

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

李成鹏^{1,3}, 刘俊^{1,2}, 贾道勇^{1,2}, 张梦思^{1,2}, 徐春燕^{1,2}, 张岩岩^{1,2}, 景鹏伟^{1,2}, 王璐^{1,2}, 王顺和^{1,3}, 王亚平^{1,2*}

1. 重庆医科大学 干细胞与组织工程研究室, 重庆 400016

2. 重庆医科大学 组织学与胚胎学教研室, 重庆 400016

3. 重庆医科大学 病理学教研室, 重庆 400016

摘要: 目的 探讨当归多糖(ASP)调控人 CD34⁺CD38⁻骨髓白血病干细胞(LSC)衰老的端粒与端粒酶机制。方法 免疫磁性分选人骨髓 CD34⁺CD38⁻ LSC; CCK-8 检测 ASP 对 CD34⁺CD38⁻ LSC 增殖抑制能力; 衰老相关 β 半乳糖苷酶(SA- β -Gal)染色检测细胞衰老情况; 混合集落培养(CFU-Mix)检测细胞增殖能力; 荧光定量 RT-PCR 检测端粒酶基因 TERT 变化; TRAP-PCR 检测细胞端粒酶活性; Southern blotting 检测细胞端粒长度变化。结果 免疫磁性分选后人骨髓 CD34⁺CD38⁻ LSC 纯度达(91.15 $\pm$ 2.41)%, 相差显微镜观察显示细胞形态饱满, 透明度高, 折光性强。ASP 体外诱导 CD34⁺CD38⁻ LSC 48 h, 能有效抑制其增殖且呈浓度依赖性($P<0.05$), 集落形成能力下降($P<0.01$)。40 μ g/mL ASP 作用 CD34⁺CD38⁻ LSC 48 h, SA- β -Gal 染色阳性细胞率明显升高($P<0.01$); CD34⁺CD38⁻ LSC 端粒酶基因 TERT 表达水平下降($P<0.05$); 端粒酶活性下降($P<0.05$); 端粒长度缩短($P<0.05$)。结论 ASP 在体外可能通过调控细胞端粒系统诱导人骨髓 CD34⁺CD38⁻ LSC 衰老。

关键词: 当归多糖; 白血病干细胞; CD34⁺CD38⁻细胞; 端粒; 端粒酶; 衰老

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)16-2364-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.16.016

Study on mechanism of telomere system regulation and senescence induction of leukemia stem cells by *Angelica sinensis* polysaccharide

LI Cheng-peng^{1,3}, LIU Jun^{1,2}, JIA Dao-yong^{1,2}, ZHANG Meng-si^{1,2}, XU Chun-yan^{1,2}, ZHANG Yan-yan^{1,2}, JING Peng-wei^{1,2}, WANG Lu^{1,2}, WANG Shun-he^{1,3}, WANG Ya-ping^{1,2}

1. Laboratory of Stem Cell and Tissue Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

2. Department of Histology and Embryology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

3. Department of Pathology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: Objective To investigate the mechanisms on the regulation of telomere and telomerase in the process of senescence induction of human-derived CD34⁺CD38⁻ leukemia stem cells (LSC) subpopulation by *Angelica sinensis* polysaccharide (ASP). **Methods** The human-derived CD34⁺CD38⁻ LSC subpopulation was isolated from acute myelogenous leukemia bone marrow mononuclear cells by magnetic activated cell sorting. The inhibition of ASP on CD34⁺CD38⁻ LSC subpopulation proliferation was detected by CCK-8 assay. The percentage of senescent cells was detected by SA- β -Gal staining. The colony-formed ability was detected by Colony-forming Assay. The levels of telomerase activities and telomerase reverse transcriptase (TERT) gene expression were performed by TRAP-PCR and quantitative RT-PCR, respectively. The changes of telomere length were tested by Southern blotting assay. **Results** The CD34⁺CD38⁻ LSC subpopulation could be effectively isolated by MACS. The purity of CD34⁺CD38⁻ LSC population is up to (91.15 $\pm$ 2.41)%; The cells showed the features of well-stacked morphology, high transparency, well refraction under inverted phase contrast microscope. ASP had a remarkable dose-dependent inhibition on CD34⁺CD38⁻ LSC proliferation *in vitro* culture ($P<0.05$). The number of SA- β -Gal staining positive cells had been increased compared to the cells in control group ($P<0.01$), a decrease in colony-forming abilities ($P<0.01$), a decrease level on TERT gene and telomerase activities ($P<0.05$), and a shorter length on telomere of CD34⁺CD38⁻ LSC after 40 μ g/mL ASP co-culture for 48 h ($P<0.05$). **Conclusion** ASP could induce the senescence of human derived leukemia bone marrow CD34⁺CD38⁻ LSC via regulating the cell telomere system *in vitro* co-culture.

Key words: *Angelica sinensis* polysaccharide; leukemia stem cells; CD34⁺CD38⁻ cells; telomere; telomerase; senescence

收稿日期: 2013-12-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81173398)

作者简介: 李成鹏(1985—), 男, 硕士在读, 研究方向为干细胞生物学。E-mail: sxdxlp@126.com

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

急性髓系白血病是最常见的血液系统恶性肿瘤。研究证实,白血病细胞群中存在有 $CD34^+CD38^-CD71^-CD123^+$ 的白血病干细胞(leukemia stem cells, LSC), LSC是白血病发生与发展、耐药与复发的根源^[1-3]。细胞衰老(senescence)指在自然或应激情况下,细胞的生命活动逐渐衰退,并伴细胞衰老形态学改变过程,随着衰老发展,细胞将不可逆的进入死亡程序^[4]。当归是祖国医学的补血活血要药,当归多糖(*Angelica sinensis* polysaccharide, ASP)是其主要有效成分,研究证明ASP有抗肿瘤、抗辐射、促进造血和提高免疫功能等功效^[5-8],且ASP能有效延缓造血干细胞衰老,关于ASP能否诱导LSC衰老的研究尚未见报道,如果这一问题能得以阐释将进一步证明中药的“双向调控”机制或“扶正祛邪”理论,并为通过诱导LSC衰老治疗白血病提供的新策略。本研究采用干细胞研究技术探讨了ASP诱导人 $CD34^+CD38^-$ 白血病干细胞衰老作用,并探讨了其与调控细胞端粒系统的机制,旨在为ASP治疗白血病提供新思路。

1 材料与方法

1.1 主要药品、试剂与仪器

ASP(甘肃岷县当归中提取得到)购自陕西慈缘生物技术有限公司(批号为CY130421,质量分数 $\geq 95\%$,注射用生理盐水配制为1 mg/mL,滤过除菌);RPMI 1640培养基(Gibco公司);胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司);CCK-8试剂盒(碧云天生物技术研究);衰老相关 β 半乳糖苷酶(SA- β -Gal)染色试剂盒(Cell Signaling公司);甲基纤维素(Sigma公司);端粒探针(Intivrogen公司合成);定量RT-PCR试剂盒(Sangon公司);人抗CD34和人抗CD38(Miltenyi Biotec,德国)。

流式细胞仪, Becton Dickinson, 美国;倒置显微镜, 日本Olympas公司;酶联免疫检测仪, Biorad, 日本。

1.2 人骨髓 $CD34^+CD38^-$ LSC免疫磁珠分选

无菌收集重庆医科大学附属第一医院血液内科确诊的、未经治疗的急性髓系白血病患者骨髓(基于FAB分型,其中2例M0、3例M1、3例M3、2例M4、2例M5、3例M6),抗凝处理后加入等体积Ficoll-Paque淋巴细胞分离液, $400\times g$, 离心20 min;吸取离心管中间灰白色层骨髓单个核细胞,加入PBS洗涤并计数。应用MiniMACS免疫磁珠系统

分选,按操作说明利用人抗CD34抗体分选 $CD34^+$ 细胞群;然后再以人抗CD38抗体分选 $CD38^-$ 细胞群。流式细胞术检测分选 $CD34^+CD38^-$ LSC细胞纯度,倒置显微镜下观察细胞形态。

1.3 $CD34^+CD38^-$ LSC增殖能力测定

所获得的 $CD34^+CD38^-$ LSC细胞经扩增后制成单细胞悬液,调整细胞密度为 $5\times 10^3/\text{mL}$,接种于96孔板中,用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液培养,培养体积为200 μL /孔,设立不加细胞的空白组及只加细胞和培养液的对照组,给药组以终质量浓度20、40、80 $\mu\text{g/mL}$ ASP诱导 $CD34^+CD38^-$ LSC细胞,每个浓度设5个复孔,置37 $^{\circ}\text{C}$ 、含5% CO_2 的培养箱中培养48 h,每孔加入20 μL 的CCK-8继续培养4 h,酶联免疫检测仪于450 nm波长处测定各孔吸光度(A)值,计算细胞增殖率。

$$\text{增殖率} = (A_{\text{给药组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}})$$

1.4 $CD34^+CD38^-$ LSC SA- β -Gal染色的检测

收集对照组(常规培养)和ASP(40 $\mu\text{g/mL}$)作用48 h的 $CD34^+CD38^-$ LSC细胞 1×10^6 个, PBS洗涤3次,固定15 min; PBS洗涤后加SA- β -Gal染色液1 mL, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、隔绝 CO_2 孵育15 h。洗涤后离心涂片,中性树胶封片,暗视野镜检,每片随机计数200个细胞,阳性细胞标记为蓝色,计算阳性细胞百分率。

1.5 $CD34^+CD38^-$ LSC集落形成能力检测

收集对照组(常规培养)和ASP(40 $\mu\text{g/mL}$)作用48 h的 $CD34^+CD38^-$ LSC细胞备用,培养板中每孔加入 5×10^3 个细胞和1.1 mL的造血干/祖细胞混合集落培养液,充分混匀后置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度的细胞培养箱培养10~14 d,倒置显微镜下观察并计数每 5×10^3 个 $CD34^+CD38^-$ LSC细胞形成的混合集落数目。

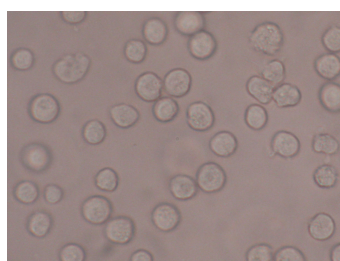
1.6 $CD34^+CD38^-$ LSC端粒酶基因TERT的实时荧光定量RT-PCR检测

收集对照组(常规培养)和ASP(40 $\mu\text{g/mL}$)作用48 h的 $CD34^+CD38^-$ LSC细胞 1×10^6 个, RNA抽提试剂盒提取总RNA。取1 μg RNA样本在20 μL 反应体系中进行逆转录反应。取2 L cDNA、上下游引物(10 nmol/L) 2 L、Taq酶0.25 μL 于50 μL 体系中进行PCR反应,反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性20 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸15 s,共30个循环。定量PCR以SYBR green Supermix法进行扩增,基因表达水平以人GAPDH

水平进行标准化处理。具体引物设计如下: GAPDH 正向引物 5'-ATGTTTCGTCATGGGTGTGAA-3', 反向引物 5'-TGAGTCCTTCCACGATACCA-3'; TERT 正向引物 5'-CGGAAGAGTGTCTGGAGCAA-3', 反向引物 5'-GGATGAAGCGGAGTCTGGA-3'。

1.7 CD34⁺CD38⁻ LSC 端粒酶活性与端粒长度检测

收集对照组(常规培养)和 ASP (40 μg/mL) 作用 48 h 的 CD34⁺CD38⁻ LSC 细胞 1×10⁶ 个, 洗脱缓冲液洗涤 1 次, 加入 40 μL 预冷 Lysis 缓冲液(使用前每毫升 Lysis 缓冲液加入 0.5 μL PMSF 和 0.5 μL β-巯基乙醇), 悬浮沉淀, 涡旋振荡 10 s, 置冰上 30 min, 隔数分钟涡旋振荡 1 次, 共 3~5 次; 收集离心上清液测定其蛋白浓度, 用 Lysis 缓冲液调浓度至 1 μg/μL; 以 5 μL 10×TRAP 缓冲液、1 μL dNTPs、1 μL Taq-DNA 多聚合酶、1 μL TS 引物、2 μL 端粒酶提取物、39 μL DEPC 水为反应体系, 混匀, 加入 1 μL CX 引物, PCR 扩增仪上进行扩增; 扩增条件为: 94 ℃、5 min; 94 ℃、30 s, 50 ℃、30 s, 72 ℃、90 s, 35 个循环; 72 ℃延伸 10 min。在各 PCR 反应管中加入 1 μL SYBR Green I 染料, 混匀后室温放置 10 min 上荧光分光光度计检测荧光。端粒酶活力=荧光强度/蛋白浓度。



CD34⁺CD38⁻ LSC

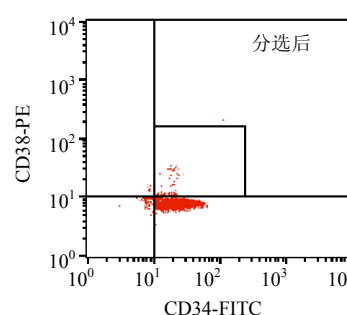
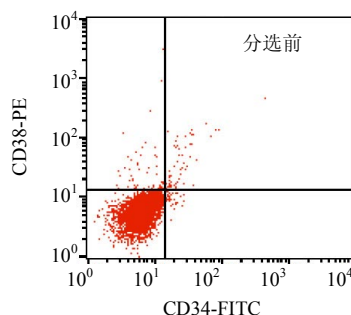


图1 CD34⁺CD38⁻ LSC 细胞群形态及纯度

Fig. 1 Morphology and purify of CD34⁺CD38⁻ LSC

2.2 ASP 对 CD34⁺CD38⁻ LSC 增殖能力的影响

不同质量浓度 ASP (20~80 μg/mL) 作用细胞 48 h, CD34⁺CD38⁻ LSC 增殖呈现明显的抑制状态。细胞增殖率随着 ASP 质量浓度的增加逐渐降低, 见表 1。40 μg/mL ASP 作用 48 h, 细胞呈现半数增殖抑制状态, 后续实验以此为实验组标准剂量与诱导时间。

2.3 ASP 对 CD34⁺CD38⁻ LSC SA-β-Gal 染色阳性百分率的影响

经 40 μg/mL 的 ASP 作用 48 h, CD34⁺CD38⁻ LSC SA-β-Gal 染色阳性率为 (90.4±3.0) %, 对照

同上收集对照组和 ASP 组细胞, 分别提取细胞 DNA, 37 ℃、Hinf/RsaI 酶消化 2 h。在 1 V/cm 电压下, 用 0.7% 琼脂糖凝胶电泳分离 DNA。凝胶经变性、中和后, 用 20×SSC 作转移液, 虹吸法转移 DNA 至尼龙膜。用 10 mL 预杂交液, 42 ℃预杂交 1 h, 加入端粒探针 (100 ng/mL), 42 ℃杂交过夜。取膜, 用 2×SSC 的 0.1% SDS 液洗膜 30 min, 共 2 次, 封闭液封闭 15 min。Strptavidin-HRP (1:400) 缓冲液, 37 ℃振荡 40 min, PBS 洗 3 次, DAB 显色液显色 10 min, X-光片夹中显影。端粒长度计算用 Alpha Innotech Corporation 的图像分析仪扫描, 按文献方法^[9]计算端粒长度。

1.8 统计学分析

用 SPSS 16.0 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。

2 结果

2.1 免疫磁珠分选后 CD34⁺CD38⁻ LSC 纯度

急性髓系白血病患者骨髓单个核细胞经免疫磁珠分选后所获 CD34⁺CD38⁻ LSC 细胞群, 倒置显微镜下 (图 1), 细胞形态饱满, 透明度高, 折光性强。分选前后 CD34⁺CD38⁻ LSC 细胞群所占比例分别为 (1.02±0.08) % 和 (91.15±2.41) %。

表 1 ASP 对 CD34⁺CD38⁻ LSC 增殖率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Effects of ASP on proliferation rates of CD34⁺CD38⁻ LSC ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	$\rho / (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	增殖率 / %
对照	—	91.20±1.35
ASP	20	64.40±4.96*
	40	49.10±7.18*
	80	26.10±6.14*

与对照组比较: * $P < 0.05$, 下同

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

组为 $(2.6 \pm 0.9)\%$, 两者相比差异非常显著($P < 0.01$), 见图2, 提示ASP可诱导 $CD34^+CD38^-$ LSC衰老。

2.4 ASP对 $CD34^+CD38^-$ LSC形成集落能力的影响

40 $\mu\text{g/mL}$ ASP作用48 h, $CD34^+CD38^-$ LSC形成集落数目明显下降, 与对照组相比差异显著($P < 0.05$), 见图3, 提示ASP可诱导 $CD34^+CD38^-$

细胞衰老, 致使集落形成能力下降。

2.5 ASP对 $CD34^+CD38^-$ LSC TERT mRNA表达的影响

40 $\mu\text{g/mL}$ ASP作用48 h, $CD34^+CD38^-$ LSC端粒酶基因TERT表达水平较对照组明显降低, 两者差异显著($P < 0.05$), 见图4。

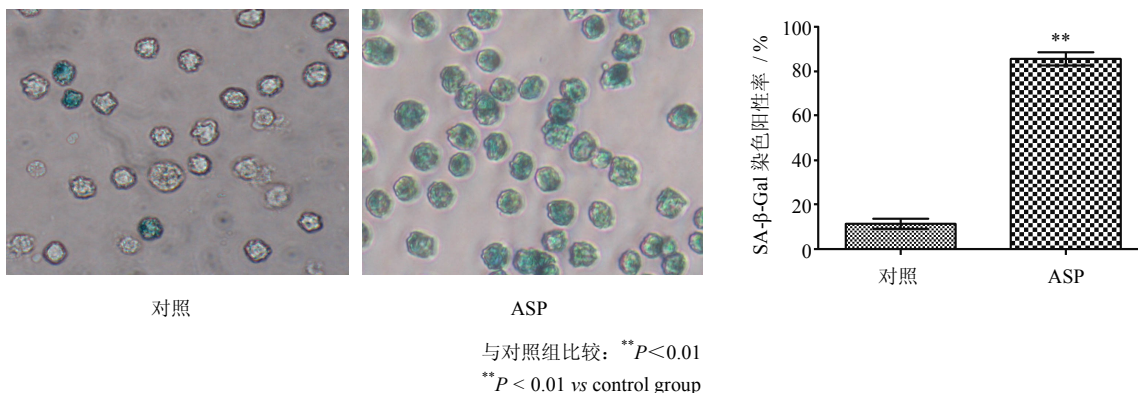


图2 ASP对 $CD34^+CD38^-$ LSC SA-β-Gal染色阳性率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 2 Effects of ASP on positive rate of SA-β-Gal staining of $CD34^+CD38^-$ LSC ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

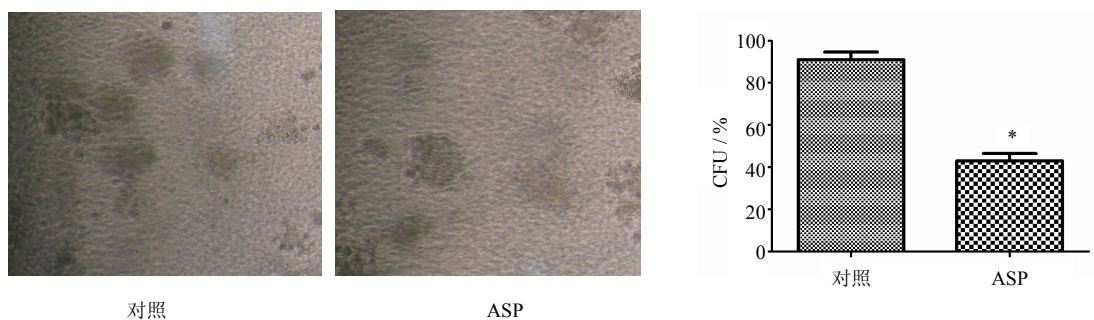


图3 ASP对 $CD34^+CD38^-$ LSC形成集落能力的影响

Fig. 3 Effect of ASP on colony formation ability of $CD34^+CD38^-$ LSC

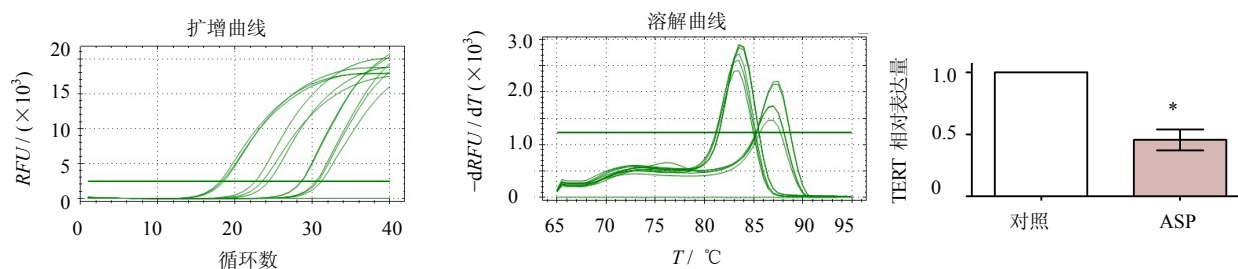


图4 ASP对 $CD34^+CD38^-$ LSC TERT mRNA表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 4 Effects of ASP on expression of telomere gene TERT of $CD34^+CD38^-$ LSC ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

2.6 ASP对 $CD34^+CD38^-$ LSC端粒长度与端粒酶活性的影响

40 $\mu\text{g/mL}$ ASP作用48 h, $CD34^+CD38^-$ LSC端粒长度为 (9.33 ± 1.26) kb, 对照组端粒长度为

(14.5 ± 0.52) kb, 端粒酶活性下降不明显($P < 0.05$), 见图5。

3 讨论

白血病是一类造血干细胞的恶性克隆性疾病。

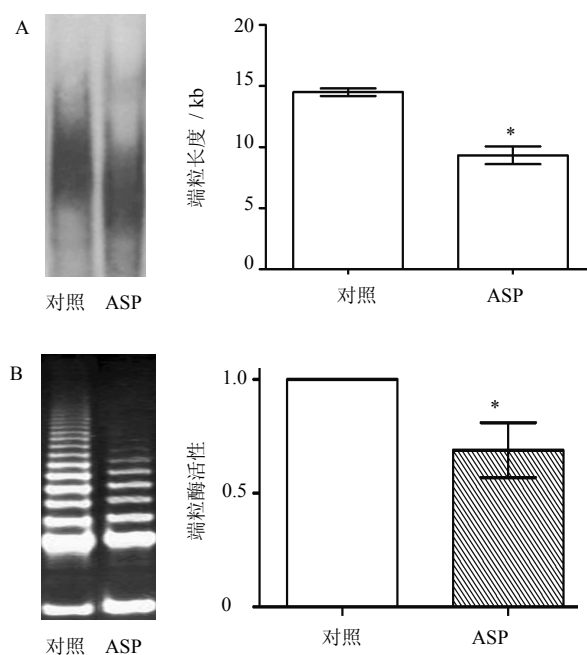


图5 ASP对CD34⁺CD38⁻LSC端粒长度(A)和端粒酶活性(B)的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

Fig. 5 Effects of ASP on telomere length (A) and telomerase activities (B) of CD34⁺CD38⁻LSC ($\bar{x} \pm s, n=4$)

白血病起始、进展、转移和复发的根本原因在于白血病细胞中存在一群具有自我更新和多向分化能力的LSC^[10]。传统化学疗法和放射疗法能在一定程度上明显缓解白血病症状,但长期复发及对正常组织细胞的损伤等问题同样明显。因此寻找能够特异性作用于LSC,有效抑制LSC增殖同时不损伤正常组织细胞的药物成为治疗白血病的新突破口。

衰老是机体在退化时期生理功能下降和紊乱的综合表现,是不可逆的生命过程。衰老是生物界的普遍规律,细胞作为生物有机体的基本单位,也在不断地进行着新生和衰老死亡。细胞衰老是正常环境条件下发生的功能减退,并伴细胞衰老形态学改变,逐渐趋向死亡的现象^[11]。抛开传统诱导细胞凋亡治疗肿瘤的理念,通过诱导肿瘤细胞衰老途径治疗肿瘤已成为肿瘤研究者的新思路^[8,12-13]。当归是祖国医学的补血活血要药,ASP是其主要药效成分,具有多种药理作用^[14],本课题组既往研究表明,ASP能够延缓小鼠正常造血干细胞的衰老。基于“扶正驱邪”中医药理论,其是否能够抑制白血病干细胞的功能至今尚未见报道。

本研究采用ASP体外作用于成人急性髓系白血病LSC。结果显示ASP体外作用于CD34⁺CD38⁻LSC,具有明显的增殖抑制作用。SA-β-Gal染色实

验是评价细胞衰老经典和公认的生物学标记,当pH值为6时SA-β-Gal活性仍然增强,则提示细胞已经不可逆地进入衰老状态^[15]。40 μg/mL ASP能有效提高CD34⁺CD38⁻LSC SA-β-Gal染色阳性细胞的比例。集落形成能力实验显示,经40 μg/mL ASP体外作用后,CD34⁺CD38⁻LSC细胞群的集落数较对照组明显降低,提示其自我更新能力明显下降。值得提出的是ASP对氧化低密度脂蛋白诱导的正常造血干细胞的衰老有很好的延缓衰老作用,提示ASP可能有“扶正驱邪”和双向调控作用。

衰老的细胞不仅出现特征性形态学改变,生理功能的降低,同时细胞内部结构也相继发生变化包括端粒长度缩短,端粒酶活性下降等生物学特点^[4]。端粒为真核细胞染色体末端碱基重复片段,对染色体的完整起到保护作用。细胞每次分裂,端粒末端丢失若干碱基。随着分裂次数的不断增加,端粒长度不断缩短。端粒酶负责维持端粒长度和染色体结构的稳定性,在真核细胞有丝分裂过程中起到重要的作用^[16-18]。端粒系统在细胞衰老过程中起到重要的调控作用。本实验结果显示,40 μg/mL ASP体外作用CD34⁺CD38⁻LSC 48 h后,细胞端粒长度明显缩短,端粒酶活性下降,且端粒酶调控基因表达水平明显降低。说明ASP在体外调控LSC衰老过程中端粒系统可能起到重要作用。而ASP的“扶正驱邪”也与减轻致衰剂对正常造血干细胞的端粒系统损伤密切相关。

综上所述,ASP体外能有效抑制LSC自我更新能力,诱导其衰老,其中端粒系统在衰老过程中可能起到重要调控作用。本研究为临床治疗急性白血病提供了新思路与策略。

参考文献

- [1] Bonnet D, Dick J E. 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] Jordan C T, Upchurch D, Szilvassy S J, et al. The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells [J]. *Leukemia*, 2000, 14(10):1777-1784.
- [3] Lane S W, Gilliland D G. *Leukemia Stem Cells* [M]. New York: Academic Press, 2010.
- [4] Young A R J, Narita M, Narita M. *Cell Senescence* [M]. New York: Humana Press, 2013.
- [5] 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): 598-605.
- [6] Cao W, Li X Q, Wang X, *et al.* Characterizations and anti-tumor activities of three acidic polysaccharides from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels [J]. *Int J Biol Macromol*, 2010, 46(1): 115-122.
- [7] Tsai N M, Lin S Z, Lee C C, *et al.* The antitumor effects of *Angelica sinensis* on malignant brain tumors in vitro and *in vivo* [J]. *Clin Canr Res*, 2005, 11(9): 3475-3484.
- [8] Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer [J]. *Ann Rev Physiol*, 2013, 75: 685-705.
- [9] 赵朝晖, 陈晓春, 朱元贵, 等. 人参皂苷 Rg₁ 延缓细胞衰老过程中端粒长度和端粒酶活性的变化 [J]. 中国药理学通报, 2005, 21(1): 61-66.
- [10] Buss E C, Ho A D. Leukemia stem cells [J]. *Int J Cancer*, 2011, 129(10): 2328-2336.
- [11] Coates P J. In Brief: cell senescence [J]. *J Pathol*, 2013, 230(3): 239-240.
- [12] Günes C, Rudolph K L. The role of telomeres in stem cells and cancer [J]. *Cell*, 2013, 152(3): 390-393.
- [13] Jackson T R, Salmina K, Huna A, *et al.* DNA damage causes TP53-dependent coupling of self-renewal and senescence pathways in embryonal carcinoma cells [J]. *Cell Cycle*, 2013, 12(3): 430.
- [14] 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.
- [15] Itahana K, Campisi J, Dimri G P. *Biological Aging* [M]. New York: Humana Press, 2007.
- [16] Martínez P, Blasco M A. Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins [J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(3): 161-176.
- [17] d'Adda di Fagagna F. Molecular mechanisms of cellular senescence [J]. *Eur J Cancer Suppl*, 2008, 6(9): 35.
- [18] Tomás-Loba A, Flores I, Fernández-Marcos P J, *et al.* Telomerase reverse transcriptase delays aging in cancer-resistant mice [J]. *Cell*, 2008, 135(4): 609-622.