基础研究 文章编号：0253-3626（2011）04-0385-04

小鼠造血干细胞衰老体内模型构建及相关生物学研究

蔡世忠，周 玥，姜 蓉，杨 斌，王亚平
（重庆医科大学基础医学院组织与胚胎学教研室、干细胞与组织工程研究室，重庆 400016）

【摘 要】目的：构建小鼠造血干细胞（Homatopoietic stem cell，HSCs）衰老体内模型，并探讨其生物学特点，为延缓 HSCs 衰老的研究提供平台。方法：免疫磁性分选法分离、纯化雄性鼠的 Sca-1$^+$ HSCs，流式细胞术鉴定分选纯度，免疫荧光检测 Sca-1 表达。将 1×10^4 个雄性供体鼠 Sca-1$^+$ HSCs 经尾静脉移植给 9 Gy ^{60}Co γ 射线全身辐射的雌性受体鼠。PCR 检测移植后受体鼠造血细胞 Y 染色体性别决定（Sex-determining region of Y chromosome，*Sry*）基因，混合造血祖细胞集落（CFU-Mix）培养，细胞周期分析和 SA-β-半乳糖苷酶（SA-β-Gal）染色分析 HSCs 衰老的生物学特点；计数受体鼠脾集落形成单位（CFU-S）、测定脾脏和胸腺指数，检测受体鼠外周血指标（WBC、RBC、PLT、HCT），评价供体鼠 Sca-1$^+$ HSCs 在受体鼠内衰老和造血功能重建情况。结果：免疫磁性分选法得到的 Sca-1$^+$ HSCs 纯度达 87.2%以上。雌性受体鼠的造血细胞均能检测出 342 bp 的 *Sry* 基因。供体鼠 Sca-1$^+$ HSCs 连续 2 次移植后，形成 CFU-Mix 集落数量和形成集落的细胞数明显减少；HSCs 出现 G_1 期阻滞，G_0+G_1 期细胞比例增高，S 期比例下降；SA-β-Gal 染色阳性细胞百分率明显增高；脾脏与胸腺指数明显降低；CFU-S 形成能力下降；外周血各项指标均有下降。结论：雄性供体 Sca-1$^+$ HSCs 移植能有效重建受体鼠造血功能，连续尾静脉移植 2 次能初步建立 HSCs 复制性衰老的体内模型。

【关键词】造血干细胞；衰老；体内模型；连续移植；生物学研究
【中国图书分类法分类号】R329.2 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-11-18

Establishment of Sca-1$^+$ murine hematopoietic stem cell aging model in vivo and its related biologic research

CAI Shi-zhong, et al
(*Institute of Stem Cell and Tissue Engineering, Department of Histology and Embryology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To establish murine hematopoietic stem cell aging model in vivo and identify it with various biologic research and to provide a research platform for delaying senescence of hematopoietic stem cells (HSCs). *Methods*: Sca-1$^+$ HSCs isolated and purified from male donor mice (C57BL/6) by magnetic activated cell sorting (MACS) were analyzed by flow cytometry and immunofluorescence for cell cycle and Sca-1 expression. Serial transplantations were carried out using C57BL/6 female recipients which were conditioned (4.5×2 Gy total body irradiation, with 3 h interval), and then to assay the *Sry* gene of Y Chromosome from recipient mice to identify whether HSCs were from male donor mice.HSCs aging biological characters were analyzed by culturing of CFU-Mix, cell cycle assay and senescence associated β-Galactosidase (SA-β-Gal) staining.Recipient mouse HSCs aging and hematopoiesis reconstruction were observed and evaluated through the count of CFU-S after transplantation, the determination of spleen index and thymus index, and the examination of peripheral blood indexes (WBC, RBC, PLT and HCT). *Results*: The purity of Sca-1$^+$ HSCs isolated from experimental mice through MACS could be achieved 87.2%. *Sry* gene (342 bp) could be detected by the method of PCR in Y chromosome analysis, which confirmed that the female recipient mouse Sca-1$^+$ HSCs totally originated from male donor mice.Spleen index, thymus index, ability of CFU-S forming and peripheral blood indexes (WBC, RBC, PLT and HCT) were dramatically declined. The number of CFU-Mix and the cells which formed CFU-Mix were significantly reduced. HSCs isolated from recipient mice and originated from donor mice were blocked in phase G_1, and the ratio of G_0+G_1 was significantly higher, nevertheless, cells of phase S were reduced.The percentage of positive cells after the staining of SA-β-Gal was obviously higher with the increased number of transplantation. *Conclusion*: Serial tail vein transplantations of Sca-1$^+$ HSCs can preliminarily establish the murine hematopoietic stem cell replicative aging model in vivo.

【Key words】hematopoietic stem cells; aging; model in vivo; serial transplantation; biologic research

作者介绍：蔡世忠（1982-），男，硕士，
研究方向：干细胞生物学、实验血液学。
通信作者：王亚平，男，教授，Email：ypwangcq@yahoo.cn。

基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：30973818）；重庆市科委自然科学基金重点资助项目（编号：CSTC、2009BA5038）。

最新研究认为：机体衰老关键是因其干细胞衰老，如组织器官结构退变、功能丧失、肿瘤发生及反复感染等老年性疾病均是体内干细胞衰老的具体表现[1]。干细胞衰老与相关疾病机理的研究已经成为干细胞领域的热门研究课题。造血干细胞（Hematopoietic stem cells，HSCs）是干细胞研究领域中最早开展，取得研究成果最多，并且在临床上广泛应用的干细胞，因此 HSCs 衰老生物学及其延缓其衰老的研究也备受关注。迄今制约 HSCs 衰老研究的瓶颈是没有公认的、科学的 HSCs 体内衰老模型。本文将雄性供体鼠的 HSCs 连续移植给受致死剂量 $^{60}Co\ \gamma$ 射线辐射的雌性受体鼠，经 HSCs 衰老相关生物学检测，建立了小鼠 HSCs 体内衰老模型，为延缓 HSCs 衰老的研究和老年性疾病的防治提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

C57BL/6 小鼠，6~8 周龄，雌雄均有，体重 20~25 g，由重庆医科大学实验动物中心提供。IMDM 培养液（Gibco 公司），Anti-Sca-1$^+$ Micro Bead Kit（Miltenyi 公司），SA-β-Gal Staining Kit（Cell Signaling 公司），DNA 提取试剂盒（TIANGEN 公司），PCR 试剂盒（TaKaRa 公司），Ficoll 分离液、L-谷氨酰胺、甲基纤维素（Sigma 公司）。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组 取 C57/6 雄性小鼠 6 只以备分选 HSCs；另取 C57/6 雌性小鼠 72 只，随机分为 12 组，其中 6 组作为实验组，6 组作为对照组，分别进行 Y 染色体性别决定（Sex-determining region of Y chromosome，*Sry*）基因检测、脾集落生成数量和脾及胸腺指数检测、外周血指标检测、CFU-Mix 生成数量检测、细胞周期检测、SA-β-Gal 染色实验。

1.2.2 供体雄鼠 Sca-1$^+$HSCs 的分离、纯化及鉴定 取雄鼠股、胫骨，用 IMDM 培养液冲出骨髓，反复抽吸吹打后通过 4 号针头制成骨髓单细胞悬液，Ficoll 法分离骨髓单个核细胞（Marrow mononuclear cells，MNCs），将 5~8 × 10^7 个 MNCs 加入 90 μl Buffer 和 10 μl Anti-Sca-1-FITC，4℃孵育 10 min，离心弃上清，加 80 μl Buffer 和 20 μl Anti-FITC MicroBeads，4℃孵育 20 min，0.5 ml Buffer 重悬细胞并加入磁场分离柱，流出道收集阴性细胞，0.5 ml Buffer 洗柱 3 次，加 0.5 ml Buffer 冲出阳性细胞 Sca-1$^+$ 细胞。将分选前 MNCs 及分选后 Sca-1$^+$ 细胞用流式细胞术检测分选纯度，免疫荧光检测 Sca-1 表达。台盼蓝拒染法检测 Sca-1$^+$ 细胞存活率。

1.2.3 受体雌鼠干细胞移植术前准备 $^{60}Co\ \gamma$ 射线分 2 次辐射雌性小鼠，每次 4.5 Gy，间隔 3 h，辐射距离：75 cm；辐射面积：20 cm × 20 cm。

1.2.4 雄性供体 Sca-1$^+$ HSCs 连续移植 在雌性受体鼠被辐射后 24 h 内，由尾静脉输注 1 × 10^4 个分离纯化得到的雄性供体鼠 Sca-1$^+$HSCs，30 d 后处死。从第 1 代受体鼠骨髓细胞中分离纯化供体 Sca-1$^+$HSCs，用同样方法输注给第 2 代雌性受体鼠，30 d 后处死并进行相关检测。

1.2.5 受体鼠造血细胞 *Sry* 基因检测 按 DNA 提取试剂盒操作规范提取受体鼠骨髓细胞 DNA；*Sry* 基因上、下游引物分别为：5'-CTGGAGCTCTACAGTGATGA-3'、5'-CAGTTACCAATCAACACATCAC-3'；PCR 检测：配制 50 μl 反应体系，Taq 酶（5 U/μl）0.25 μl，10 × PCR Buffer 5 μl，$MgCl_2$（25 mmol/L）3 μl，dNTP 4 μl，模板 DNA 2 μl，*Sry* 基因上下游引物各 0.5 μl，灭菌蒸馏水补齐至 50 μl。扩增条件：预变性 94℃ 5 min；变性 94℃ 30 s，退火 58℃ 30 s，延伸 72℃ 40 s，30 个循环；延伸 72℃ 10 min。PCR 产物进行 2%琼脂糖凝胶电泳，凝胶呈像仪观察并摄图。

1.2.6 受体鼠脾集落（CFU-S）形成能力、脾脏及胸腺指数的测定 受体雌鼠在移植雄性供体鼠 Sca-1$^+$HSCs 后第 8 天处死取脾脏，置 Bouins 液中固定 2 h，体视显微镜下计数脾脏表面 CFU-S 数量。在每代受体鼠 Sca-1$^+$HSCs 移植后第 30 天，处死并称重，再取脾脏、胸腺称重，计算脾脏、胸腺指数。脾脏指数 = 脾脏重量（g）/小鼠体重（g）；胸腺指数 = 胸腺重量（g）/小鼠体重（g）。

1.2.7 连续移植后小鼠外周血相关指标检测 每代受体鼠在移植后第 30 天，取血送检，做血常规分析。

1.2.8 HSCs 衰老相关生物学检测

1.2.8.1 连续移植后 HSCs 形成混合造血祖细胞集落（CFU-Mix）能力检测 将对照组、移植第 1、2 代组 HSCs 0.1 ml（含细胞 1 × 10^4 个）加入 2 ml 甲基纤维素培养体系（2-ME、L-Glu、HS、EPO、IL-3、GM-CSF、MC）混匀后接种于 96 孔板（0.2 ml/孔），于 37℃、5%CO_2、饱和湿度培养箱中培养 7 d 后观察集落形成情况。

1.2.8.2 流式细胞术检测细胞周期 收集对照组及移植后第 1、2 代的 HSCs 各 1 × 10^6 个，洗涤、固定，按要求循序加牛胰核糖核酸酶、碘化丙啶染色液处理，流式细胞仪检测，Multicycle 软件分析细胞周期分布。

1.2.8.3 衰老相关-β-半乳糖苷酶（SA-β-Gal）染色 收集对照组及移植后第 1、2 代的 HSCs 各 1 × 10^6 个，洗涤 2 次，固定细胞 15 min；再洗涤 3 次，加 Staining Solution 1 ml 混匀，37℃、隔绝 CO_2 染色过夜。洗涤后离心涂片，使每玻片的细胞数为 1 × 10^4 个，中性树胶封片镜检。每张随机计数细胞 400 个并计算阳性细胞百分率。

1.3 统计学分析

应用 SPSS 13.0 软件对数据进行统计学分析，计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 q 检验（Newman-keuls）检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 小鼠 Sca-1$^+$ HSCs 分离纯化及鉴定

磁性细胞分选（Magnetic activated cell sorting，MACS）前后用流式细胞术检测 MNCs 中 Sca-1$^+$ 细胞百分率，分选前为 1.7%；分选后达 87.2%。细胞免疫荧光染色可显示此差异（见

图 1）。台盼蓝拒染法检测 Sca-1$^+$ HSCs 存活率为 96%~99%。提示分选的 Sca-1$^+$ 细胞活性良好。

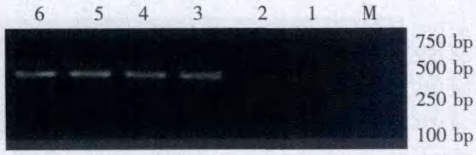


A. MNCs 中 Sca-1 表达　　B. 分选后细胞 Sca-1 表达

图 1　MACS 前后细胞的 Sca-1 的表达差异

2.2　受体鼠骨髓细胞 *Sry* 基因检测

经 PCR 分析，检出了 *Sry* 基因（342 bp），表明使雌性受体鼠重建造血功能的干细胞来源于雄性供体鼠。



M. Marker；1、2. 正常雌鼠；3、4. 正常雄鼠；5，6. 受体雌鼠

图 2　雌性受体鼠 HSCs 中检出 *Sry* 基因

2.3　HSCs 移植后受体鼠脾集落形成单位生成情况

HSCs 在经过 2 代移植之后，受体鼠形成脾集落的数量明显减少。2 代移植鼠脾集落数量有显著差异（$P<0.05$）。

表 1　移植后脾集落生成数量（n=6，$\bar{x}\pm s$）

组别	脾集落数（个）
移植第 1 代	10.00 ± 0.894
移植第 2 代	5.17 ± 0.753*

*$P<0.05$，与移植第 1 代组比较

2.4　HSCs 连续移植后小鼠脾脏指数、胸腺指数的变化

HSCs 连续两代移植后，小鼠免疫器官萎缩，脾脏、胸腺指数随移植代数增加而下降。第 1 代与第 2 代和正常对照组差异有统计学意义（$P<0.05$）；移植第 1、2 代间比较亦是如此。

表 2　移植后小鼠脾脏指数和胸腺指数变化（n=6，$\bar{x}\pm s$）

组别	脾脏指数（$\times10^{-3}$）	胸腺指数（$\times10^{-4}$）
对照组	7.96 ± 0.75	10.94 ± 1.09
移植第 1 代	4.99 ± 0.19^a	8.92 ± 1.09^a
移植第 2 代	2.19 ± 0.23^{a,b}	6.89 ± 0.37^{a,b}

注：组间比较 $F>3.68$，$P<0.05$（$\nu_1=\nu_2=15$）；两两比较 $q>3.15$，$^{a,b}P<0.05$（a=2，$\nu=10$；$^aP<0.05$：移植组与正常对照组比较；$^bP<0.05$：移植第 2 代与第 1 代之间比较）

2.5　HSCs 连续移植后受体鼠外周血恢复情况

随移植代数增加，小鼠造血重建能力下降，移植后与正常对照组相比其 WBC、RBC、HCT 和 PLT 皆有下降，有显著差异（$P<0.05$）；移植第 1、2 代间比较亦是如此。

表 3　HSCs 连续移植后外周血常规指标变化（n=6，$\bar{x}\pm s$）

组别	WBC（10^9 个/L）	RBC（10^{12} 个/L）	PLT（10^{11} 个/L）	HCT（%）
对照组	9.73 ± 0.26	10.51 ± 0.25	9.06 ± 0.45	49.08 ± 2.26
移植第 1 代	7.37 ± 0.20^a	6.93 ± 0.28^a	4.85 ± 0.32^a	35.58 ± 3.97^a
移植第 2 代	0.81 ± 0.10^{a,b}	4.42 ± 0.31^{a,b}	2.50 ± 0.27^{a,b}	22.10 ± 1.48^{a,b}

注：组间比较 $F>3.68$，$P<0.05$（$\nu_1=\nu_2=15$）；两两比较 $q>3.15$，$^{a,b}P<0.05$（a=2，$\nu=10$；$^aP<0.05$：移植组与正常对照组比较；$^bP<0.05$：移植第 2 代与第 1 代之间比较）

2.6　连续移植后受体鼠 HSCs 形成 CFU-Mix 集落能力检测

连续移植后分选受体鼠 HSCs 于甲基纤维素体系培养 7 d，其形成 CFU-Mix 集落数量随移植代数的增加而减少，有显著差异，$P<0.05$；移植第 1、2 代间比较亦是如此。

表 4　受体鼠 HSCs 形成 CFU-Mix 情况（n=6，$\bar{x}\pm s$）

组别	混合集落个数（/10^4 个）
对照组	7.67 ± 0.82
移植第一代	4.67 ± 0.82^a
移植第二代	2.17 ± 0.75^{a,b}

注：组间比较 $F>3.68$，$P<0.05$（$\nu_1=\nu_2=15$）；两两比较 $q>3.15$，$^{a,b}P<0.05$（a=2，$\nu=10$；$^aP<0.05$：移植组与正常对照组比较；$^bP<0.05$：移植第 2 代与第 1 代之间比较）

2.7　连续移植对受体鼠 HSCs 细胞周期的影响

HSCs 经连续移植后，出现 G_1 期阻滞，G_0 和 G_1 期比例明显增高，S 期比例下降，与正常对照组相比有显著差异，$P<0.05$，移植第 1、2 代间比较亦是如此。

2.8　连续移植后受体小鼠 HSCs SA-β-Gal 染色情况

连续移植后，移植组小鼠 HSCs SA-β-Gal 染色阳性细胞百分比明显高于正常对照组，两代移植组间亦有差异，$P<0.05$。

表 5　受体鼠 HSCs 细胞周期分布（n=6，$\bar{x}\pm s$，%）

组别	G_0+G_1 期	S期	G_2+M 期
对照组	65.25 ± 1.70	23.48 ± 1.73	11.27 ± 0.45
移植第 1 代	70.50 ± 0.31^a	20.85 ± 0.37^a	8.75 ± 0.26^a
移植第 2 代	86.78 ± 0.69^{a,b}	8.97 ± 0.44^{a,b}	4.33 ± 0.50^{a,b}

注：组间比较 $F>3.68$，$P<0.05$（$\nu_1=\nu_2=15$）；两两比较 $q>3.15$，$^{a,b}P<0.05$（a=2，$\nu=10$；$^aP<0.05$：移植组与正常对照组比较；$^bP<0.05$：移植第 2 代与第 1 代之间比较）

表 6　受体小鼠HSCs SA-β-Gal染色阳性细胞百分率（n=6，$\bar{x}\pm s$，%）

组别	SA-β-Gal 染色阳性百分率
对照组	9.43 ± 0.55
移植第 1 代	51.46 ± 1.12^a
移植第 2 代	70.64 ± 0.51^{a,b}

注：组间比较 $F>3.68$，$P<0.05$（$\nu_1=\nu_2=15$）；两两比较 $q>3.15$，$^{a,b}P<0.05$（a=2，$\nu=10$；$^aP<0.05$：移植组与正常对照组比较；$^bP<0.05$：移植第 2 代与第 1 代之间比较）

3　讨　论

以我国为典型的诸多国家已步入老龄化社会，加之人口平均寿命延长，延缓衰老的研究也被众多学者青睐。生命体



A. 对照组　　B. 移植第 1 代　　C. 移植第 2 代

图 3　HSCs 的 SA-β-Gal 染色情况（×400）

固有一死，长生不老终成幻想，但延缓衰老的进程却颇为可行。衰老不可逆转，但病理性衰老则能避免，细胞同其他生物体一样，有一定寿命。正常细胞只经历有限的分裂次数，即 Hayflick 界限，便进入一种不可逆的增殖停滞状态，即复制性衰老。此状态下细胞可继续保持生理活性，但在促分裂刺激下已无力启动 DNA 合成。衰老的过程相对稳定，进入衰老阶段后，细胞不可逆地丧失增殖能力，其 G_1 期 DNA 含量的增长受到抑制，不能进入 S 期，但能在长时间内保持代谢活性。

近年研究认为[2,3]：机体内环境稳态间接地由组织特异的干细胞维持，而衰老组织在应激或损伤状态时维持和恢复稳态的能力下降，这与衰老组织中干细胞数量减少和功能衰退有着密切关系，生物体衰老可归因于干细胞衰老。HSCs 是造血谱系中最重要的细胞当然也难逃衰老进程，研究表明：尽管在衰老过程中造血系统的基本成分得以维持，但 HSCs 的数量和质量是逐渐降低的[4,5]。

通过连续移植建立 HSCs 衰老模型，为延缓衰老，防治老年性疾病提供了实施的可能。取雄性鼠骨髓经免疫磁珠分选后得到高纯度的 HSCs，移植于受致死剂量射线辐射的雌性鼠，30 d 后分离纯化 HSCs，进行分析 *Sry* 基因[6]是哺乳动物雄性的性别决定基因。小鼠的 *Sry* 基因位于 Y 染色体上，只含有单个外显子，位于一个 2.8 kb 的单一序列的延伸部分，侧翼是一个至少 15 kb 的反向重复序列。因为 *Sry* 基因具有性别特异性，所以我们通过 PCR 技术检测受体小鼠 HSCs 中是否有 *Sry* 基因的存在，来证明使受体鼠重建造血的细胞的来源。有 Y 染色体细胞的百分率可显示受体骨髓中供体衍生的细胞量，由此确定供体细胞是否在受体重建造血功能。受致死量辐射的小鼠的造血系统彻底被摧毁，在移植后计数脾集落形成数量，能反映 HSCs 的数量和功能，我们在连续移植中发现脾集落形成单位的数量明显减少。HSCs 功能改变时，免疫系统不可避免的会受到影响，反之，在免疫器官形态重量发生改变时，也会反映出 HSCs 功能的变化[7]。试验中脾脏指数和胸腺指数随移植代数增加而下降，表明在 HSCs 连续移植过程中，其多向分化能力有所下降。实验组小鼠外周血三系血细胞与正常对照组小鼠相比皆有明显的下降。说明在连续移植的过程中，因为 HSCs 的过度动员，导致其数量与质量都有所下降。CFU-Mix 数量在连续移植中的减少也支持 HSCs 进入衰老进程。细胞周期停滞是其衰老的特征，研究中发现处于 G_1 期细胞比例增加，而增殖活跃的 G_2/M 期 +S 期细胞减少，出现了 HSCs 增殖抑制，不可逆的进入 G_1 期，出现了 HSCs 储备的消耗，并出现衰老。SA-β-Gal 活性是评价细胞衰老程度的重要标志之一，其活性反映细胞溶酶体的功能状态，衰老细胞溶酶体清除衰老细胞器的能力减弱，从而引起溶酶体内容物增多，体积增大，SA-β-Gal 水平增高反映的不是机体的真实年龄，而是生物学年龄，能较好地体现 HSCs 衰老情况[1,8]，以上诸多对衰老模型建立的评价均支持此模型得到了成功构建。

再生医学的崛起使得人类不只是身无疾病的生存，而是身心健康的生活。用当代医学诠释祖国医学的研究中发现[1]，在补气生血方中不可或缺的君药——人参中提取的皂苷和多糖能行之有效地正向调节造血干祖细胞，延缓其衰老。淫羊藿总黄酮亦能延缓体细胞衰老。最新研究发现[9]，人体精液的成分——亚精胺，能显著地延长酵母菌、蝇类、蠕虫以及人类免疫细胞的寿命。层出不穷的延缓衰老物质的发现与衰老模型，尤其是干细胞衰老模型的缺乏形成了鲜明对比，本文拟建了 HSCs 的衰老模型，旨在为多种延缓造血衰老的有效成分提供可行的研究平台，为老年医学的研究提供帮助。

参 考 文 献

[1] 王亚平，王建伟，吴　宏，等.干细胞衰老与疾病[M].北京：科学出版社，2009.1-22.

[2] Rossi D J，Bryder D，Weissman I L.Hematopoietic stem cell aging：Mechanism and consequence[J].Experimental Gerontology，2007，42(5)：385-390.

[3] Rossi D J，Bryder D，Zahn J M，et al.Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging[J].Proc Natl Acad Sci USA，2005，102(26)：9194-9199.

[4] Chambers S M，Goodell M A.Hematopoietic stem cell aging：wrinkles in stem cell potential[J].Stem Cell Rev，2007，3(3)：201-211.

[5] Geiger H，Rennebeck G，Van Zant G.Regulation of hematopoietic stem cell aging in vivo by a distinct genetic element[J].Proc Natl Acad Sci，2005，102(14)：5102-5107.

[6] Bradford S T，Hiramatsu R，Maddugoda M P，et al. The cerebellin 4 precursor gene is a direct target of SRY and SOX9 in mice[J].Biol Reprod，2009，80(6)：1178-1188.

[7] Linton P J，Dorshkind K.Age-related changes in lymphocyte development and function[J].Nat Immunol，2004，5(2)：133-139.

[8] Dimri G P，Lee X，Basile G，et al.A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo[J]. Proc Natl Acad Sci USA，1995，92(20)：9363-9367.

[9] Eisenberg T，Knauer H，Schauer A，et al.Induction of autophagy by spermidine promotes longevity[J].Nat Cell Biol，2009，11(11)：1277-1278.

（责任编辑：关蕴良）