

• 药理与临床 •

当归多糖与阿糖胞苷联合注射对人白血病模型小鼠骨髓单核细胞的影响

徐春燕, 贾道勇, 景鹏伟, 张岩岩, 张梦思, 刘俊, 李静, 朱家红, 姜蓉, 王璐, 王亚平*
重庆医科大学 干细胞与组织工程研究室 组织胚胎学教研室, 重庆 400016

摘要: 目的 探讨当归多糖(ASP)与阿糖胞苷(Ara-C)联合注射对移植性人白血病模型小鼠骨髓单个核细胞(BMMCs)的影响,并探讨其调控白血病细胞衰老的可能机制。方法 每只小鼠尾静脉移植 2×10^7 个K562细胞,建立移植性人白血病NOD/SCID小鼠模型,模型建立后随机分为模型组、ASP组、Ara-C组和ASP+Ara-C组,移植K562细胞第31天开始分别ip ASP(200 mg/kg)、Ara-C(2.5 mg/kg)和ASP(200 mg/kg)+Ara-C(2.5 mg/kg)治疗,共14 d,模型组注射等量生理盐水。药物注射完成第2天眼球取血检测外周血白细胞总数与分类计数,取股骨测定每只股骨BMMCs细胞数;CCK8测定BMMCs增殖能力,流式细胞术分析BMMCs增殖周期,混合集落(CFU-Mix)培养检测BMMCs形成集落能力;衰老 β 半乳糖苷酶(SA- β -Gal)染色观察衰老细胞百分率;Western blotting检测衰老相关蛋白P16、Rb、CDK4及CyclinD1表达。结果 与模型组比较,无论是ASP、Ara-C单独注射或ASP+Ara-C联合用药均能有效降低白血病模型小鼠外周血白细胞总数,降低中性粒细胞百分率,提高淋巴细胞百分率;降低股骨BMMCs细胞数,明显抑制BMMCs增殖,降低CFU-Mix产率,提高G₁期细胞比例,减少S期细胞比例;显著提高SA- β -Gal染色阳性细胞百分率;上调P16、Rb表达,下调CDK4、CyclinD1表达,且联合用药组效果更为明显。结论 ASP与Ara-C可能通过调节衰老相关蛋白P16、Rb、CDK4及CyclinD1表达,进而促进移植小鼠白血病细胞衰老,为临床治疗白血病提供了新思路。

关键词: 当归多糖;阿糖胞苷;人白血病;K562细胞;骨髓单个核细胞;细胞衰老

中图分类号: R286.91 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)23-3418-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.23.012

Effects of combined injection of *Angelica sinensis* polysaccharide and cytarabine on bone marrow mononuclear cells of transplanted human leukemia mice

XU Chun-yan, JIA Dao-yong, JING Peng-wei, ZHANG Yan-yan, ZHANG Meng-si, LIU Jun, LI Jing, ZHU Jia-hong, JIANG Rong, WANG Lu, WANG Ya-ping

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

Abstract: Objective To explore the effects and the possible mechanism of combined injection of *Angelica sinensis* polysaccharide (ASP) and cytarabine (Ara-C) on the bone marrow mononuclear cells (BMMCs) of the transplanted human leukemia mouse model. **Methods** K562 cells (2×10^7) were transplanted into the tail vein of mice to establish the transplanted human leukemia NOD/SCID mouse model. Then the leukemia mice were randomly divided into model, ASP, Ara-C, and ASP + Ara-C groups. After the 30 d transplantation, the mice were ip injected with ASP (200 mg/kg/d), Ara-C (2.5 mg/kg/d), and ASP (200 mg/kg/d) + Ara-C (2.5 mg/kg/d), respectively for 14 d, and the mice in the model group were injected with saline (equal volume and time). The next day after the treatment, the eyeball blood was collected to detect the amount and classification of white blood cells (WBC). The femurs were taken to count BMMCs of each femur. The proliferation of BMMCs was detected by CCK-8; The distribution of cell cycles was analyzed by flow cytometry (FCM); The capability of colony forming was examined by CFU-Mix cultivation; The ratio of the SA- β -Gal staining positive BMMCs was counted; The aging related proteins of P16, Rb, CDK4, and CyclinD1 were detected by Western blotting. **Results** Compared with the model group, ASP or Ara-C injected alone and their combined injection can obviously reduce the amount of the peripheral blood WBC, the percentage of

收稿日期: 2014-01-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81173398)

作者简介: 徐春燕(1987—),女,硕士研究生。Tel: 13983969279 E-mail: 214541274@qq.com

*通信作者 王亚平,教授,博士生导师。Tel: (023)68485968 E-mail: ypwangcq@aliyun.com

neutrophils, and the number of femur BMMCs; effectively inhibit the proliferation of BMMCs, CFU-Mix forming, and the ratio of S stages; markedly raise the percentage of lymphocytes, ratio of G₁ stages, and the percentage of SA-β-Gal positive cells; down-regulate the expression of the aging related proteins of CDK4 and CyclinD1; and up-regulate the expression of P16 and Rb protein. The effects of ASP + Ara-C group were much better than those in the other groups. **Conclusion** The aging mechanism of BMMCs for the transplanted human leukemia mice induced by ASP and Ara-C may be ascribed to the regulation of the expression of the aging related proteins of P16, Rb, CDK4, and CyclinD1. Our research provides a new idea to treat leukemia in clinic.

Key words: *Angelica sinensis* polysaccharides; cytarabine; human leukemia; K562 cells; bone marrow mononuclear cells; cell aging

当归多糖 (*Angelica sinensis* polysaccharides, ASP) 是“补血”要药当归的重要药效成分, ASP 对机体的免疫系统和造血系统有明显的促进作用, 抗肿瘤和抗辐射损伤也显示良好的功效^[1-5]。传统中医理论认为, 某些中药及其有效成分有“双向调控”作用, 即对正常组织细胞和异常组织细胞的作用存在差异。本课题组最近研究发现, ASP 对延缓造血干细胞衰老有明显的调控作用^[6-7]。白血病是造血干细胞水平的恶性血液系统肿瘤, ASP 是否有诱导白血病细胞衰老的作用, 这是值得探讨的科学问题。本实验以移植性人白血病 NOD/SCID 小鼠模型为研究对象, 探讨 ASP 与阿糖胞苷 (cytarabine, Ara-C) 联合体内注射对移植性人白血病细胞衰老的作用及其相关机制, 旨在为探讨天然药物有效成分调控肿瘤细胞衰老提供实验依据, 为白血病等肿瘤的治疗提供新的思路和方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性 NOD/SCID 小鼠, 8~10 周龄, 体质量 18~22 g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司, 合格证号 SCXK (京) 2009-0007。

1.2 人白血病 K562 细胞株

重庆医科大学临床检验医学院惠赠, 在含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养体系、37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱中培养, 每 2~3 天换液传代。

1.3 主要药品、试剂与配制

ASP 购自陕西慈缘生物技术有限公司 (批号为 CY130421, 甘肃岷县当归提取, 质量分数 ≥95%, 生理盐水配制成 20 mg/mL, 滤过除菌); Ara-C 购自国药一心制药有限公司 (批号 110902-1015, 相对分子质量为 279.68, 规格 0.1 g, 生理盐水配制成 2.5 mg/mL, 滤过除菌); 环磷酰胺 (山西普德药业股份有限公司, 批号 04120105)。衰老 β-半乳糖苷酶 (SA-β-Gal) 染色试剂盒购自碧云天生物技术研究所; 甲基纤维素半固体培养基 (MethoCult GF M3434) 购自 Stem Cell Technologies 公司; P16 兔多克隆抗体

购自安博生物技术有限公司, β-actin 鼠多克隆抗体、Rb、CDK4 与 CyclinD1 兔多克隆抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司; 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗小鼠抗体、山羊抗兔抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.4 人白血病小鼠模型的建立与鉴定

按本课题组方法建立移植性人白血病小鼠模型^[8]。即 NOD/SCID 小鼠随机均分为对照组、模型组, 模型组小鼠 ip 环磷酰胺 (2 mg/只, 每天 1 次, 2 d) 后每只小鼠尾静脉移植 2 × 10⁷ 个对数生长期的 K562 细胞, 对照组小鼠注射等量生理盐水, 移植细胞第 7 周取对照组和模型组小鼠眼球血, 全自动血球计数仪检测外周血白细胞总数与白细胞分类计数; PBS 冲出股骨骨髓, 计数每只股骨骨髓单个核细胞 (BMMCs), Wright's 染色骨髓细胞涂片, 光镜观察; 分别收集 2 组小鼠的骨髓, Trizol 法提取 RNA, RT-PCR 检测 NOD/SCID 小鼠骨髓中人特有基因 DQα 基因表达。

1.5 ASP 与 Ara-C 联合注射对人白血病模型小鼠 BMMCs 的影响

1.5.1 分组与药物注射 接种 K562 细胞第 31 天开始, 各组小鼠 ip 给药, 共 14 d, 即 ASP 组 (200 mg/kg, 药效最佳剂量)、Ara-C 组 (2.5 mg/kg, 临床用药剂量)、ASP + Ara-C 联合组 (ASP 200 mg/kg + Ara-C 2.5 mg/kg), 模型组注射等量生理盐水, 注射完成第 2 天取材, 检测外周血和股骨骨髓相关指标。

1.5.2 外周血与骨髓常规检测 药物注射完成第 2 天, 取各组小鼠眼球血, 全自动血球计数仪检测外周血白细胞总数与白细胞分类计数, 取股骨计数每只股骨 BMMCs。

1.5.3 BMMCs 细胞增殖与分化能力检测 CCK8 法测定 BMMCs 细胞增殖能力: 收集各组 BMMCs, 调整细胞密度为 1 × 10⁸ 个/L, 以每孔 200 μL 的培养体系接种于 96 孔板, 每组设 3 个复孔, 同时设立无细胞的空白对照孔调零。分别培养 0、1、2、3、4 d, 加入 20 μL CCK-8 继续培养 4 h, 酶联免疫检

测仪测定各孔于波长 450 nm 处吸光度 (A_{450}) 值。
 流式细胞术分析细胞周期: 收集各组 BMMCs 细胞 1×10^5 个, PBS 洗涤 2 次, 70% 冷乙醇 4 °C 固定过夜, 测定前遗弃固定液, 加入碘化丙啶和 RNA 酶工作液, 4 °C 染色处理 30 min, 300 目滤网滤过后上流式细胞仪, 经计算机数据处理分析得出细胞周期的各时相比例。混合集落 (CFU-Mix) 形成实验检测 BMMCs 形成集落与分化能力: 收集各组 BMMCs 1×10^4 个, PBS 洗涤 2 次, 加入混合集落培养基 0.5 mL 充分混匀, 接种于 24 孔板, 在 5% CO_2 、37 °C 培养箱中孵育 7~10 d, 根据各组 CFU-Mix 的数量评价各组细胞的多向分化能力。

1.5.4 SA- β -Gal 染色检测衰老细胞 收集各组 BMMCs, PBS 洗涤 2 遍, 按试剂盒说明书操作。甘油封片镜检, 每组随机计数 400 个细胞中的阳性细胞数, 计算阳性细胞率。

1.5.5 P16、Rb、CDK4 及 CyclinD1 蛋白表达检测 收集各组 BMMCs, PBS 洗涤, 蛋白裂解液裂解提取蛋白, BCA 法测定细胞总蛋白浓度, 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。一抗 (参照说明书稀释抗体) 4 °C 过夜, 二抗 37 °C 1 h, 增强化学发光。Quantity-One 软件分析, 目的蛋白表达量用目的条带与 β -actin 条带的灰度值比值表示。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计软件进行单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 检验, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 人白血病小鼠模型的鉴定

移植 K562 细胞第 7 周, 模型组与对照组比较, 外周血白细胞数量显著增加, 中性粒细胞百分比升高, 淋巴细胞百分比明显下降 (表 1)。股骨 BMMCs 明显增多 (图 1), 骨髓中大小不等的白血病细胞明显增多 (图 2)。RT-PCR 检测显示, 对照组骨髓中未发现人特有 DQ α 基因, 而模型组为阳性表达 (图 3)。

表 1 模型组与对照组小鼠外周血白细胞计数及分类比较
 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Amount and classification of peripheral blood WBC of mice in control and model groups ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	白细胞 / ($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	中性粒细胞 / %	淋巴细胞 / %
对照	1.34 \pm 0.03	61.35 \pm 1.13	31.33 \pm 2.24
模型	13.60 \pm 2.33*	84.13 \pm 1.90*	7.20 \pm 0.20*

与对照组比较: * $P < 0.05$, 下同

* $P < 0.05$ vs control group, same as below

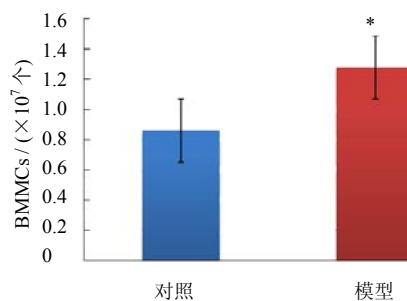


图 1 对照组与模型组小鼠 BMMCs 计数

Fig. 1 Number of BMMCs of mice in control and model groups

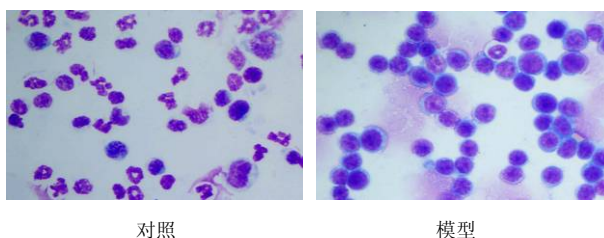


图 2 对照组与模型组小鼠骨髓象 (Wright's 染色)

Fig. 2 Bone marrow of leukemia mice in control and model groups (Wright's staining)

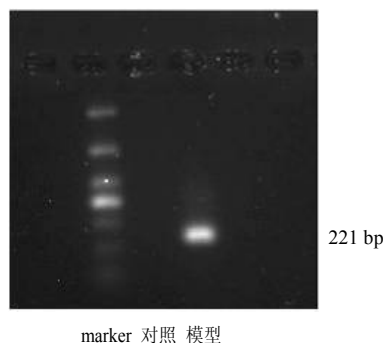


图 3 人白血病模型小鼠骨髓细胞 DQ α 的表达

Fig. 3 Expression of DQ α in bone marrow of leukemia mice

2.2 ASP 与 Ara-C 对人白血病模型小鼠外周血与骨髓常规指标的影响

与模型组比较, ASP、Ara-C 单独注射或 ASP+Ara-C 联合用药均能有效降低人白血病模型小鼠外周血白细胞总数, 降低中性粒细胞百分率, 提高淋巴细胞百分率; 降低股骨 BMMCs 细胞数 ($P < 0.05$); ASP+Ara-C 联合用药组与单独用药组相比, 中性粒细胞百分率、淋巴细胞百分率和股骨 BMMCs 细胞数的改变更加明显 ($P < 0.05$), 见表 2 和图 4。

表 2 ASP 与 Ara-C 对人白血病模型小鼠外周血白细胞计数与分类的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Effect of ASP and Ara-C on amount and classification of peripheral blood WBC of leukemia mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	白细胞 / (×10 ⁹ ·L ⁻¹)	中性粒细胞 / %	淋巴细胞 / %
模型	—	13.60±2.33	84.13±1.90	7.20±0.20
ASP	200	6.39±0.15 ^{#△}	80.73±0.87 ^{#△}	13.64±0.65 ^{#△}
Ara-C	2.5	3.19±0.08 [#]	76.94±1.82 ^{#△}	13.43±1.05 ^{#△}
ASP+Ara-C	200+2.5	1.90±0.30 [#]	69.07±1.47 [#]	19.30±0.70 [#]

与模型组比较: [#]P<0.05; 与 ASP+Ara-C 组比较: [△]P<0.05, 下同
[#]P<0.05 vs model group; [△]P<0.05 vs ASP+Ara-C group, same as below

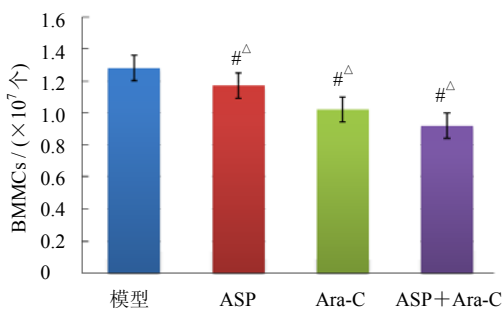


图 4 ASP 与 Ara-C 对人白血病模型小鼠 BMMCs 细胞数量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 4 Effect of ASP and Ara-C on number of BMMCs of leukemia mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

2.3 ASP 与 Ara-C 对人白血病模型小鼠 BMMCs 增殖与分化能力的影响

人白血病模型小鼠注射 ASP、Ara-C 或 ASP+Ara-C 后, BMMCs 增殖能力下降 (图 5); 细胞增殖周期阻滞 (表 3); 1×10⁴ 个 BMMCs 形成 CFU-Mix 的能力下降, 模型组 (30.00±1.73) 个, ASP 组 (23.33±1.53) 个, Ara-C 组 (17.00±1.00) 个, ASP+Ara-C 组 (11.50±2.12) 个 (图 6), ASP+Ara-C 组作用更加明显。

2.4 ASP 与 Ara-C 对人白血病模型小鼠 BMMCs SA-β-Gal 染色阳性率的影响

染色显示阳性细胞胞质呈蓝绿色, 阴性细胞则未着色。人白血病模型小鼠 BMMCs SA-β-Gal 阳性率分别为模型组 (7.33±1.53) %、ASP 组 (20.33±2.52) %、Ara-C 组 (36.33±1.15) %、ASP+Ara-C 组 (51.00±1.00) % (图 7)。

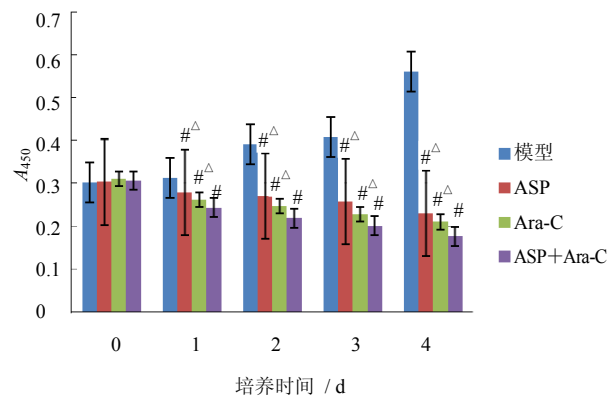


图 5 ASP 与 Ara-C 对人白血病模型小鼠 BMMCs 增殖能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of ASP and Ara-C on proliferation of BMMCs of leukemia mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 3 ASP 与 Ara-C 对人白血病模型小鼠 BMMCs 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of ASP and Ara-C on cell cycle of BMMCs of leukemia mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	G ₀ /G ₁ 期 / %	G ₂ /M 期 / %	S 期 / %
模型	—	66.71±0.79	9.00±7.09	24.29±7.39
ASP	200	74.72±2.68 ^{#△}	2.40±1.80	22.88±2.98 [△]
Ara-C	2.5	79.30±2.31 ^{#△}	3.93±2.38	16.77±0.46
ASP+Ara-C	200+2.5	88.63±1.94 [#]	1.33±0.22 [#]	10.04±2.00 [#]

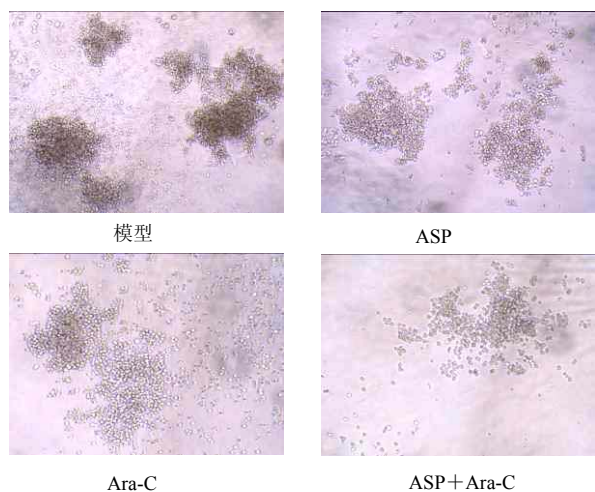


图 6 ASP 与 Ara-C 对人白血病模型小鼠 BMMCs CFU-Mix 形成能力的影响

Fig. 6 Effect of ASP and Ara-C on forming capacities of CFU-Mix in BMMCs of leukemia mice

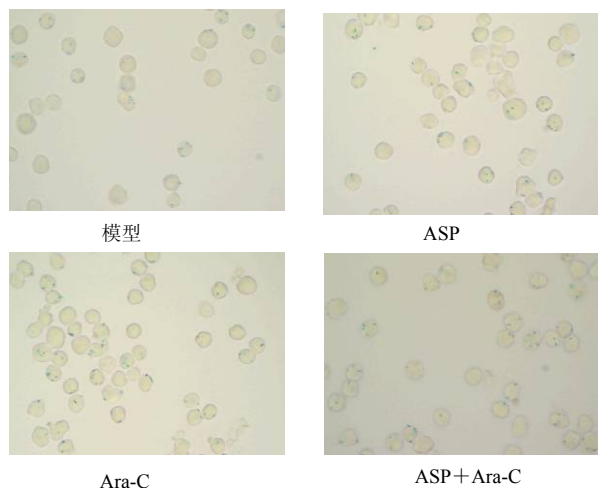


图 7 ASP 与 Ara-C 对人白血病小鼠 BMMCs SA-β-Gal 染色阳性细胞率的影响
Fig. 7 Effect of ASP and Ara-C on ratio of SA-β-Gal staining positive cells in BMMCs of leukemia mice

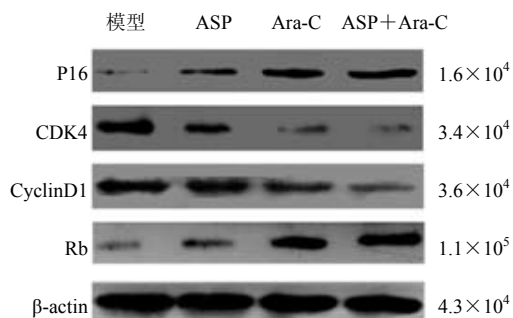


图 8 ASP 与 Ara-C 对人白血病模型小鼠 BMMCs P16、RB、CDK4 及 CyclinD1 蛋白表达的影响
Fig. 8 Effect of ASP and Ara-C on expression of P16, RB, CDK4, and CyclinD1 protein in BMMCs of leukemia mice

白血病在中医属于“虚劳”、“血虚”等范畴，以气血两虚多见，临床以血虚证和血瘀证为主。而当归是中医临床的“补血、活血”要药，有“补血生气”之功效，ASP 是其主要药物活性成分之一。本课题组以移植性人白血病 NOD/SCID 小鼠模型为研究对象，研究 ASP 与 Ara-C 体内联合注射对人白血病细胞衰老的作用及其相关机制，旨在为探讨天然药物有效成分调控肿瘤细胞衰老提供实验依据，为白血病等肿瘤的治疗提供新的思路和方法。

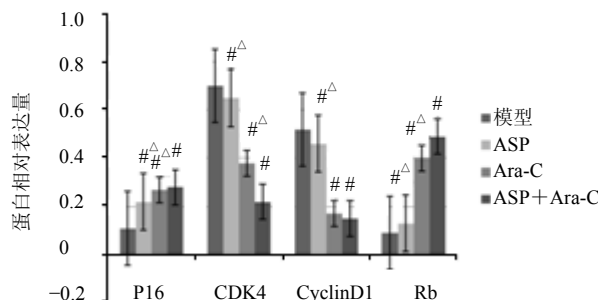
本实验结果证明，无论是 ASP、Ara-C 单独注射或 ASP+Ara-C 联合用药均能有效降低外周血白细胞总数，降低中性粒细胞百分率，提高淋巴细胞百分率；降低股骨骨髓单个核细胞数，明显抑制骨髓细胞增殖；降低 CFU-Mix 产率，ASP 与 Ara-C

2.5 ASP 与 Ara-C 对白血病模型小鼠 BMMCs P16、Rb、CDK4 及 CyclinD1 蛋白表达影响

与模型组比较，用药组能显著上调 P16 蛋白与 Rb 蛋白的表达，下调 CDK4 与 CyclinD1 蛋白的表达，ASP+Ara-C 联合用药组作用更加明显(图 8)。

3 讨论

NOD/SCID 小鼠-白血病模型是研究白血病细胞增殖、分化及其调控机制，探索新的白血病治疗手段的重要方法^[9]。本研究通过植入人白血病细胞 K562 建立白血病小鼠模型。结果显示，模型组小鼠骨髓中 DQα 基因为阳性表达，而对照组为阴性。与对照组相比较，模型组小鼠外周血白细胞数量显著上升，中性粒细胞百分比明显升高，骨髓原粒细胞大量增加，提示 NOD/SCID 小鼠接种 K562 细胞能成功建立人白血病小鼠模型。



联合用药作用更明显。研究证明^[6-7,10]，ASP 对人和小鼠的造血细胞增殖分化有促进作用，并能有效延缓造血干细胞衰老，这一结果说明 ASP 确有双向调控作用。若 ASP 与抗癌药联合应用既能协同抑制肿瘤细胞，又能减轻抗肿瘤药物对骨髓造血细胞损伤，达到理想的治疗效果。

ASP 与抗癌药联合应用既能协同抑制白血病细胞，又能减轻抗肿瘤药物对骨髓造血细胞损伤的可能机制是什么？本实验从细胞衰老角度来进行探讨，细胞衰老是细胞生理功能逐渐衰退的过程，随着细胞衰老进程推移，细胞将不可逆走向死亡。细胞衰老是一种复杂的、多因素参与的调控过程，如果人为诱导肿瘤细胞发生应激性衰老，这是肿瘤治疗的新思路。

迄今 SA-β-Gal 染色是公认经典评价细胞衰老的生物学指标。本实验研究证明,无论是 ASP、Ara-C 单独注射或 ASP+Ara-C 联合用药均能显著提高白血病骨髓细胞 SA-β-Gal 染色阳性百分率,相反 ASP 却能减轻辐射或氧化低密度脂蛋白对造血干细胞损伤,使 SA-β-Gal 染色阳性百分率降低。这是“扶正祛邪”的进一步证明,提示 ASP 与 Ara-C 作用机制与诱导白血病细胞衰老有密切关系。

细胞周期 G₁ 期的关卡是细胞衰老的关键调控点,而 P16 在该调控点发挥重要作用,它能特异地与 CDK4 结合,抑制 CyclinD-CDK4 的活性,使 Rb 蛋白低磷酸化,从而使 Rb 正常地行使 G₁ 期阻滞功能,导致细胞不可逆地停滞于 G₁ 期,以维持细胞衰老的特征性改变^[11-13]。本研究结果表明,注射 ASP、Ara-C、ASP+Ara-C 后,人白血病模型小鼠骨髓单个核细胞均出现 G₁ 期阻滞,G₀/G₁ 期比例显著升高、S 期比例显著降低;P16 与 Rb 蛋白表达水平显著增加,CDK4、CyclinD1 蛋白表达水平显著降低,且 ASP 与 Ara-C 联合用药作用更明显。提示 ASP 与 Ara-C 可能通过上调 P16 与 Rb 蛋白的表达,从而诱导白血病细胞不可逆地停滞于 G₁ 期,最终使细胞进入衰老状态。

综上所述,ASP 与 Ara-C 联合注射可抑制人白血病模型小鼠骨髓单核细胞增殖,促进细胞衰老,其机制可能与调控细胞周期基因的表达有关。结合既往研究工作认为,ASP 与抗癌药物联合应用可以协调提高诱导白血病细胞衰老的作用,并能减轻骨髓正常造血细胞损伤,这是肿瘤治疗的新思路。

参考文献

[1] Cao W, Li X Q, Wang X, *et al.* A novel polysaccharide, isolated from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels induces the apoptosis of cervical cancer HeLa cells through an intrinsic apoptotic pathway [J]. *Phytomedicine*, 2010, 17(8/9): 598-605.

[2] Liu C, Li J, Meng F Y, *et al.* Polysaccharides from the

root of *Angelica sinensis* promotes hematopoieses and thrombopoieses through the PI3K/AKT pathway [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2010, doi: 10.1186/1472-6882-10-79.

[3] 何晓莉, 关雪晶, 吴宏, 等. 当归多糖对电离辐射致小鼠骨髓单个核细胞凋亡及氧化损伤的影响 [J]. 重庆医科大学学报, 2012, 37(4): 315-319.

[4] Zhao L, Wang Y, Shen H L, *et al.* Structural characterization and radioprotection of bone marrow hematopoiesis of two novel polysaccharides from the root of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels [J]. *Fitoterapia*, 2012, 83(8): 1712-1720

[5] 韦玮, 龚苏晓, 张铁军, 等. 当归多糖类成分及其药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2009, 32(2): 130-134.

[6] 李成鹏, 刘俊, 贾道勇, 等. 当归多糖诱导人白血病干细胞衰老与调控端粒系统机制的研究 [J]. 中草药, 2014, 45(16): 2364-2369.

[7] 张先平, 王乾兴, 陈斌, 等. 当归多糖对小鼠衰老造血干细胞细胞周期蛋白的调控 [J]. 基础医学与临床, 2013, 33(3): 320-324.

[8] 陈地龙, 李静, 刘永刚, 等. 移植性人白血病小鼠模型的建立 [J]. 重庆医科大学学报, 2006, 31(2): 204-207.

[9] 聂小蒙, 楼敬伟, 王建民. SCID 小鼠-人白血病模型在白血病研究中的应用 [J]. 中国实验血液学杂志, 2003, 11(1): 99-104.

[10] 宋姝丹, 华自森, 王建伟, 等. 当归多糖诱导 K562 细胞向红系样细胞分化及其信号转导通路研究 [J]. 解剖学报, 2009, 40(6): 897-901.

[11] 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.

[12] Sandhu C, Peehl D M, Slingerland J. p16INK4a mediates cyclin dependent kinase 4 and 6 inhibition in senescent prostatic epithelial cells [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(10): 2616-2622.

[13] Attema J L, Pronk C J, Norddahl G L, *et al.* Hematopoietic stem cell aging is uncoupled from p16INK4a-mediated senescence [J]. *Oncogene*, 2009, 28(22): 2238-2243.