

补肾化瘀生新方对不同代次骨髓间充质干细胞增殖、凋亡影响的研究

张金生¹, 张宝霞², 惠小珊², 张丽娜²

1. 河南中医药大学第三附属医院, 河南 郑州 450000; 2. 河南中医药大学第一附属医院, 河南 郑州 450008

[摘要] 目的: 探讨补肾化瘀生新方对不同代次骨髓间充质干细胞 (Bone mesenchymal stem cells, BMSCs) 增殖、凋亡的影响。方法: 对 BMSCs 进行提取纯化、分选及培养, 第 3 代细胞随机分为正常组, 加入杜氏培养液 (Dulbecco's modified eagle medium, DMEM); 补肾化瘀生新组, 加入补肾化瘀生新含药血清; 生理盐水组, 加入生理盐水含药血清。MTT 法检测各组不同时间点和不同代次 BMSCs 细胞活性、生长曲线和群体倍增时间; 比色法检测 β -半乳糖苷酶活性变化。流式细胞术检测不同时间点和不同代次羧基荧光素乙酰乙酸 (Carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester, CFDA-SE) 标记、BMSCs 增殖率和细胞周期变化; 实时荧光 PCR 技术检测不同代次 BMSCs 端粒酶活性表达情况。结果: 与正常组比较, 生理盐水组 β -半乳糖苷酶活性、24 h、48 h、72 h 时间点不同代次 BMSCs 增殖率和群体倍增时间、端粒酶活性、不同代次 G0/G1 期差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与生理盐水组比较, 补肾化瘀生新组不同代 β -半乳糖苷酶活性、端粒酶活性降低, 24 h、48 h、72 h 时间点不同代次 BMSCs 增殖率、群体倍增时间、不同代次 G0/G1 期升高 ($P < 0.05$)。结论: 补肾化瘀生新方延缓细胞衰老作用可能与降低 β -半乳糖苷酶活性、激活端粒酶活性、提高 BMSCs 增殖分化能力有关。

[关键词] 骨髓间充质干细胞 (BMSCs); 补肾化瘀生新方; 细胞衰老; 端粒酶; 细胞实验

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2019) 05-0004-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2019.05.002

A Study on the Effect of Bushen Huayu Shengxin Prescription on Proliferation and Apoptosis of Bone Mesenchymal Stem Cells of Different Passages

ZHANG Jinsheng, ZHANG Baoxia, HUI Xiaoshan, ZHANG Li'na

Abstract: Objective: To discuss the effect of Bushen Huayu Shengxin prescription on the proliferation and the apoptosis of Bone mesenchymal stem cells (BMSCs) of different passages. Methods: The BMSCs were extracted, purified, sorted and cultured. The third generation cells were randomly divided into the normal group, which was given Dulbecco's modified eagle medium (DMEM). The group of Bushen Huayu Shengxin prescription was given the medicated serum with Bushen Huayu Shengxin prescription. The saline group was given medicated serum with saline. The cell activity, the growth curve and the population doubling time of BMSCs of different passages and time points were detected by MTT method. The changes of β -galactosidase activity were detected by colorimetry. The markers of Carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester (CFDA-SE), proliferation rates of BMSCs and changes of cell cycles of different passages and time points were detected by flow cytometry. The expressions of telomerase activity of BMSCs of different passages were detected by the real-time PCR technology with fluorescence. Results: There was no significant difference being found in the comparisons of the β -galactosidase activity, the proliferation rates and the population doubling time of BMSCs of different passages at the 24 h, 48 h and 72 h, the telomerase activity and G0/G1 stage of different passages between the normal group and the saline group ($P > 0.05$). When compared with those in the saline group, the β -galactosidase activity and the telomerase activity of different passages were decreased in the group of Bushen Huayu Shengxin prescription; the proliferation rates and the population doubling time and G0/G1 stage of different passages of BMSCs of different passages at the 24 h, 48 h and 72 h were increased in the group of Bushen Huayu Shengxin prescription ($P < 0.05$). Conclusion: The mechanism of Bushen Huayu Shengxin prescription to delay cell aging is probably associated with the decrease of the β -galactosidase activity, the activation of the telomerase activity and improvement of the ability of BMSCs to proliferate and differentiate.

Keywords: Bone mesenchymal stem cells (BMSCs); Bushen Huayu Shengxin prescription; Cell aging; Telomerase; Cell experiment

[收稿日期] 2018-09-02

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目 (81373611); 河南科技创新人才-杰出青年基金 (10A08176); 河南科技创新人才-杰出人才项目 (154200510021)

[作者简介] 张金生 (1972-), 男, 主任医师, 研究方向: 中医药防治心脑血管疾病基础与临床研究。

[通信作者] 张宝霞, E-mail: zhangbaoxiay@126.com。

衰老是不可抗拒的生命规律,但干预衰老演变过程,延缓衰老发展速度是可能的。衰老过程中机体的骨髓间充质干细胞(Bone mesenchymal stem cells, BMSCs)的功能逐渐下降,干细胞的扩增能力、组织损伤后的修复能力以及对外界刺激的应答能力均出现下降。近年来研究显示通过提高细胞功能活性,干预细胞衰老演变进程已成为中西医界抗衰防衰的共识。中医药可以通过体内用药改善损伤脏腑组织的内环境,减缓干细胞衰老速度、恢复衰老干细胞的活性。本研究将利用BMSCs探讨补肾化痰生新方延缓细胞衰老的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF级SD雄性成年大鼠40只,体质量(200±10)g,由山东省鲁抗动物实验室提供,动物合格证号:SCXK(鲁)2015-0002;新生2周内乳鼠10只,由郑州大学医学院实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK(豫)2015-0005。所有实验动物均在河南中医药大学实验动物中心饲养,饲养室内氨浓度小于20ppm,室内温度为18~22℃,通风,清洁,相对湿度40%~70%。明暗周期各12h,自由摄食和饮水,定期更换垫料,喂养1周后分组饲养。

1.2 实验药品 补肾化痰生新方由熟地黄、当归各12g,巴戟天、石斛各10g,川芎15g,肉桂、甘草各3g组成。以上诸药均由深圳市三九中医药健康产品有限公司提供中药配方颗粒,用时制成水剂,分装灭菌后备用。

1.3 主要试剂与仪器 细胞周期检测试剂盒、DAPI溶液购于索莱宝生物有限公司;MiLipore IPVH00010 PVDF膜、 β -半乳糖苷酶染色试剂盒、细胞增殖与示踪检测试剂盒购于翊圣生物有限公司;D-半乳糖、BCA蛋白定量试剂盒购于碧云天生物技术研究所;ECL PIUS超敏发光液、倒置显微镜购自奥林巴斯公司;流式细胞分选仪购自美国BD公司;二氧化碳培养箱、细胞培养箱购自安徽中科中佳科学仪器有限公司。

1.4 含药血清的制备 将SPF级SD雄性大鼠40只,随机分为对照组、治疗组,每组20只。药物剂量按照成人每天给药量的18倍计算,治疗组给予12.29g/mL补肾化痰生新药物、对照组给予10mL/kg生理盐水,各组均按10mL/kg剂量给药。早晚各1次,连续灌胃7天,第8天上午末次给药90min后麻醉,腹主动脉采血,室温静置30min后,3500r/min离心15min,56℃恒温水箱灭活30min,-80℃冰箱保存备用。

1.5 BMSCs的提取、培养及分离纯化 新生2周内SD大鼠,脱颈处死后,剥离两侧股骨及胫骨,15mL注射器抽取适量的完全培养基冲洗骨髓腔,200目筛过滤骨髓液至离心管中,1000r/min,离心5min,37℃、5%CO₂恒温培养箱内培养,48h首次换液。取足量单细胞悬液,PBS液2mL洗涤,1000r/min离心5min,弃上清。加入FITC标记工作浓度为1:50的抗CD105⁺抗体,4℃条件下轻缓振荡,使细胞与抗体充分混匀,避光孵育30min,分选后的细胞移入12孔培养板培养,每3天换液1次,培养至第3代备用。

1.6 分组及给药 将96孔培养板中BMSCs随机分为补肾化痰生新组、生理盐水组、正常组,正常组加入杜氏培养液(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM);按照等差稀释法,共设5个浓度,补肾化痰生新组加入补肾化痰生新含药血清,终浓度为10%、15%、20%、25%、30%;生理盐水组加入生理盐水血清,终浓度为10%、15%、20%、25%、30%,37℃恒温箱内继续培养。

1.7 各检测指标的测定 MTT法检测各组BMSCs增殖变化:将补肾化痰生新组、生理盐水组、正常组的第3代P₃BMSCs,以1×10⁴个/mL细胞密度接种至96孔板中(每孔200 μ L);每组5个复孔,并设调零孔和对照孔,置于37℃、5%CO₂的培养箱中培养。分别于24h、48h、72h后,加入20 μ L 0.5g/L的MTT溶液,孵育4h后吸去MTT,加入150 μ L DMSO,摇晃15min,使结晶充分溶解。酶联免疫检测仪于570nm波长下测定各组细胞的吸光度值(OD值),以OD值为纵坐标,时间为横坐标,绘制生长曲线,实验重复3次。

不同代次BMSCs生长曲线和群体倍增时间比较:取各组培养的P₃、P₅、P₇、P₉骨髓BMSCs,取5×10⁴个/mL单细胞悬液接种至15mL培养瓶,每瓶2mL,置37℃、5%CO₂孵箱内培养。每天计数细胞,取均值,连续观察5天,以培养时间为横轴,细胞数为纵轴绘制生长曲线,并按Patterson公式计算群体倍增时间。 $To=T \times \log_2[(\log N_t - \log N_0)]$,其中N₀为初始细胞数,N_t为终末细胞数,T为N_t-N₀。以不同的代次为横轴,以倍增时间为纵轴绘制曲线。

BMSCs的 β -半乳糖苷酶活性变化检测:取各组培养好的细胞,裂解细胞取上清制备样品,加入1mL的胰酶进行消化。混匀后3000r/min离心5min。去上清,加入 β -半乳糖苷酶试剂盒中的清理液,每管3mL,混匀后用细胞计数板分别计数。用移液枪抽取上清,加入500 μ L细胞裂解液,放入4℃冰箱30min后取出离心管,低温高速离心机4℃,13000r/min离心5min。离心后抽上清置于2mL的EP管中。取裂解好的各组CD105⁺BMSCs上清样品,加20 μ L于96孔板中,每组设4个复孔。每孔分别加入稀释液125 μ L,晃动96孔板混匀,放入37℃温箱中5min。拿出培养板后开始加反应液,每孔25 μ L,需避光。轻轻晃动96孔板混匀,放入37℃温箱中并开始计时,直至孔中液体变为红色,停止计时每孔加入终止液80 μ L。酶标仪波长为570nm处检测 β -半乳糖苷酶活性。 β -半乳糖苷酶活性=[(裂解的细胞上清样品的OD值×样品容量)/(样品容量×4.5×样品反应时间)]/实际样品蛋白浓度。

BCA法检测BMSCs的蛋白含量:蛋白标准品按照0、2、4、6、8、12、16、20 μ L分别加入96孔板中,每个量设5个复孔。每孔的蛋白标准品用PBS补充到20 μ L。细胞上清样品每孔20 μ L。每组设4个复孔,蛋白标准品及细胞上清样品每孔加200 μ L配好的BCA工作液。37℃放置30min,

酶标仪于波长 562 nm 处检测 OD 值。

流式细胞术检测不同代次 CFDA-SE 标记 BMSCs 增殖情况：各组分别离心收集细胞，用 1 mL 1× 细胞染色缓冲液，并调整细胞浓度为 1× 10⁶ 个 / mL；把 1 mL 羧基荧光素乙酰乙酸 (Carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester, CFDA-SE) 储存液加入到上述 15 mL 离心管内混匀。37 °C 孵育 10 min，在 15 mL 离心管内加入约 10 mL 完全细胞培养液 (含 10% FBS)，室温混匀，以终止标记反应。室温离心去上清，再用 5 mL 完全培养液洗涤 1 次。再加入 5 mL 完全培养液，37 °C 孵育 10 min，离心去上清，完成洗涤。在同一时间点用流式细胞仪检测分析 (FL1 通道呈绿色荧光。)

不同代次 BMSCs 细胞周期变化：分别吸取 2~3 mL 各组细胞培养基原液，分别用 500 μL 胰酶消化，1 280 r/min 离心 5 min。离心后吸除上清，70% 冰乙醇 500 μL 固定过夜，4 °C 保存，染色前用 4 °C PBS 洗去固定液。PBS 洗涤细胞 1 次，1 000 r/min 离心 5 min，收集洗涤后的细胞，并调整细胞浓度为 1× 10⁵ 个 / mL，取全部单细胞悬液。细胞沉淀中加 100 μL RNaseA 溶液，重悬细胞，37 °C 水浴 30 min。再加入 400 μL PI 染色液混匀，4 °C 避光孵育 30 min。流式细胞仪检测，记录激发波长 488 nm 处红色荧光。

实时荧光 PCR 检测不同代次 BMSCs 端粒酶活性变化：取各组细胞置入 1.5 mL EP 管中，Trizol 试剂盒提取总 RNA，紫外光度仪测定 RNA 含量。以 β-actin 为内参，25 μL 反应体系。各引物序列如下：TERT-F：5'-GACATGGAGAACAAGCTGTTTGC-3'，TERT-R：5'-ACAGGGAAGTTCACCACTGTC-3'，引物长度 20 bp，扩增片段长度 185 bp；β-actin-F：5'-GAGACCTCAAGACCCAGCC-3'，β-actin-R：5'-TCGGGG-CATCGGAACCGCTCA-3'，引物长度 20 bp。总反应体系包括 2× Real time PCR Master Mix (SYBR Green) 12.5 μL，模板 (cDNA 稀释 10 倍)

1 μL，引物 MIX (F/R 各为 10 μM) 2 μL，0.1% DEPC 水 7.5 μL。放入荧光定量 PCR 循环仪，反应条件为 95 °C，5 min；95 °C，15 s；60 °C，20 s；72 °C，40 s；40 cycle；溶解曲线 95 °C，15 s；60 °C，60 s；60.3 °C，15 s；60.6 °C，15 s。采用 2^{-ΔΔCT} 法进行分析。ΔCT= 目的基因 CT 值 - 内参 CT 值，ΔΔCT=(目的基因 ΔCT 值 - 内参 ΔCT 值)_{实验组} - (目的基因 ΔCT 值 - 内参 ΔCT 值)_{对照组}，样本表达量 = 2^{-ΔΔCT}。

1.8 统计学方法 采用统计软件 SPSS20.0 进行统计分析，定量数据用 ($\bar{x} \pm s$) 表示，符合正态分布资料采用单因素方差分析检验，如不满足上述条件则采用秩和检验，P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组不同代次 BMSCs β-半乳糖苷酶活性变化 见表 1。与正常组比较，生理盐水组不同代 β-半乳糖苷酶活性差异无统计学意义 (P > 0.05)；与生理盐水组比较，补肾化瘀生新组 β-半乳糖苷酶活性降低 (P < 0.05)。

表 1 各组不同代次 BMSCs β-半乳糖苷酶活性变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	P ₃	P ₅	P ₇	P ₉
正常组	4	0.35±0.12	0.36±0.02	0.43±0.06	0.50±0.06
生理盐水组	4	0.31±0.01 ^①	0.35±0.05 ^①	0.41±0.02 ^①	0.48±0.03 ^①
补肾化瘀生新组	4	0.22±0.02 ^②	0.29±0.03 ^②	0.35±0.05 ^②	0.45±0.01 ^②

与正常组比较，①P > 0.05；与生理盐水组比较，②P < 0.05

2.2 各组不同代次 BMSCs 增殖变化 见表 2。与正常组比较，生理盐水组 24 h、48 h、72 h 不同代次 BMSCs 增殖率差异无统计学意义 (P > 0.05)；与生理盐水组比较，补肾化瘀生新组 24 h、48 h、72 h 不同代次 BMSCs 增殖率显著升高 (P < 0.05)。

表 2 各组不同代次 BMSCs 增殖变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	P ₃			P ₅			P ₇			P ₉			%
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	
正常组	5	0.54±0.01	0.65±0.02	0.75±0.03	0.56±0.03	0.67±0.03	0.82±0.13	0.58±0.05	0.68±0.04	0.81±0.04	0.49±0.03	0.52±0.04	0.63±0.02	
生理盐水组	5	0.56±0.02 ^①	0.68±0.03 ^①	0.79±0.04 ^①	0.58±0.01 ^①	0.70±0.02 ^①	0.83±0.02 ^①	0.60±0.02 ^①	0.71±0.04 ^①	0.86±0.04 ^①	0.50±0.02 ^①	0.55±0.03 ^①	0.65±0.01 ^①	
补肾化瘀生新组	5	1.37±0.03 ^②	2.14±0.37 ^②	5.72±0.21 ^②	1.67±0.06 ^②	2.43±0.36 ^②	6.01±0.26 ^②	1.68±0.02 ^②	2.10±0.22 ^②	5.98±0.12 ^②	1.12±0.08 ^②	1.72±0.18 ^②	2.52±0.08 ^②	

与正常组比较，①P > 0.05；与生理盐水组比较，②P < 0.05

2.3 各组不同代次 BMSCs 群体倍增时间变化 见表 3。与正常组比较，生理盐水组不同代次 BMSCs 群体倍增时间相比无差异 (P > 0.05)；与生理盐水组比较，补肾化瘀生新组不同代次 BMSCs 群体倍增时间降低 (P < 0.05)。

2.4 各组不同代次 BMSCs 端粒酶活性变化 见表 4。与正常组比较，生理盐水组不同代次 BMSCs 端粒酶活性差异无统计学意义 (P > 0.05)；与生理盐水组比较，补肾化瘀生新组不同

代次 BMSCs 端粒酶活性明显升高 (P < 0.05)。

表 3 各组不同代次 BMSCs 群体倍增时间变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	P ₃	P ₅	P ₇	P ₉
正常组	5	3.31±0.15	3.13±0.07	4.32±0.20	5.79±0.14
生理盐水组	5	3.22±0.12 ^①	3.13±0.02 ^①	4.15±0.19 ^①	5.69±0.33 ^①
补肾化瘀生新组	5	2.87±0.31 ^②	2.12±0.41 ^②	3.42±0.13 ^②	4.43±0.17 ^②

与正常组比较，①P > 0.05；与生理盐水组比较，②P < 0.05

表4 各组不同代次 BMSCs 端粒酶活性变化($\bar{x} \pm s$)

组别	n	P ₃	P ₅	P ₇	P ₉
正常组	5	1.02±0.23	1.13±0.19	1.25±0.11	0.92±0.15
生理盐水组	5	1.09±0.17 ^①	1.18±0.21 ^①	1.29±0.02 ^①	0.95±0.21 ^①
补肾化瘀生新组	5	2.72±0.32 ^②	3.02±0.12 ^②	2.75±0.12 ^②	1.97±0.16 ^②

与正常组比较, ①P>0.05; 与生理盐水组比较, ②P<0.05

表5 各组不同代次 BMSCs 不同周期细胞比例变化($\bar{x} \pm s$)

组别	n	P ₃			P ₅			P ₇			P ₉		
		G0/G1期	G2/M期	S期	G0/G1期	G2/M期	S期	G0/G1期	G2/M期	S期	G0/G1期	G2/M期	S期
正常组	5	62.13±0.22	12.76±0.27	25.11±0.23	63.22±0.24	12.36±0.11	24.92±0.17	68.36±0.18	8.90±0.01	22.73±0.23	70.89±0.15	12.11±0.13	17.82±0.14
生理盐水组	5	61.94±0.23 ^①	13.36±0.17 ^①	24.43±0.12 ^①	63.02±0.42 ^①	12.54±0.21 ^①	24.74±0.27 ^①	68.39±0.21 ^①	8.58±0.24 ^①	22.63±0.17 ^①	71.01±0.12 ^①	12.19±0.11 ^①	18.02±0.37 ^①
补肾化瘀生新组	5	46.37±0.33 ^②	17.46±0.52 ^②	36.23±0.27 ^②	45.23±0.24 ^②	16.54±0.39 ^②	38.23±0.16 ^②	47.37±0.19 ^②	19.50±0.11 ^②	33.13±0.34 ^②	55.39±0.32 ^②	20.38±0.09 ^②	24.23±0.34 ^②

与正常组比较, ①P>0.05; 与生理盐水组比较, ②P<0.05

3 讨论

成年个体组织中细胞衰老和细胞更新这一自我平衡过程, 主要由干细胞维持与调控, BMSCs 的数量和质量决定了组织器官的功能状态。因此, 改变或阻止 BMSCs 衰老的发生或者补充新鲜的 BMSCs 对抗衰老有一定的效果。本研究发现随着传代培养时间的延长, BMSCs 逐渐呈现衰老特征, 表现为细胞扁平、细胞核较大, 易被 β-半乳糖苷酶染色、核固缩等, 同时细胞增殖能力以及多向分化潜能均降低。但补肾化瘀生新组 BMSCs 形态及排列较规则, 体积和胞浆区域均比正常组增大, 浆核的比例比正常组增加, 胞浆中可见少量颗粒或空泡, 显示通过补肾化瘀生新抗衰老干预后, 细胞形态接近正常。与生理盐水组比较, 补肾化瘀生新组不同代 β-半乳糖苷酶活性逐渐增高, 说明补肾化瘀生新方能够降低 BMSCs 的 β-半乳糖苷酶活性; 24 h、48 h、72 h BMSCs 增殖率在不同代次均升高, 群体倍增时间在各代次均降低, 说明补肾化瘀生新方能够提高 BMSCs 的增殖能力; 端粒酶活性升高, 显示补肾化瘀生新方延缓衰老机理与下调端粒酶活性有关; G0/G1 期比例降低, G2/M 期及 S 期细胞比例升高, 说明补肾化瘀生新可促进细胞进入增殖周期, 加快增殖分化。综上, 补肾化瘀生新方可通过降低 β-半乳糖苷酶活性、激活端粒酶活性、促进 BMSCs 增殖而发挥延缓细胞衰老的作用。

[参考文献]

[1] HOBERMAN A R, CIRINO C, MCCARTHY M B, et al. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Enhanced by Platelet-Rich Plasma Maintain Adhesion to Scaffolds in Arthroscopic Simulation[J]. Arthroscopy The Journal of Arthroscopic and Related Surgery, 2017, 34(3): 872-881.

[2] HAJINEJAD M, PASBAKSH P, OMIDI A, et al. Esveratrol pretreatment enhanced homing of SDF-1α-preconditioned bone marrow-derived mesenchymal stem cells

2.5 各组不同代次 BMSCs 不同周期细胞比例变化 见表 5。与正常组比较, 生理盐水组不同代次 G0/G1 期细胞比例差异无统计学意义(P>0.05); 与生理盐水组比较, 补肾化瘀生新组不同代次 G0/G1 期细胞比例均下降(P<0.05), G2/M 期和 S 期细胞比例均上升(P<0.05)。

in a rat model of liver cirrhosis[J]. J Cell Biochem, 2018, 119(3): 2939-2950.

[3] 宰青青, 秦臻, 叶兰. 黄精对自然衰老大鼠内皮祖细胞功能及端粒酶活性的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2016, 36(12): 1480-1485.

[4] 李宁, 李应福, 谢兴文, 等. 中药诱导骨髓间充质干细胞的定向分化: 研究与进展[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(1): 135-139.

[5] KHONG D, LI M, SINGLETON A, et al. Orthogonal potency analysis of mesenchymal stromal cell function during ex vivo expansion[J]. Exp Cell Res, 2018, 362(1): 102-110.

[6] YANG Y M, LI P, CUI D C, et al. Effect of aged bone marrow microenvironment on mesenchymal stem cell migration[J]. Age (Dordr), 2015, 37(2): 16.

[7] 张金生, 张宝霞, 朱慧芳, 等. 干细胞微环境与活血化瘀[J]. 中国组织工程研究, 2015, 20(12): 1832-1835.

[8] SASINE J P, YEO K T, CHUTE J P. Concise Review: Paracrine Functions of Vascular Niche Cells in Regulating Hematopoietic Stem Cell Fate[J]. Stem Cells Transl Med, 2017, 6(2): 482-489.

[9] YU Y, ZHANG Q, MENG Q, et al. Mesenchymal stem cells overexpressing Sirt1 inhibit prostate cancer growth by recruiting natural killer cells and macrophages[J]. Oncotarget, 2016, 7(44): 71112-71122.

[10] 张宝霞, 张金生, 杜梅梅, 等. 活血化瘀药调控干细胞旁分泌效应修复损伤脑组织作用机制的研究[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(1): 288-292.

[11] 张金生, 张宝霞. 机体衰老、干细胞衰老与补肾化瘀生新[J]. 中医研究, 2015, 28(12): 56-60.

(责任编辑: 冯天保, 钟志敏)