

• 药理与临床 •

人参皂苷 Rg₁ 在造血干/祖细胞连续移植中抗细胞衰老的作用机制

周 玥, 姜 蓉, 姚 欣, 杨 斌, 蔡世忠, 刘 俊, 刘典锋, 王亚平*

重庆医科大学 干细胞与组织工程研究室 组织学与胚胎学教研室, 重庆 400016

摘 要: 目的 探讨人参皂苷 Rg₁ 在造血干/祖细胞 (HSC/HPC) 连续移植中抗细胞衰老的作用机制。方法 免疫磁性分选法分离纯化的雄性供体小鼠 Sca-1⁺HSC/HPC 连续移植 3 代构建 HSC/HPC 衰老体内模型。经 ⁶⁰Co γ 射线致死剂量辐射的雌性受体小鼠分成 4 组: 对照组、模型组、人参皂苷 Rg₁ (20 mg/kg) 治疗给药组、人参皂苷 Rg₁ (20 mg/kg) 预防给药组, 每天给药 1 次, 连续给药 30 d。荧光定量 PCR 法检测各组小鼠 Sca-1⁺HSC/HPC p16^{INK4a}、p19^{Arf}、p53、p21^{Cip1/Waf1} 基因的表达, Western blotting 法检测 p16^{INK4a}、p21^{Cip1/Waf1}、CDK4、CDK2、CyclinD1、Cyclin E 蛋白的表达。结果 与模型组比较, 各代移植 Sca-1⁺HSC/HPC 雌性小鼠中, 人参皂苷 Rg₁ 治疗给药组及预防给药组小鼠 Sca-1⁺HSC/HPC p16^{INK4a}、p19^{Arf}、p53、p21^{Cip1/Waf1} 基因及 p16^{INK4a}、p21^{Cip1/Waf1}、CyclinD1 蛋白表达下调; CDK4、CDK2、CyclinE 蛋白表达上调。人参皂苷 Rg₁ 预防给药组小鼠各项检测指标的改善均优于其治疗给药组。结论 人参皂苷 Rg₁ 可能通过调控 p16^{INK4a}-Rb 和 p19^{Arf}-p53-p21^{Cip1/Waf1} 信号转导通路, 对 Sca-1⁺HSC/HPC 连续移植衰老模型发挥拮抗作用。

关键词: 人参皂苷 Rg₁; 造血干/祖细胞; 衰老; 信号转导通路; 连续移植

中图分类号: R282.710.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)21-3011-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.21.013

Mechanism of ginsenoside Rg₁ against hematopoietic stem/progenitor cells senescence during serial transplantation

ZHOU Yue, JIANG Rong, YAO Xin, YANG Bin, CAI Shi-zhong, LIU Jun, LIU Dian-feng, WANG Ya-ping

Laboratory of Stem Cell and Tissue Engineering, Department of Histology and Embryology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of ginsenoside Rg₁ against the hematopoietic stem/progenitor cell (HSC/HPC) senescence during serial transplantation. **Methods** Male mice Sca-1⁺HSC/HPC isolated and purified by magnetic activated cell sorting (MACS) were transplanted for three generations to establish aging *in vivo* model of mice. The female recipient mice radiated lethal dose from ⁶⁰Co γ ray were divided into four groups: the control, model, Rg₁-treated (20 mg/kg), and Rg₁ prevention (20 mg/kg) groups. The mice were administered once daily for 30 d. The expression of p16^{INK4a}, p19^{Arf}, p53, and p21^{Cip1/Waf1} mRNA was detected by quantitative PCR. The expression of p16^{INK4a}, p21^{Cip1/Waf1}, CDK4, CDK2, CyclinD1, and CyclinE proteins was examined by Western blotting. **Results** Compared with the model group, the expression of p16^{INK4a}, p19^{Arf}, p53, p21^{Cip1/Waf1} mRNA and p16^{INK4a}, p21^{Cip1/Waf1}, CyclinD1 proteins was down-regulated, and the expression of CDK4, CDK2, and CyclinE proteins was up-regulated in both Rg₁-treated and Rg₁ prevention groups. The all index changes of mice in Rg₁ prevention group were significantly higher than those of mice in Rg₁-treated group. **Conclusion** Rg₁ could prevent and treat the Sca-1⁺HSC/HPC senescence during serial transplantation in which the signaling pathways of p16^{INK4a}-Rb and p19^{Arf}-p53-p21^{Cip1/Waf1} may play an important role.

Key words: ginsenoside Rg₁; hematopoietic stem/progenitor cells; senescence; signal transduction pathway; prevention administration

人参具有抗衰老、抗氧化、促进细胞增殖与分化等作用, 人参皂苷 Rg₁ 是其抗衰老的有效成分之

一^[1-4]。前期研究发现, 人参皂苷 Rg₁ 能有效延缓小鼠 Sca-1⁺造血干/祖细胞 (Sca-1⁺HSC/HPC) 的衰老,

收稿日期: 2013-02-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30973818, 81202785)

作者简介: 周 玥, 女, 博士, 副教授, 主要研究方向为干细胞生物学。E-mail: zhouyue_120@sina.com

*通信作者 王亚平 E-mail: ypwangcq@yahoo.com

但作用机制不明^[5]。HSC/HPC 连续移植是构建 HSC/HPC 衰老体内模型的经典方法。本实验采用 Sca-1⁺HSC/HPC 连续移植建立 Sca-1⁺HSC/HPC 小鼠衰老体内模型, 研究人参皂苷 Rg₁ 延缓衰老的作用与相关衰老信号分子之间的关系, 为人参皂苷 Rg₁ 抗衰老作用提供实验依据。

1 材料

1.1 药物与试剂

人参皂苷 Rg₁ (质量分数>95%), 吉林宏久生物科技有限公司, 批号 060427; IMDM、胎牛血清、马血清, Gibco 公司; Anti-Sca-1⁺ Micro Bead 试剂盒, Miltenyi 公司; 衰老相关 β -半乳糖苷酶 (SA- β -Gal) 染色试剂盒, Cell Signaling 公司; L-谷氨酰胺、甲基纤维素, Sigma 公司; 重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (rhGM-CSF)、重组人促红细胞生成素 (rhEPO), 麒麟鲲鹏生物药业有限公司; PCR 引物, Invitrogen 公司; Sybr green I, Biorad 公司; 荧光定量 PCR 试剂盒, TaKaRa 公司; 兔抗鼠一抗、羊抗兔二抗, SantaCruz 公司; 蛋白裂解液, Applygen 公司; 电化学发光 (ECL)、碘化丙啶试剂盒, Pierce 公司。

1.2 动物

清洁级 C57BL/6 小鼠, 6~8 周龄, 雌雄均有, 体质量 20~25 g, 由重庆市医学实验动物中心提供, 许可证号 SCXK (渝) 2007-0001。

1.3 仪器

印迹电泳转移系统、荧光定量 PCR 仪, BioRad 公司; 流式细胞仪, Becton-Dickinson 公司。

2 方法

2.1 模型制备及分组与给药

按照前期研究方法^[6], 用免疫磁性分选法分离、纯化雄性小鼠 Sca-1⁺HSC/HPC 细胞。雌性小鼠给予致死剂量 (8.5 Gy) ⁶⁰Co γ 线辐射全身 1 次建立造血衰竭模型。造模后将小鼠分成 4 组: 辐射组, 小鼠辐射后 4~6 h 尾 iv 无菌磷酸盐缓冲液 (PBS) 0.2 mL (小鼠辐射后, 7~15 d 动物全部死亡, 证明受照射小鼠所受辐射剂量为致死剂量, 动物造血功能衰竭); 衰老模型组, 小鼠辐射后 4~6 h 后经尾静脉移植 Sca-1⁺HSC/HPC 悬液 0.2 mL (含 Sca-1⁺HSC/HPC 2×10^4 个); 治疗给药组, 按模型组方法移植 Sca-1⁺HSC/HPC, 移植后 ip 给予人参皂苷 Rg₁ 20 mg/kg (经 SA- β -Gal 染色和细胞周期预实验筛选, 20 mg/kg 为最佳剂量), 每天 1 次, 连续给药 30 d; 预防给药组,

小鼠辐射前 10 d 每天给予人参皂苷 Rg₁ (20 mg/kg) 1 次, 辐射后处理同治疗给药组。Sca-1⁺HSC/HPC 移植后 30 d, 从第 1 代受体雌鼠骨髓细胞中分离、纯化 Sca-1⁺HSC/HPC 供体, 同法输入各组第 2 代受体雌鼠体内, 连续移植 3 代。

2.2 检测 HSC/HPC 衰老相关指标

2.2.1 SA- β -Gal 染色 分离、纯化第 1~3 代各组受体雌鼠 Sca-1⁺HSC/HPC, PBS 离心洗涤 2 次, 按照 SA- β -Gal 染色试剂盒说明书操作, 染色细胞在 37 °C、无 CO₂ 条件下孵育 12 h, 离心甩片, 使每张甩片的细胞数为 1×10^4 个, 70%甘油封片镜检 ($\times 200$)。每张甩片随机计数 400 个细胞, 观察和计数阳性细胞的百分比。

2.2.2 造血祖细胞混合集落 (CFU-Mix) 培养 参照文献方法^[7-8]加以改进。向 CFU-Mix 中依次加入 2-巯基乙醇 (1×10^{-4} mol/L)、3% L-谷氨酰胺、马血清、rhEPO、白细胞介素-3 (IL-3)、rhGM-CSF、2.7%甲基纤维素, 再分别加入各组第 1~3 代 Sca-1⁺HSC/HPC 1×10^4 个, 总体积 2 mL。充分混匀后接种于 96 孔板, 0.2 mL/孔, 于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养 7 d, 根据种植 Sca-1⁺HSC/HPC 数与形成 CFU-Mix 数评价各组 Sca-1⁺HSC/HPC 形成造血祖细胞集落的能力与多向分化潜能。

2.2.3 流式细胞术检测 Sca-1⁺HSC/HPC 细胞周期 各组第 1~3 代 Sca-1⁺HSC/HPC 经 70%冰乙醇固定过夜, 加入 100 μ L 牛胰核糖核酸酶, 37 °C 孵育 30 min, 碘化丙啶染色 30 min, 流式细胞仪检测细胞周期时相。

2.2.4 荧光定量 PCR 法检测相关基因的表达 提取第 1~3 代受体小鼠 Sca-1⁺HSC/HPC 总 RNA, 紫外分光光度计测定总 RNA 在 260、280 nm 处的吸光度 (A) 值, 1%凝胶电泳鉴定完整性, 将总 RNA 反转录为相应的 cDNA。荧光定量 PCR 反应体系 (50 μ L): 2 $\times$ PCR 缓冲液 25 μ L, 25 pmol/ μ L p16^{INK4a}、或 p19^{Arf}、或 p53、或 p21^{Cip1/Waf1}、或 β -actin 上游及下游引物 (表 1) 各 0.6 μ L, cDNA 1 μ L, Sybr green I 0.3 μ L, DEPC 水 22.5 μ L。反应条件: 94 °C, 4 min; 94 °C, 20 s; 60 °C, 30 s; 72 °C, 30 s; 循环 35 次; 72 °C 检测荧光信号。每个样本做 3 个平行管。引物均由上海生工公司合成。

2.2.5 Western blotting 法检测相关蛋白的表达 提取第 1~3 代受体小鼠 Sca-1⁺HSC/HPC 总蛋白, 按

表 1 基因引物序列及片段长度
Table 1 Primer sequences and fragment length

基 因	引物序列	片段长度 / bp
p16 ^{INK4a}	正向: 5'-ATGGAGTCCGCTGCAGACAG-3' 反向: 5'-ATCGGGGTACGACCGAAAG-3'	121
p19 ^{Arf}	正向: 5'-GGGTCGCAGGTTCTTGGTC-3' 反向: 5'-GTGCGGCCCTCTTCTCAA-3'	172
p53	正向: 5'-CCCCAGGATGTTGAGGAGTT-3' 反向: 5'-TTGAGAAGGGACAAAAGATGACA-3'	153
p21 ^{Cip1/Waf1}	正向: 5'-ACTTCCTCTGCCCTGCTGC-3' 反向: 5'-GGTCTGCCTCCGT 无 TTTCG-3'	138
β-actin	正向: 5'-GAGACCTTCAACACCCCAGC-3' 反向: 5'-ATGTCACGCACGATTTCCC-3'	263

BCA 蛋白检测试剂盒说明书方法测定总蛋白。取等量总蛋白,经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳分离,转移至硝酸纤维膜,5%脱脂奶粉封闭 2 h,分别加入兔抗鼠 p16^{INK4a}、CDK4、Cyclin D1、p21^{Cip1/Waf1}、CDK 2、Cyclin E 一抗,4 ℃过夜。充分漂洗后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗,室温反应 2 h,ECL 增强发光试剂显色,凝胶成像系统曝光,显影定影后观察结果。

2.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,SAS 10.1 统计学软件进行析因设计、单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法。

3 结果

3.1 对 Sca-1⁺HSC/HPC SA-β-Gal 染色阳性率的影响

SA-β-Gal 染色阳性细胞胞浆内可见蓝色颗粒;阴性细胞不着色。结果见图 1。衰老模型组随移植代数增加,每代移植受体小鼠 Sca-1⁺HSC/HPC SA-β-Gal 染色阳性率增加。人参皂苷 Rg₁ 治疗给药组与预防给药组各代 Sca-1⁺HSC/HPC SA-β-Gal 染色阳性率低于同代模型组,且预防给药组的效果更为显著。结果见图 2。

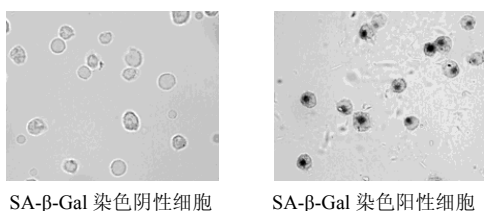
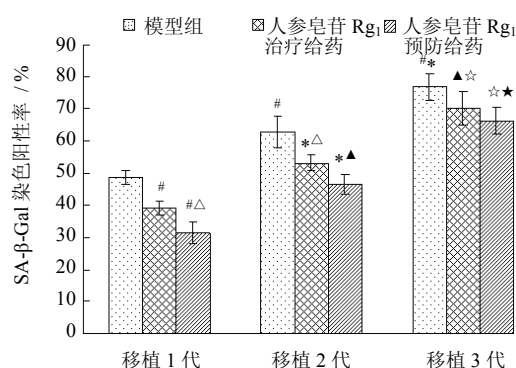


图 1 Sca-1⁺HSC/HPC SA-β-Gal 染色结果
Fig. 1 SA-β-Gal staining to Sca-1⁺HSC/HPC



与移植 1 代模型组比较: [#] $P < 0.01$; 与移植 2 代模型组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与移植 3 代模型组比较: [☆] $P < 0.05$; 与移植 1 代人参皂苷 Rg₁ 治疗给药组比较: [△] $P < 0.05$; 与移植 2 代人参皂苷 Rg₁ 治疗给药组比较: [▲] $P < 0.05$; 与移植 3 代人参皂苷 Rg₁ 治疗给药组比较: ^{*} $P < 0.05$, 下表、图同

[#] $P < 0.01$ vs model group of first transplantation group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group of second transplantation group; [☆] $P < 0.05$ vs model group of third transplantation group; [△] $P < 0.05$ vs Rg₁-treated group of first transplantation group; [▲] $P < 0.05$ vs Rg₁-treated group of second transplantation group; ^{*} $P < 0.05$ vs Rg₁-treated group of third transplantation group, same as below tables and figures

图 2 人参皂苷 Rg₁ 对 Sca-1⁺HSC/HPC SA-β-Gal 染色阳性率的影响

Fig. 2 Effect of Rg₁ on positive cell rates of SA-β-Gal staining to Sca-1⁺HSC/HPC

3.2 对 Sca-1⁺HSC/HPC 形成 CFU-Mix 能力的影响

随移植代数的增加,每代受体小鼠 Sca-1⁺HSC/HPC 形成 CFU-Mix 的数逐渐减少。人参皂苷 Rg₁ 治疗给药组与预防给药组各代 Sca-1⁺HSC/HPC 形成 CFU-Mix 的数多于同代衰老模型组,且 CFU-Mix 在预防给药组的数多于同代治疗给药组。结果见表 2。

3.3 对 Sca-1⁺HSC/HPC 细胞周期的影响

随移植代数的增加,受体小鼠处于 G₀/G₁ 期的 Sca-1⁺HSC/HPC 比例明显增大,增殖指数 (proliferation index, PI) (S+G₂/M) 明显降低。人参皂苷 Rg₁ 治疗给药组与预防给药组各代 Sca-1⁺HSC/HPC 处于 G₀/G₁ 期的比例低于同代衰老模型组,而 PI 高于同代衰老模型组;且预防给药组各指标的改变优于治疗给药组。结果见表 3。

表 2 人参皂苷 Rg₁ 对 Sca-1⁺HSC/HPC 形成 CFU-Mix 数量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of Rg ₁ on number of CFU-Mix to Sca-1 ⁺ HSC/HPC ($\bar{x} \pm s, n = 6$)			
组 别	CFU-Mix 数量		
	移植 1 代	移植 2 代	移植 3 代
模型	10.23±3.10	7.07±2.06 [#]	2.31±1.38 ^{#*}
人参皂苷 Rg ₁ 治疗给药	15.23±1.36 [#]	10.15±4.06 ^{*△}	4.85±2.03 ^{▲☆}
人参皂苷 Rg ₁ 预防给药	17.15±4.14 ^{#△}	13.08±2.93 ^{*▲}	6.15±2.27 ^{☆★}

表 3 人参皂苷 Rg₁ 对 Sca-1⁺HSC/HPC 细胞周期分布及 PI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of Rg₁ on cell cycle distribution and PI to Sca-1⁺HSC/HPC ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组 别		细胞周期 / %			PI / %
		G ₀ /G ₁ 期	G ₂ /M 期	S 期	
移植 1 代	模型	64.19±7.83	11.78±1.75	24.03±7.32	35.81±7.83
	人参皂苷 Rg ₁ 治疗给药	56.58±3.99 [#]	12.23±1.16 [#]	31.31±3.84 [#]	43.54±3.96 [#]
	人参皂苷 Rg ₁ 预防给药	52.41±4.97 ^{#△}	12.46±2.22 ^{#△}	35.13±3.31 ^{#△}	47.59±4.97 ^{#△}
移植 2 代	模型	76.74±5.88 [#]	7.55±2.08 [#]	15.71±4.14 [#]	23.27±5.88 [#]
	人参皂苷 Rg ₁ 治疗给药	69.49±5.57	9.57±2.37	20.94±3.82	30.51±5.57
	人参皂苷 Rg ₁ 预防给药	61.41±7.55 [▲]	10.49±1.54 [▲]	28.11±6.21 [▲]	38.59±7.55 [▲]
移植 3 代	模型	86.05±7.22 [#]	4.79±2.57 [#]	9.17±5.03 [#]	13.96±7.22 [#]
	人参皂苷 Rg ₁ 治疗给药	77.77±6.57 [☆]	7.35±2.75 [☆]	15.21±3.53 [☆]	22.23±6.57 [☆]
	人参皂苷 Rg ₁ 预防给药	72.03±7.23 ^{☆★}	7.80±2.52 ^{☆★}	20.17±5.36 ^{☆★}	27.97±7.23 ^{☆★}

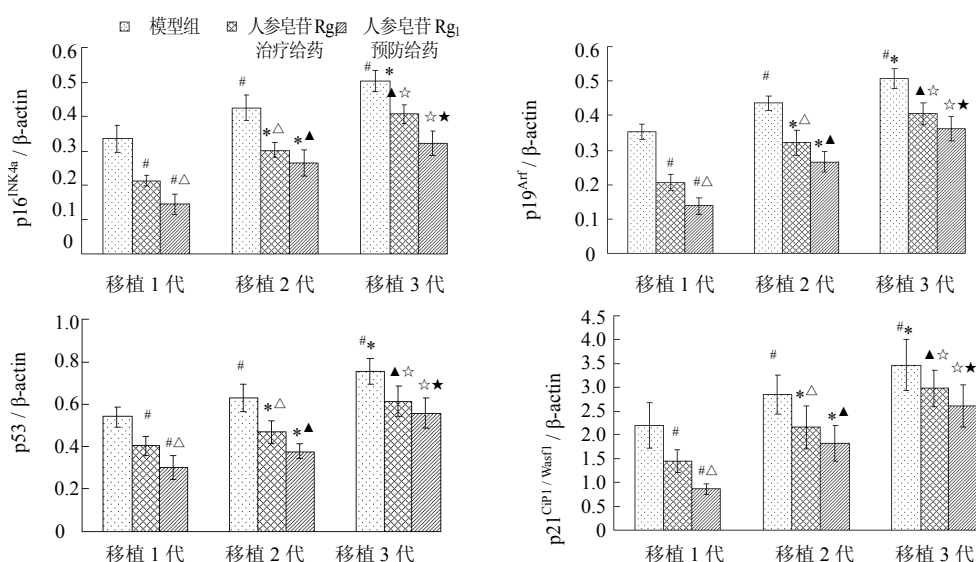


图 3 人参皂苷 Rg₁ 对 Sca-1⁺HSC/HPC 相关基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Effect of Rg₁ on expression of related genes to Sca-1⁺HSC/HPC ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.5 对 Sca-1⁺HSC/HPC 相关蛋白表达的影响

随细胞移植代数的增加,受体小鼠 Sca-1⁺HSC/HPC p16^{INK4a}、p21^{Cip1/Waf1}、Cyclin D1 蛋白表达明显上调,CDK4、CDK2、Cyclin E 蛋白表达明显下调。人参皂苷 Rg₁ 治疗给药组及预防给药组各

代 Sca-1⁺HSC/HPC p16^{INK4a}、p21^{Cip1/Waf1}、Cyclin D1 蛋白表达水平明显低于同代衰老模型组,CDK4、CDK2、Cyclin E 蛋白表达明显高于同代衰老模型组,且预防给药组的效果明显强于同代治疗给药组。结果见图 4、5。

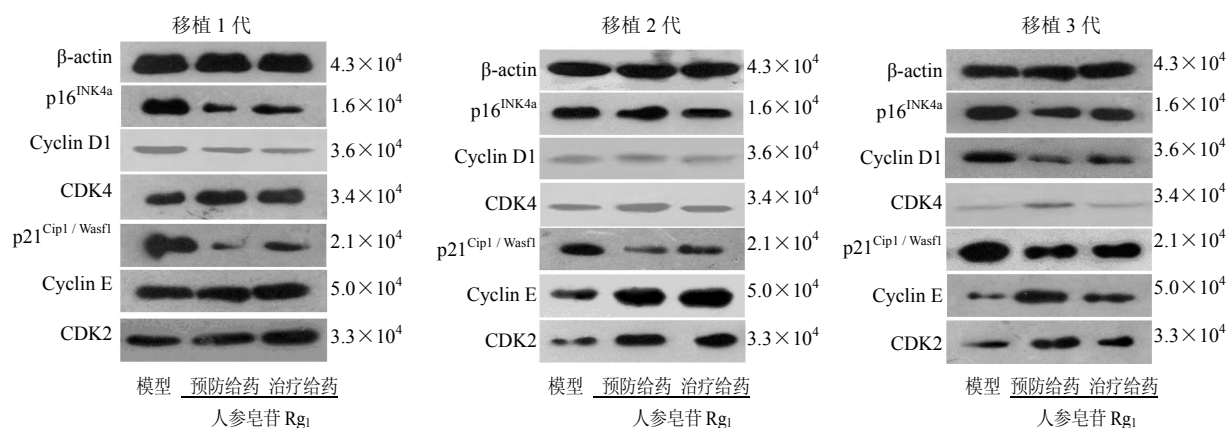


图 4 人参皂苷 Rg₁ 对 Sca-1⁺HSC/HPC 相关蛋白表达的影响

Fig. 4 Effect of Rg₁ on expression of related proteins to Sca-1⁺HSC/HPC

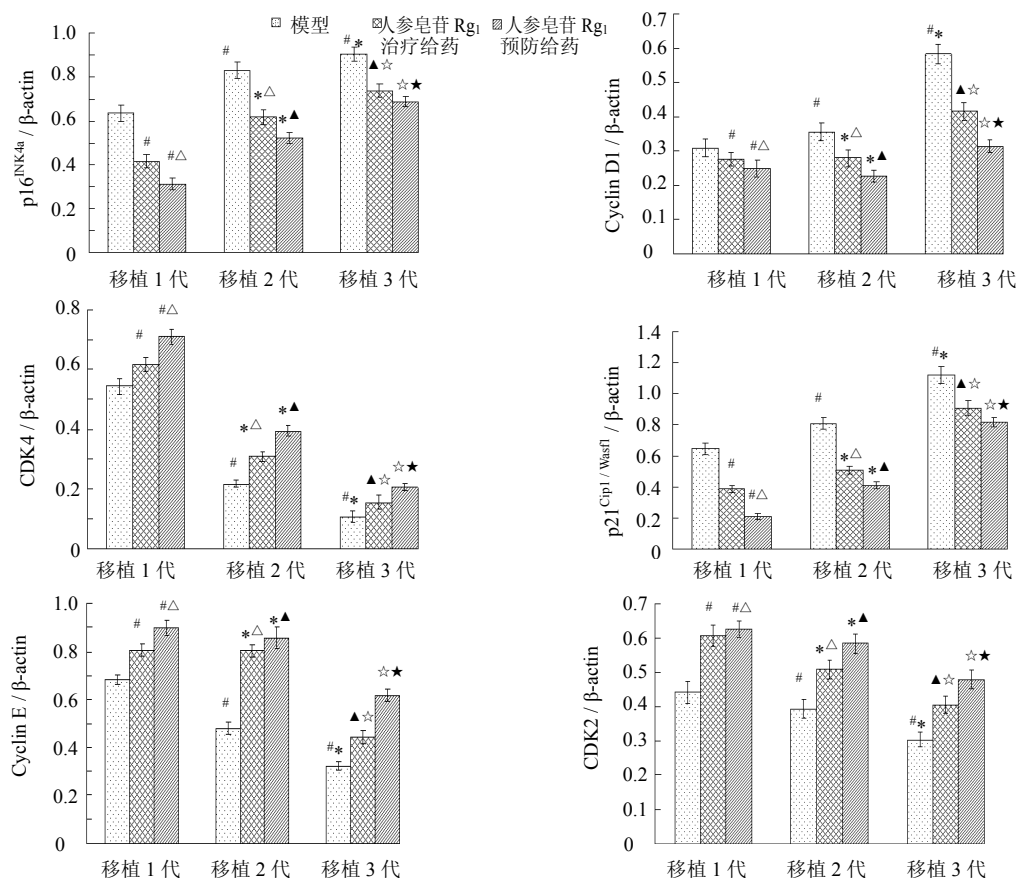


图 5 人参皂苷 Rg₁ 对 Sca-1⁺HSC/HPC 相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 5 Effect of Rg₁ on expression of related proteins to Sca-1⁺HSC/HPC ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

4 讨论

人参具有补气生血、安神益智、延年益寿等功效,其有效成分人参皂苷 Rg_1 具有抗衰老、抗氧化、提高免疫力等多种药理作用,并能正向调节 HSC/HPC,但其生物学调控机制尚不清楚^[1,7]。本实验采用 Sca-1⁺HSC/HPC 连续移植的方法建立 Sca-1⁺HSC/HPC 体内衰老模型^[4],观察人参皂苷 Rg_1 抗细胞衰老的作用机制。结果发现在细胞连续移植过程中,人参皂苷 Rg_1 给药组 Sca-1⁺HSC/HPC 的 SA- β -Gal 染色阳性率、G₀/G₁ 期细胞比例显著低于同代衰老模型组,形成 CFU-Mix 的能力强于同代衰老模型组,表明在连续移植过程中,人参皂苷 Rg_1 能增强 Sca-1⁺HSC/HPC 的自我更新及多向分化的功能,减弱因连续移植导致的 Sca-1⁺HSC/HPC 潜能的降低。

细胞衰老与细胞周期的停滞有关,p16^{INK4a}-Rb 和 p19^{Arf}-Mdm2-p53-p21^{Cip1/Waf1} 任何一条信号通路的激活均可诱导 HSC/HPC 衰老,而这两条通路之间存在广泛的多层次的通讯,常常共同参与细胞衰老的发生^[12-13]。p16^{INK4a} 是细胞寿命的关键调控基因,它通过抑制 CDK4/6 与 Cyclin D1 的结合,引起细胞生长停滞于 G₁ 期^[10-11]。INK4a 位点的一个重叠基因 p19^{Arf} 可直接抑制 MDM 2 的活性,从而增强 p53 的稳定性,促使 p21^{Cip1/Waf1} 的表达在 p53 的诱导下增强,结果一方面抑制 CDK4/6-Cyclin D1 复合物对 Rb 蛋白的磷酸化,另一方面抑制 CDK2-Cyclin E 复合物的活性,使细胞停滞于 G₁ 期,最终诱发细胞衰老的特征性改变^[14]。本实验结果显示,随着细胞移植代数的增加,各代衰老模型组 Sca-1⁺HSC/HPC p16^{INK4a}、p19^{Arf}、p53、p21^{Cip1/Waf1} 基因表达和 p16^{INK4a}、p21^{Cip1/Waf1}、Cyclin D1 蛋白表达均上调,而 CDK4、CDK2、Cyclin E 蛋白表达下调,这与细胞衰老过程中细胞周期调控基因及蛋白的变化一致,提示连续移植过程中 Sca-1⁺HSC/HPC 衰老可能与 p16^{INK4a}-Rb 和 p19^{Arf}-MDM2-p53-p21^{Cip1/Waf1} 信号通路的调控有关。在本实验中与衰老模型组相比,人参皂苷 Rg_1 治疗给药组与预防给药组各代 Sca-1⁺HSC/HPC p16^{INK4a}、p19^{Arf}、p53、p21^{Cip1/Waf1} 基因表达与 p16^{INK4a}、p21^{Cip1/Waf1}、Cyclin D1 蛋白表达水平均低于同代衰老模型组,而 CDK4、CDK2、Cyclin E 蛋白表达高于同代衰老模型组,且预防给药组的作用强于治疗给药组,表明人参皂苷 Rg_1 可减弱 p16^{INK4a} 对 Cyclin D-CDK 复合物酶活性的抑制

以及 Sca-1⁺HSC/HPC 在 G₁ 期的阻滞,使 Cyclin D1 合成受到负反馈调节。人参皂苷 Rg_1 治疗给药与预防给药使 Sca-1⁺HSC/HPC Cyclin D1 表达水平下降,提示调控 p16^{INK4a}-Rb 及 p19^{Arf}-p53-p21^{Cip1/Waf1} 信号转导通路是其延缓和治疗 Sca-1⁺HSC/HPC 衰老的机制之一。

参考文献

- [1] Chu S F, Zhang J T. New achievements in ginseng research and its future prospects [J]. *Chin J Integr Med*, 2009, 15(6): 403-408.
- [2] 黎阳, 张铁军, 刘素香, 等. 人参化学成分和药理研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(1): 164-附2.
- [3] Chen X, Zhang J, Fang Y M, et al. Ginsenoside Rg_1 delays tert-butyl hydroperoxide-induced premature senescence in human WI-38 diploid fibroblast cells [J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2008, 63(3): 253-264.
- [4] 徐静, 贾力, 赵余庆, 等. 人参的化学成分与人参产品的质量评价 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(3): 199-203.
- [5] 周玥, 杨斌, 王亚平, 等. 人参皂苷 Rg_1 延缓造血干细胞衰老及其相关机制 [J]. 中华医学杂志, 2010, 90(48): 3421-3425.
- [6] 周玥, 杨斌, 王亚平, 等. Sca-1⁺造血干/祖细胞重建致死剂量辐射小鼠造血功能的作用 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(32): 605-609.
- [7] Farese A M, Hunt P, Grab L B, et al. Combined administration of recombinant human megakaryocyte growth and development factor and granulocyte colony-stimulating factor enhances multilineage hematopoietic reconstitution in nonhuman primates after radiation-induced malTow aplasia [J]. *J Clin Invest*, 1996, 97(9): 2145-2151.
- [8] Kobari L, Giarratana M C, Poloni A, et al. Flt3 Ligand, MGDF, Epo and G-CSF enhance ex vivo expansion of hematopoietic cell compartments in the presence of SCF, IL-3 and IL-6 [J]. *Bone Marrow Transpl*, 1998, 21(8): 759-767.
- [9] Cheng Y, Shen L H, Zhang J T, et al. 2005. Anti-amnesic and anti-aging effects of ginsenoside Rg_1 and Rb1 and its mechanism of action [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2005, 26(2): 143-149.
- [10] Nijnik A, Woodbine L, Marchetti C, et al. DNA repair is limiting for haematopoietic stem cells during ageing [J]. *Nature*, 2007, 447(7145): 686-690.
- [11] Noda S, Ichikawa H, Miyoshi H. Hematopoietic stem cell aging is associated with functional decline and delayed cell cycle progression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*,