

• 基础研究 •

洛伐他汀抑制大鼠骨髓间充质干细胞凋亡的实验研究

徐瑞霞 陈曦 陈静海 朱伟铨 韩瑜 邓琳子 丛祥凤

【摘要】 目的 体外以缺氧无血清条件模拟心肌梗死后的心脏缺血微环境,研究洛伐他汀是否能够抑制缺氧无血清引起的骨髓间充质干细胞(MSCs)凋亡。方法 以 Hoechst33342 染色法及 Annexin V/PI 流式细胞术检测洛伐他汀的抗凋亡作用,检测线粒体膜电位变化,进一步采用 Western blot 方法检测洛伐他汀对细胞色素 C 释放及 caspase-3 活化的影响。结果 洛伐他汀 0.01~1 μ mol/L 能够有效地抑制缺氧无血清引起的 MSCs 凋亡。洛伐他汀抑制线粒体凋亡途径,增强线粒体膜电位水平、抑制细胞色素 C 释放,降低 caspase-3 活化水平。结论 洛伐他汀能够抑制线粒体途径介导的凋亡,阻止 caspase-3 的活化,发挥抗缺氧无血清引起的 MSCs 凋亡,为提高移植干细胞的存活率提供了一种可能有效的干预措施。

【关键词】 洛伐他汀;间充质干细胞;细胞凋亡;存活率

Lovastatin inhibits apoptosis of mesenchymal stem cells isolated from rat bone marrow

XURuixia, CHEN Xi, CHEN Jinghai, et al

Research Center for Cardiovascular Regenerative Medicine, the Ministry of Health,
Cardiovascular Institute and Fu-Wai Hospital, Chinese Academy of Medical
Sciences, Beijing 100037, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of lovastatin on rat bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) apoptosis induced by hypoxia and serum deprivation (Hypoxia/SD) *in vitro*, focusing in particular on regulation of mitochondrial apoptotic pathway, and to find the useful therapeutic methods to increase transplanted MSCs survival. Methods MSCs were isolated from bone marrow of Sprague-Dawley rats. The anti-apoptotic effects of lovastatin were detected using Hoechst33342 and Annexin V-FITC/PI binding assay by flow cytometric analysis. The cytochrome C and the activation of caspase-3 were detected by Western blot. Results Lovastatin (0.01-1 μ mol/L) remarkably prevented MSCs from hypoxia/SD-induced apoptosis through inhibition of the mitochondrial apoptotic pathway, leading to attenuation of caspase-3 activation. The loss of mitochondrial membrane potential and cytochrome C release from mitochondria to cytosol were significantly inhibited by lovastatin. Conclusion Lovastatin protects MSCs from hypoxia/SD-induced apoptosis via inhibiting mitochondrial pathway, suggesting that it may provide a useful therapeutic adjunct for transplanting MSCs into damaged heart after myocardial infarction.

【Key words】 lovastatin; stem cells mesenchymal; apoptosis; survival rate

随着冠心病发病率的逐年增高,缺血性心脏病已成为危害人类健康的重大疾病之一。缺血引起的心肌细胞死亡导致斑痕组织形成及心室壁顺应性降低,最终降低心功能引发心力衰竭。近年来,随着干细胞研究的兴起,骨髓间充质干细胞(mesenchymal

stem cells, MSCs)以其具有多向分化潜能、来源充足、体外易扩增、无免疫排异等优点,已经成为细胞移植治疗心肌梗死的首选^[1~3]。然而,移植细胞在缺血心肌组织中较低的存活率限制了此方法的临床治疗效果^[4,5]。如何提高移植细胞的存活率,实现

收稿日期:2008-01-29

作者单位:100037 北京市,中国医学科学院阜外心血管病医院 中心实验室(徐瑞霞);卫生部心血管疾病再生医学重点实验室(陈曦、陈静海、朱伟铨、韩瑜、邓琳子、丛祥凤)

作者简介:徐瑞霞,女,1976年5月生,山东省潍坊市人,医学博士,助理研究员。Tel: 010-88398584, E-mail: ruixiaxu2006@yahoo.com.cn

细胞再生、最终改善心功能,是目前细胞移植治疗缺血性心脏病亟待解决的问题。

他汀类药物系 HMG-CoA 还原酶抑制剂,能降低血清中总胆固醇和低密度脂蛋白的水平,目前在脂质代谢异常和动脉粥样硬化的治疗中被广泛应用^[6]。近年研究表明,他汀类药物的“多效性”在心血管病的预防和治疗中发挥着关键性作用,包括改善内皮功能、抑制炎症反应、抗氧化应激反应、减轻心肌梗死后的心脏重塑、增强移植后免疫耐受、抑制人主动脉平滑肌细胞凋亡等作用^[7~9]。那么,他汀类药物是否能促进 MSCs 存活呢?本研究旨在以缺氧无血清条件模拟缺血心肌微环境诱导 MSCs 凋亡^[10],深入探讨洛伐他汀(lovastatin)是否能够抑制 MSCs 凋亡,从而为提高移植细胞的存活率、改善临床治疗效果提供实验依据和理论基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 洛伐他汀、罗丹明 123 (Sigma 公司),IMDM 培养基、特优级胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶(Gibco,美国),缺氧培养盒(BioMérieux Rsa 公司,法国),Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(北京宝赛生物公司)。Caspase-3 酶活性检测试剂盒(Bivision 公司)。Caspase-3 抗体、Cleaved caspase-3 抗体、细胞色素 C(cytochrome C, Cyto C)抗体(Cell Signal 公司),Actin 抗体(Santa Cruz 公司),辣根过氧化物酶标记的二抗(北京中山生物有限公司)。CO₂ 恒温细胞培养箱(JOUAN 公司,法国),荧光/倒置相差显微镜(Olympus 公司,日本),全自动酶标分析仪(Bio-Rad 公司),流式细胞仪(BD 公司,美国)。

1.2 大鼠 MSCs 的分离与培养(全骨髓法) Sprague-Dawley 大鼠(二级动物),体重约 80g,雌雄不拘,由北京大学医学部实验动物中心提供。参照文献方法^[11],颈椎脱臼法处死大鼠,严格无菌条件下取双侧股骨及胫骨,用不含血清的 IMDM 培养基反复冲洗骨髓腔,将冲洗获得的细胞悬液转入离心管,1000r/min 离心 5 min,弃上清,细胞沉淀中加入适量含 15%FBS 的 IMDM 培养基,小心吹打制成细胞悬液,进行细胞计数,将细胞加入到含 15%FBS 的 IMDM 培养基中,接种于培养瓶。37℃,5%CO₂ 培养箱中培养。

1.3 MSCs 的纯化和扩增 采用贴壁筛选法,每3d 更换新鲜的培养液,4~5 d 后细胞可达到 80%~90%融合,以 1:3 进行传代。换液及传代后可去除

非贴壁的骨髓造血干细胞,使 MSCs 得以纯化,传至 2~5 代的 MSCs 用于实验。

1.4 实验分组及处理 正常对照组:以完全培养基(IMDM+15%FBS)正常培养。凋亡模型组:以无血清 IMDM 及缺氧处理(置于密闭缺氧罐中,内置耗氧剂),37℃,5%CO₂ 孵育 6 h^[10]。洛伐他汀处理组:以不同浓度的洛伐他汀(0.001, 0.01, 0.1, 1μmol/L)预处理 MSCs 1h,然后在缺氧无血清条件下继续孵育 6 h。

1.5 流式细胞仪分析 洛伐他汀处理细胞后,取 6×10⁵ 细胞,胰酶消化。1000r/min, 4℃,离心 5min,弃上清。细胞用 PBS 洗 2 次后悬浮于 200μl 结合缓冲液。加入 10μl 异硫氰酸荧光素(FITC)标记的 Annexin-V (Annexin-V-FITC),轻轻混匀,4℃避光反应 15~20 min。加入 5μl 碘化丙啶(PI),300μl 结合缓冲液,混匀,流式细胞仪检测凋亡细胞。

1.6 Hoechst33342 荧光染色 收集洛伐他汀处理后的细胞,PBS 漂洗 2 次。以完全培养基稀释 Hoechst33342 储存液至终浓度为 0.1g/L,室温避光反应 10 min 后,以紫外光激发,荧光显微镜下观察凋亡细胞形态。

1.7 线粒体膜电位(ΔΨ_m)的检测 收集洛伐他汀处理后的细胞,PBS 漂洗 2 次,加入罗丹明 123 (10mg/L),37℃水浴 30 min,流式细胞仪检测线粒体膜电位水平。

1.8 Caspase-3 活性的检测 细胞经洛伐他汀处理完毕后,收集细胞,提取蛋白,以考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。根据 Caspase-3 酶活性检测试剂盒操作,使用酶标仪 405nm 波长测定 Caspase-3 活力。

1.9 Western blot 检测蛋白表达水平 收集洛伐他汀处理后的细胞,提取蛋白。以考马斯亮蓝法测定蛋白浓度,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白(每孔上样品量为 50 g),然后电转移蛋白至硝酸纤维素膜。Western blot 检测 caspase-3 活化片段和 Cyto C 的表达水平。硝酸纤维素膜置含 5%脱脂奶粉的 TBST 中,4℃过夜,TBST 漂洗。与相应的一抗室温下温育 2 h。室温下以 TBST 液在平缓摇动条件下漂洗 3 次,每次 10 min。与辣根过氧化物酶标记的二抗在室温下温育 90 min。充分漂洗膜后以化学发光液显像,暗室中进行 X 光片压片,经过显、定影得到目的条带。

1.10 统计学处理 所有结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用非配对 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MSCs 的形态 图1所示,细胞接种后24 h可见少数细胞开始贴壁生长,细胞形态呈梭形,而大部分悬浮在溶液中的细胞呈圆形,主要是造血干细胞,换液去除非增殖细胞。培养至第3天,细胞增殖加快,呈集落样、漩涡状迅速生长。至第5天细胞80%铺满瓶底,达到次融合状态,此时按1:3传代,造血干细胞随着换液和传代次数的增加连渐减少,达到纯化 MSCs 的目的。

2.2 倒置相差显微镜下观察洛伐他汀抑制 MSCs 凋亡的现象 倒置相差显微镜下观察细胞形态(图2):正常对照组细胞生长旺盛,长梭形,形态规则,呈漩涡状生长;凋亡模型组及洛伐他汀 $0.001\mu\text{mol/L}$ 组细胞形状不规则,皱缩,呈树枝状分布,且有大量漂浮死细胞;洛伐他汀($0.01, 0.1, 1\mu\text{mol/L}$)处理组细胞形态规则,长梭形,典型的漩涡状生长,未见有漂浮死细胞。研究结果显示,与凋亡模型组相比较,洛伐他汀($0.01, 0.1, 1\mu\text{mol/L}$)具有显著的抗缺氧无血清诱导的骨髓间充质干细胞凋亡的作用。

2.3 免疫荧光检测洛伐他汀抑制缺氧无血清诱导的 MSCs 凋亡 本实验选用 Hoechst33342 作为荧

光探针,在荧光显微镜下观察洛伐他汀对缺氧无血清诱导的 MSCs 凋亡细胞核形态的影响。如图3所示,正常对照组细胞核大而均质,淡蓝染色;凋亡模型组及洛伐他汀 $0.001\mu\text{mol/L}$ 组细胞核固缩、碎裂,形态不规则,染色深;洛伐他汀($0.01, 0.1, 1\mu\text{mol/L}$)处理组细胞核似正常对照组,核大而均质,淡蓝染色。

2.4 流式细胞术检测洛伐他汀抑制缺氧/无血清诱导的 MSCs 凋亡 如图4A、4B所示,与凋亡模型组相比较,洛伐他汀($0.01, 0.1, 1\mu\text{mol/L}$)处理组细胞早期凋亡率明显降低,但对细胞中晚期凋亡率及坏死细胞没有显著影响($P>0.05$);洛伐他汀 $0.001\mu\text{mol/L}$ 处理组未见明显的抗凋亡作用。因此在后续实验中选择洛伐他汀($0.01, 0.1, 1\mu\text{mol/L}$)继续进行抗凋亡检测。

2.5 洛伐他汀抑制缺氧无血清导致的 caspase-3 的活化 酶标仪测定 Caspase-3 活力($A_{405\text{nm}}$),结果表明洛伐他汀($0.01, 0.1, 1\mu\text{mol/L}$)降低缺氧无血清诱导的 Caspase-3 活性增高(图5A)。Western blot 检测 Caspase-3 活化片段,结果显示,洛伐他汀($0.01, 0.1, 1\mu\text{mol/L}$)能明显减少活化片段的产生,与酶活力检测一致(图5B)。

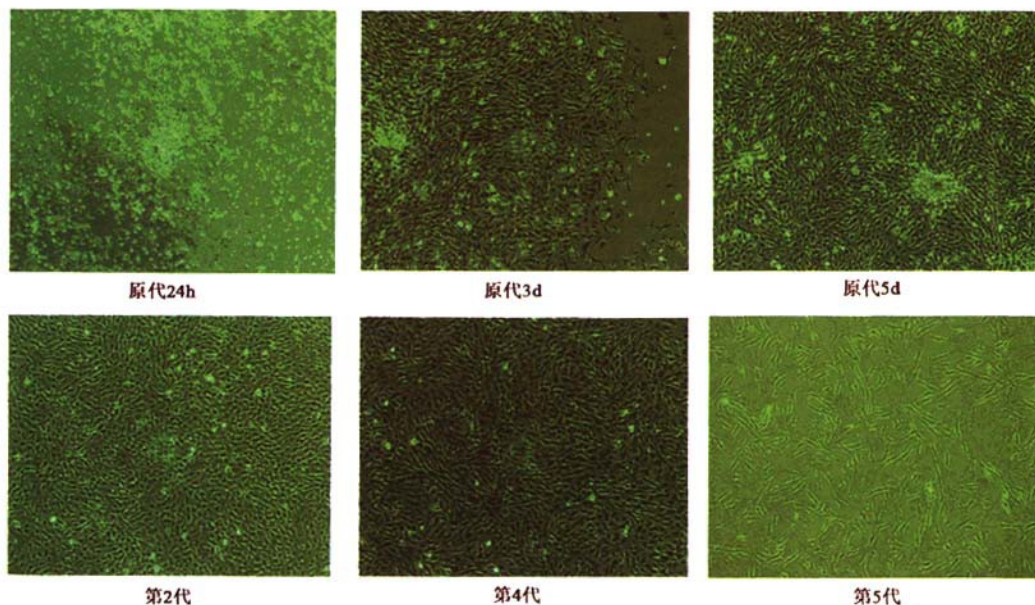
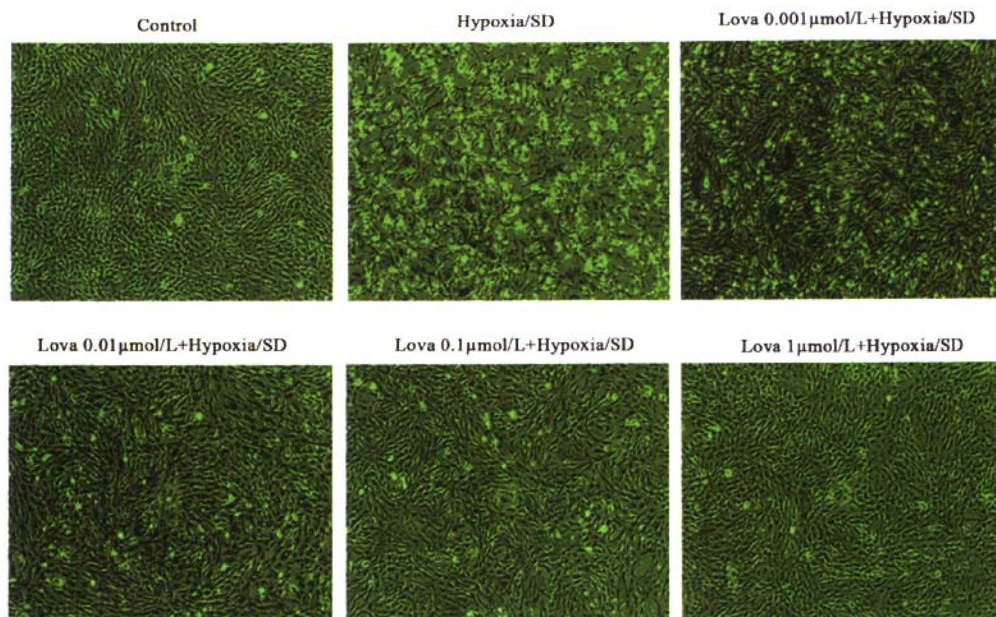
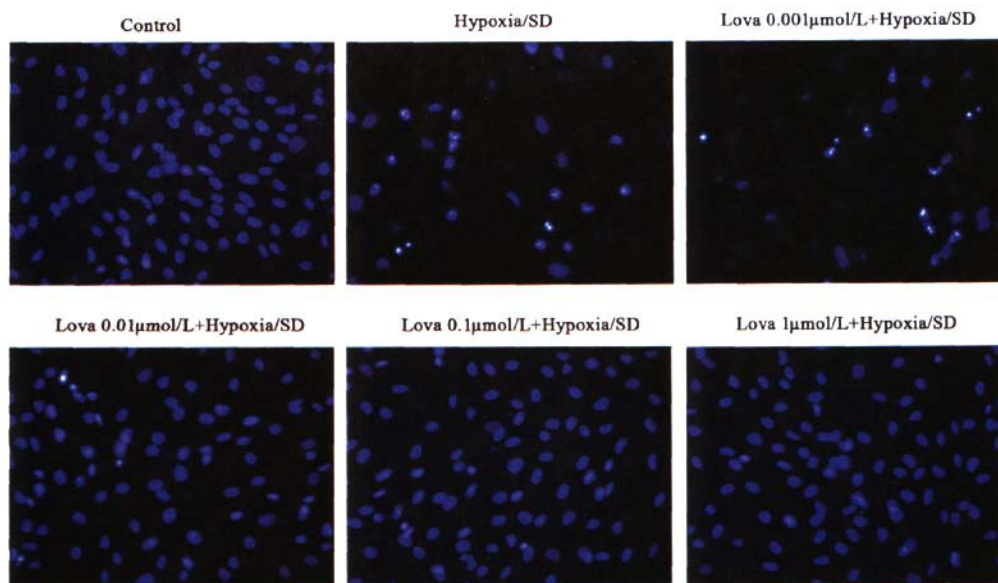


图1 相差显微镜下观察分离培养的大鼠 MSCs ($\times 40$)



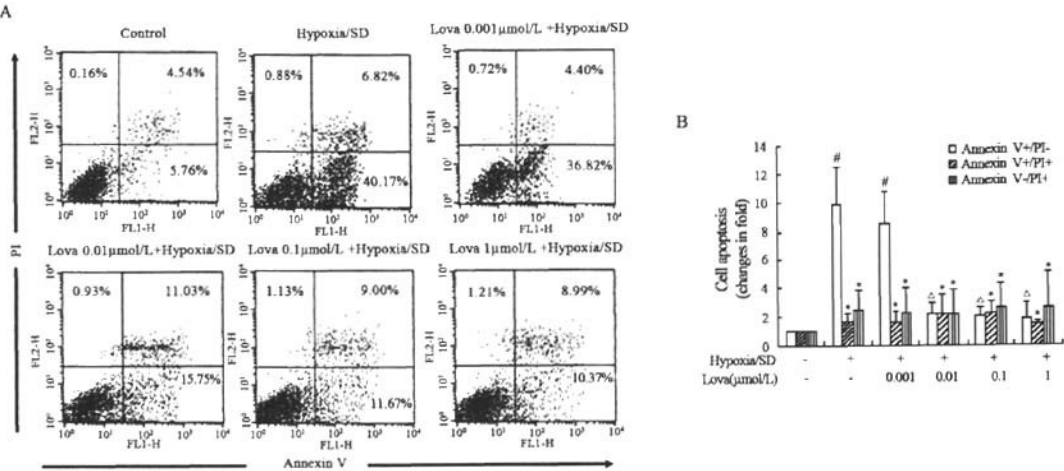
Control; 正常对照组; Hypoxia/SD; 缺氧无血清处理; Lova + Hypoxia/SD; 洛伐他汀各浓度处理组

图 2 相差显微镜下观察洛伐他汀抑制 MSCs 的凋亡 ($\times 40$)



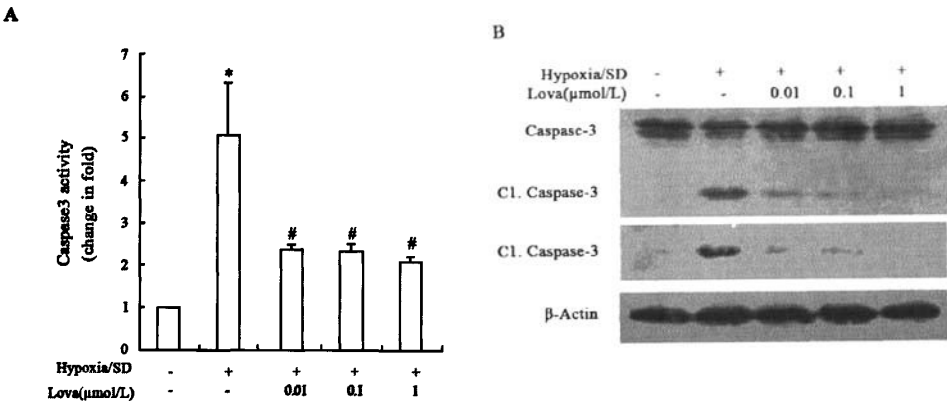
Control; 正常对照组; Hypoxia/SD; 缺氧无血清处理组; Lova + Hypoxia/SD; 洛伐他汀各浓度处理组

图 3 Hochest33342 染色后荧光显微镜下观察洛伐他汀抑制 MSCs 的凋亡 ($\times 40$)



Control:正常对照组;Hypoxia/SD:缺氧无血清处理组;Lova+Hypoxia/SD:洛伐他汀各浓度处理组。与正常对照组比较,* $P<0.05$,* $P<0.01$;与缺氧无血清组比较, $\Delta P<0.01$

图 4 Annexin V/PI 流式细胞术检测洛伐他汀抑制 MSCs 凋亡的作用



与正常对照组比较,* $P<0.01$;与缺氧无血清组比较,* $P<0.01$

图 5 洛伐他汀降低缺氧无血清所致 Caspase-3 酶活性增高(A);

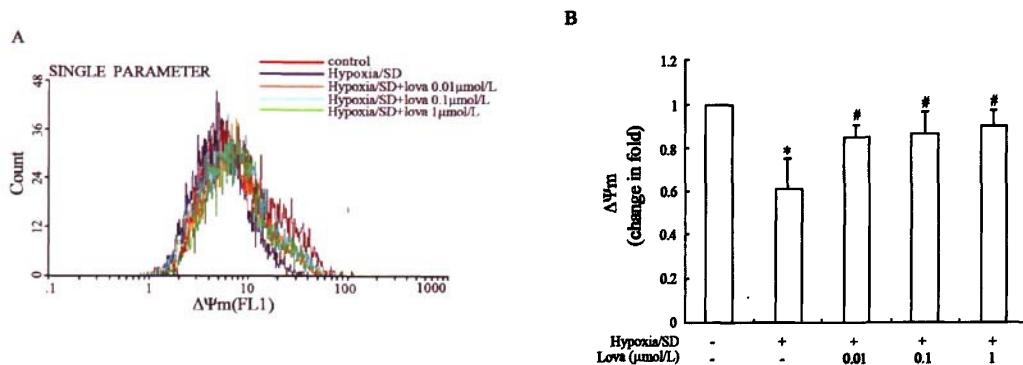
Western blot 方法检测洛伐他汀减少缺氧无血清所致的 Caspase-3 活化片段的生成(B)

2.6 洛伐他汀对凋亡细胞线粒体膜电位的影响
罗丹明 123 可结合到线粒体基质,其荧光的增强或减弱说明线粒体内膜电负性的增高或降低。图 6A、6B 显示,与凋亡模型组比较,洛伐他汀(0.01, 0.1, 1 μmol/L)处理组细胞的线粒体膜电位明显升高,表明洛伐他汀抑制缺氧无血清诱导的凋亡作用通过线粒体途径介导。

2.7 洛伐他汀抑制缺氧无血清引起的 Cyto C 的释放
分离细胞的线粒体蛋白组分和胞浆蛋白组分,分别检测两种组分中 Cyto C 含量的变化。如图 7 所示,正常培养的 MSCs 中,Cyto C 存在于线粒体组分中;在凋亡模型组,胞浆中 Cyto C 含量明显增加,提示细胞 Cyto C 由线粒体释放到了胞浆中;与

凋亡模型组相比较,洛伐他汀(0.01, 0.1, 1 μmol/L)处理组细胞的胞浆中 Cyto C 明显减少,而线粒体组分中 Cyto C 含量显著增加,说明洛伐他汀能够抑制缺氧无血清引起的 Cyto C 的释放,从而发挥抗凋亡作用。

3 讨论
心肌梗死后心脏缺血微环境对移植入的 MSCs 生长及存活的影响至关重要。笔者先前的研究报道,体外缺氧无血清联合处理 MSCs 可以诱导其产生 caspase 依赖的凋亡,并且早期凋亡率在缺氧无血清处理 6h 达到最高峰^[10]。本研究首次观察到心血管病常用的他汀类药物——洛伐他汀具有抗缺氧



△Ψm: 线粒体膜电位。与正常对照组比较, * $P < 0.01$; 与缺氧无血清处理组比较, # $P < 0.05$

图6 流式细胞术检测洛伐他汀对凋亡细胞线粒体膜电位的影响

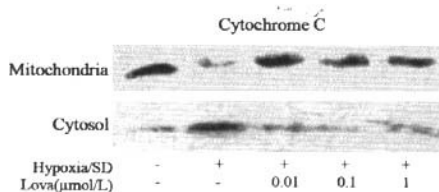


图7 洛伐他汀抑制缺氧无血清引起的细胞色素C的释放
无血清诱导的MSCs凋亡的作用。

细胞凋亡的共同特征是细胞皱缩变小,细胞核染色质凝集成斑块状及聚集在核膜周边,呈现核碎裂现象。光镜及Hoechst33342荧光染色所得的形态学结果均显示,洛伐他汀(0.01, 0.1, 1 μmol/L)能够明显减少MSCs凋亡数量,抑制细胞核固缩及碎裂的发生。

磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)正常位于细胞膜的内侧,在细胞凋亡早期,PS可从细胞膜的内侧翻转到细胞膜表面,表现为Annexin-V阳性。PI是一种核酸染料,它不能透过完整的细胞膜,但在凋亡中晚期的细胞和坏死细胞,PI能够透过细胞膜而使细胞核红染。将Annexin-V进行荧光素FITC标记,作为荧光探针,与PI匹配使用,利用流式细胞仪,就可以将凋亡早期(Annexin V⁺/PI⁻)、中晚期(Annexin V⁺/PI⁺)以及坏死细胞(Annexin V⁻/PI⁺)区分开来。本实验中流式细胞检测结果表明,洛伐他汀(0.01, 0.1, 1 μmol/L)能够显著降低缺氧无血清引起的MSCs早期凋亡,但低浓度洛伐他汀(0.001 μmol/L)对MSCs的凋亡无影响,进一步验证了前述的形态学检测结果,明确了洛伐他汀抗MSCs凋亡作用的浓度范围。

Caspase信号级联通路是许多细胞凋亡主要的介导途径,Caspase-3在凋亡执行过程中起着关键的作用。多种凋亡刺激因子均可诱导线粒体跨膜电位

下降,使Cyto C从线粒体释放至细胞浆中,从而启动Caspase介导的凋亡级联反应^[12],导致凋亡迅速完成。本实验结果显示,洛伐他汀能够有效地抑制缺氧无血清联合处理引起的MSCs凋亡,降低Caspase-3活性并减少Caspase-3活化片段的表达,进一步确认了洛伐他汀的抗凋亡作用是通过线粒体途径,抑制Cyto C的释放,最终降低Caspase-3的活性实现的。

本研究已有的结论证明,在细胞移植治疗心肌梗死及其他缺血性疾病时,以他汀类药物进行干预,可望有效地抑制缺血引起的MSCs凋亡,提高其存活率,进而增强干细胞移植的临床治疗效果。本研究结果开辟了他汀类药物在干细胞移植治疗方面的新用途,进一步完善了他汀类药物在心血管系统疾病的应用价值。然而,本实验尚未在整体动物中验证洛伐他汀的抗凋亡作用,接下来的实验需要进一步验证,具体考虑方法如下:(1)MSCs移植前先以洛伐他汀预处理,然后移植入心肌梗死区,观察心脏中存活的细胞数量是否增加;(2)在细胞移植以前口服或注射洛伐他汀,以达到有效的血药浓度,从而提高心肌梗死区微环境的药物浓度,观察移植入的MSCs是否能够更好地存活。

此外,考虑到心肌梗死患者多伴有高血脂症及不同程度的动脉粥样硬化,因此对干细胞移植患者给予他汀类药物治理既有可能提高移植细胞的存活率,同时又能够降低血脂水平、延缓动脉粥样硬化进程、减轻氧化应激损伤及心脏重塑^[7,8],进而从多方面有效地防治心血管疾病的发生发展。

总之,本研究对于洛伐他汀抗MSCs凋亡作用及其作用途径的报道在国内外尚属首次,为提高移植干细胞的存活率、改善临床细胞移植治疗缺血性心脏病的疗效提供了新的思路,具有潜在的临床应用价值。

(下转第268页)

血管的形成,促进缺血区形成侧支循环。近来研究发现,VEGF 可动员骨髓源性 EPCs 进入到外周血中,并显著改善 EPCs 功能,修复损伤的血管内皮,从而抑制血管内膜的过度增生。Zentilin 等^[3]研究发现,腺病毒介导的 VEGF 基因转染可动员 EPCs 至 VEGF 诱导的血管新生部位,明显增加缺血下肢新生毛细血管密度,改善缺血下肢的血流供应。Chen 等^[4]也得出相同的研究结果。Li 等^[5]发现 VEGF 和胎盘生长因子可促使 EPCs 募集至血管新生部位促进成体血管发生。

本实验通过给予体外培养的 EPCs 不同浓度 VEGF,发现 VEGF 能够增加 EPCs 数量,促进 EPCs 的增殖、黏附及迁移能力,其作用效果呈剂量依赖性。进一步研究发现,VEGF 可上调 EPCs 的 eNOS mRNA 表达,促进 EPCs 分泌 NO。eNOS 是左旋精氨酸-NO 途径的关键酶,不仅诱导血管内皮细胞产生 NO,调节血管张力,而且还参与 EPCs 的动员、分化及归巢^[6,7]。因此,笔者推测 VEGF 促进 EPCs 生物学功能可能是通过上调 eNOS 活性这一途径完成的,其确切机制尚需进一步研究。

参考文献

- [1] Suzuki T, Nishida M, Futami S, et al. Neoendothelialization after peripheral blood stem cell transplantation

in humans. A case report of a Tokaimura nuclear accident victim. *Cardiovasc Res*, 2003, 58:487-492.

- [2] 崔斌, 黄岚, 宋耀明, 等. 冠心病患者循环内皮祖细胞与相关危险因素及冠状动脉病变的关系. *中华心血管病杂志*, 2005, 33:785-788.
- [3] Zentilin L, Tafuro S, Zacchigna S, et al. Bone marrow mononuclear cells are recruited to the sites of VEGF-induced neovascularization but are not incorporated into the newly formed vessels. *Blood*, 2006, 107: 3546-3554.
- [4] Chen F, Tan Z, Dong CY, et al. Combination of VEGF165/angiopoietin-1 gene and endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Eur J Pharmacol*, 2007, 568:222-230.
- [5] Li B, Sharpe EE, Maupin AB, et al. VEGF and PIGF promote adult vasculogenesis by enhancing EPC recruitment and vessel formation at the site of tumor neovascularization. *FASEB J*, 2006, 20:1495-1497.
- [6] Lamping K. Endothelial progenitor cells: sowing the seeds for vascular repair. *Circ Res*, 2007, 100: 1243-1245.
- [7] Kong D, Luis G, Abeel A, et al. Enhanced inhibition of neointimal hyperplasia by genetically engineered endothelial progenitor cells. *Circulation*, 2004, 109: 1769-1775.

(上接第 264 页)

参考文献

- [1] Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, et al. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med*, 2006, 12: 459-465.
- [2] Stamm C, Westphal B, Kleine HD, et al. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet*, 2003, 361:45-46.
- [3] Mark FB, Adam JE, Joseph YW, et al. Mesenchymal stem cell injection after myocardial infarction improves myocardial compliance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 290: H2196-H2203.
- [4] Geng YJ. Molecular mechanisms for cardiovascular stem cell apoptosis and growth in the hearts with atherosclerotic coronary disease and ischemic heart failure. *Ann N Y Acad Sci*, 2003, 1010: 687-697.
- [5] Mangi AA, Noiseux N, Kong D, et al. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat Med*, 2003, 9:1195-1201.
- [6] Calabro P, Yeh ET. The pleiotropic effects of statins. *Curr Opin Cardiol*, 2005, 20: 541-546.

- [7] Endres M. Statins: potential new indications in inflammatory conditions. *Atheroscler Suppl*, 2006, 7: 31-35.
- [8] Hong MK, Lee CW, Kim YH, et al. Usefulness of follow-up low-density lipoprotein cholesterol level as an independent predictor of changes of coronary atherosclerotic plaque size as determined by intravascular ultrasound analysis after statin (atorvastatin or simvastatin) therapy. *Am J Cardiol*, 2006, 98: 866-870.
- [9] Chen MS, Xu FP, Wang YZ, et al. Statins initiated after hypertrophy inhibit oxidative stress and prevent heart failure in rats with aortic stenosis. *J Mol Cell Cardiol*, 2004, 37: 889-896.
- [10] Zhu WQ, Chen JH, Cong XF, et al. Hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 2006, 24:416-425.
- [11] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, 284:143-147.
- [12] Scarabelli TM, Stephanou A, Pasini E, et al. Minocycline inhibits caspase activation and reactivation, increases the ratio of XIAP to smac/DIABLO, and reduces the mitochondrial leakage of cytochrome C and smac/DIABLO. *J Am Coll Cardiol*, 2004, 43: 865-874.