhances the resistance of hematopoietic stem/progenitor cells to radiation-induced aging in mice[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2014, 35(1):143 - 150. doi:10.1038/aps.2013.136.

[17] Hu W, Jing P, Wang L, et al. The positive effects of Ginsenoside Rg1 upon the hematopoietic microenvironment in a D-Galactose-induced aged rat model[J]. BMC Complement Altern Med, 2015, 15:119. doi:10.1186/s12906 - 015 - 0642 - 3.

[18] Gazit R, Weissman IL, Rossi DJ. Hematopoietic stem cells and the aging hematopoietic system[J]. Semin Hematol, 45(4):218 - 224. doi:10.1053/j.seminhematol.2008.07.010.

[19] Chambers SM, Shaw CA, Gatza C, et al. Aging hematopoietic stem cells decline in function and exhibit epigenetic dysregulation[J]. PloS Biol, 2007, 5(8):e201. doi:10.1371/journal.pbio.0050201.

[20] Challen GA, Boles N, Lin KK, et al. Mouse hematopoietic stem cell identification and analysis[J]. Cytometry A, 2009, 75(1):14 - 24. doi:10.1002/cyto.a.20674.

[21] Kent DG, Copley MR, Benz C, et al. (2009) Prospective isolation and molecular characterization of hematopoietic stem cells with durable self-renewal potential[J]. Blood, 2009, 13(25):6342 - 6350. doi:10.1182/blood - 2008 - 12 - 192054.

[22] Yue Zhou, Bing Yang, Xin Yao, et al. Establishment of an aging model of Sca-1$^+$ hematopoietic stem cell and studies on its relative biological mechanisms[J]. In Vitro Cell Dev Biol-Animal, 2010, 47(2):149 - 153. doi:10.1007/s11626 - 010 - 9372 - 5.

[23] 耿 珊,张 琛,刘 俊,等. 免疫磁性活化细胞分选方法优化及纯化后细胞的生物学特性检测[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2012,28(7):752 - 754.

(编辑:刘 艺)