

SDF-1 α 通过 PI3K/Akt 和 ERK1/2 信号通路抑制 缺氧和无血清诱导的骨髓基质干细胞凋亡

尹琪[#] 金培峰[#] 李玲玲¹ 林晓铭 池 闯 刘 瑜 孙成超^{*}

(温州医学院第一附属医院心胸外科, 温州 325000; ¹温州医学院微生物与免疫教研室, 温州 325000)

摘要 骨髓基质干细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)被认为是能够使梗死心肌再生并恢复受损心功能的有前途的细胞源之一。但是其在梗死部位的低存活率极大地限制了它的临床应用前景。有报道显示基质细胞源性因子-1 α (stromal cell derived factor-1 α , SDF-1 α)能够抑制如内皮前体细胞、胚胎干细胞等的凋亡。但是目前对于 SDF-1 α 能否抑制缺氧和无血清诱导的骨髓基质干细胞的凋亡及其具体机制尚不清楚。本研究中, 我们证实, SDF-1 α 在 0.5~2.0 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度时能够通过线粒体通路有效地抑制缺氧和无血清诱导的干细胞的凋亡。SDF-1 α 抑制线粒体膜电位的升高、抑制细胞色素 *c* 从线粒体释放到胞浆, 以及降低 caspase 3 的活性。我们进一步的研究发现 PI3K 抑制剂 Wortmannin 和 ERK1/2 抑制剂 U0126 能抵消 SDF-1 α 对于线粒体通路的作用。结果显示 SDF-1 α 抑制缺氧和无血清诱导的干细胞凋亡是通过 PI3K/Akt 和 ERK1/2 信号通路实现的。同时也提示 SDF-1 α 所介导的这种抗凋亡作用对于细胞移植也将是有益的。

关键词 基质细胞源性因子-1 α ; 凋亡; 骨髓基质干细胞; 信号通路

心力衰竭在许多国家已经成为致死的首要原因之一, 其中心肌梗死占了关键比重。常规治疗手段比如药物治疗(包括 β 阻滞剂、血管紧张素转换酶抑制剂等等)和有创疗法(包括 PTCA、CABG 等等)都不能够使得梗死的心肌再生。近年来, 骨髓基质干细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)移植被认为是改善心功能的有前途的手段^[1]。但同时干细胞移植也面临着诸如移植细胞低存活率的问题, 而导致干细胞发生凋亡的梗死区缺血微环境是发生该问题的关键因素^[2]。

基质细胞源性因子-1 α (stromal cell derived factor-1 α , SDF-1 α)是一种结合于 G 蛋白偶连的 CXCR4 的细胞因子, 它在心梗后立即升高且一直持续 1~2 周才下降。进一步的研究显示它能趋化来自骨髓和外周血的干细胞到心梗区、促进外周血 CD34⁺ 细胞增殖、提高缺血诱导的血管新生、保护 CD34⁺ 细胞、内皮前体细胞以及小鼠胚胎干细胞免于凋亡等^[3~7]。然而其对 BMSCs 的抗凋亡作用的报道却非常少。Kortesis 等^[8]发现高表达 SDF-1 α 的干细胞能在体外抑制由 IL-4 诱导的凋亡。Zhang 等^[9]证实转染了 SDF-1 α 基因的干细胞也抑制了缺氧所诱导的凋亡。但是用 SDF-1 α 蛋白能否在体外抑制缺氧和无血清诱导的干细胞的凋亡尚不清楚, 同时其抗凋亡的具

体机制尚待明了。

在本研究中, 我们证实 SDF-1 α 能剂量依赖性地抑制干细胞的凋亡, 同时进一步地证实这个过程是通过 PI3K/Akt 和 ERK1/2 信号通路实现的。

1 材料与方法

1.1 动物

Sprague Dawley (SD)大鼠由北京大学医学部实验动物中心提供, 体重 60 g, 所有研究都经阜外心血管病医院实验动物委员会批准。

1.2 主要试剂

IMDM、胎牛血清购自 Gibco 公司; LPA、胰蛋白酶、Hoechst 33342 购自 Sigma 公司; 细胞缺氧培养盒、缺氧催化剂购自法国 BioMérieux 公司; Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit)购自北京宝赛生物公司; SDF-1 α 购自 R&D 公司。

1.3 大鼠 BMSCs 的分离培养和凋亡模型的建立

1.3.1 BMSCs 的分离 无菌条件下剥离大鼠股骨

收稿日期: 2010-01-04 接受日期: 2010-03-12

温州市科技局对外合作项目(No.h20090019)和国家十一五计划项目(No.2006BAI01A09)资助

[#]共同第一作者

^{*}通讯作者。Tel: 0577-88069555, E-mail: suncc6@163.com

和胫骨,以全骨髓法分离并培养 BMSCs [10]。待第一代细胞生长达到 70%~80% 汇合时可用于实验。

1.3.2 细胞凋亡模型的建立和 SDF-1 α 预处理 将正常培养的细胞去掉培养基,经 PBS 冲洗后加无血清 IMDM 及缺氧处理(置于密闭缺氧罐中,内置耗氧剂),37 °C、5% CO₂ 温育 6 h [11]。正常对照组为完全培养基(IMDM+15% FBS)正常培养,在 SDF-1 α 预处理中,分别将不同浓度 SDF-1 α (0.5、1.0、2.0 μ g/ml) 预处理 1 h 后再进行缺氧无血清处理 6 h。在信号通路研究中,分别在 SDF-1 α 预处理前 0.5 h 各组分别添加 PI3K/AKT 阻断剂 Wortmannin (200 nmol/L)、SDF-1 受体 CXCR4 阻滞剂 AMD3100 或 ERK1/2 阻断剂 U0126 (10 μ mol/L)。

1.4 形态学检测(相差和荧光显微镜)

将进行缺氧和无血清处理后的细胞用 PBS 洗 1 次,然后加入含 Hoechst 33342 的无血清 DMEM 培养基, Hoechst 33342 终浓度为 0.1 g/L,室温避光反应 10 min。用荧光显微镜观察,紫外光激发,观察凋亡细胞并拍片。

1.5 细胞凋亡和膜电位检测

取经缺氧无血清处理的 7×10^5 个细胞,用 0.125% 胰蛋白酶 /0.04% EDTA 消化胞后,800 r/min,4 °C 离心 4 min 后,弃掉上清液;细胞用 PBS 冲洗 1 次后悬浮于 200 μ l 结合缓冲液。然后加入 10 μ l 浓度为 20 μ g/ml 的异硫氰酸荧光素标记的膜联蛋白 V (annexin-V-FITC),轻轻混匀后,4 °C 避光反应 15 min。加入 5 μ l 浓度为 50 μ g/ml 的 PI、300 μ l 结合缓冲液,轻轻混匀,用流式细胞仪检测活细胞、早期和中晚期凋亡细胞及坏死细胞所占的比例。而在细胞线粒体跨膜电位($\Delta\Psi_m$)的检测中,用 10 nmol/L 的罗丹明 123

在 37 °C 中反应 30 min,然后利用流式细胞仪检测线粒体膜电位水平。

1.6 Western 印迹检测蛋白的表达

各组细胞经处理后,收集细胞,提取蛋白质,线粒体中的蛋白则采用线粒体分离试剂盒分离后再提取。以考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白(每孔上样品量为 50 μ g),然后电转移蛋白至硝酸纤维素膜。经脱脂奶粉封闭后与相应的一抗(caspase-3、细胞色素 c、Akt 和 ERK1/2) 4 °C 温育过夜。完成后漂洗并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,经过显影、定影得到目的条带。

1.7 Caspase-3 活性检测

将凋亡预处理的细胞收集,提取蛋白质,以考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度。根据 caspase-3 酶活性检测试剂盒操作,使用酶标仪 405 nm 波长测 caspase-3 活力。

1.8 统计学处理

结果中的数据以 mean \pm SEM 表示。组间的差异采用 one-way ANOVA 检验。数据经 SPSS 11.0 统计分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 SDF-1 α 抑制了缺氧无血清诱导的 BMSCs 凋亡

缺氧无血清诱导 6 h 后干细胞发生凋亡,表现为核固缩、染色质浓集、细胞变小。如相差和荧光图象所示(图 1),SDF-1 α (2.0 μ g/ml) 显著地减少了凋亡细胞的数量。为了进一步对凋亡进行量化,我们

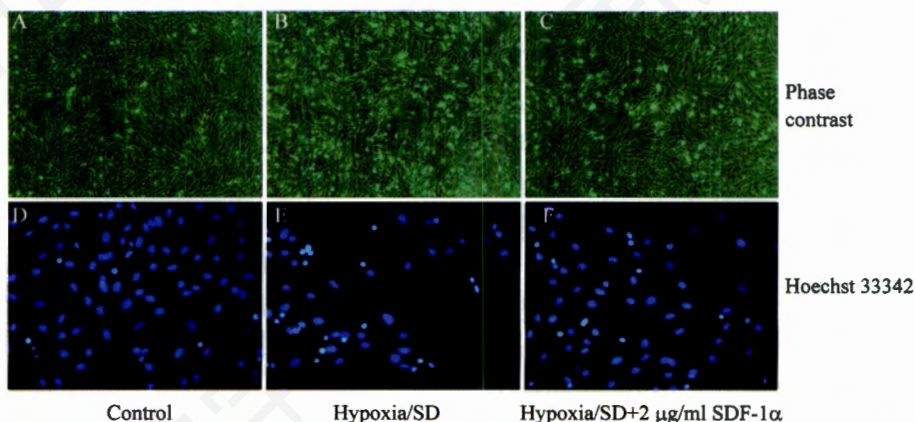


Fig.1 SDF-1 α protects bone marrow stromal cells (BMSCs) against hypoxia and serum deprivation (hypoxia/SD)-induced apoptosis A-C: anti-apoptotic effect is presented at the concentration of 2 μ g/ml SDF-1 α by morphological changes using phase-contrast microscope; D-F: apoptotic cell death was detected by Hoechst 33342 for staining chromosomal condensation (40 \times).

进行了流式细胞记数。早期凋亡为 Annexin V-FITC 阳性, 而中晚期凋亡则是 PI 阳性。图 2 显示 SDF-1 α 抗干细胞凋亡作用具有浓度依赖性, SDF-1 α 明显地

降低早期凋亡, 但是对于中晚期凋亡以及坏死则影响不大。0.5 $\mu\text{g/ml}$ 以下则未见凋亡保护作用。与此同时, 高度特异性的 SDF-1 α 受体 CXCR4 阻滞剂

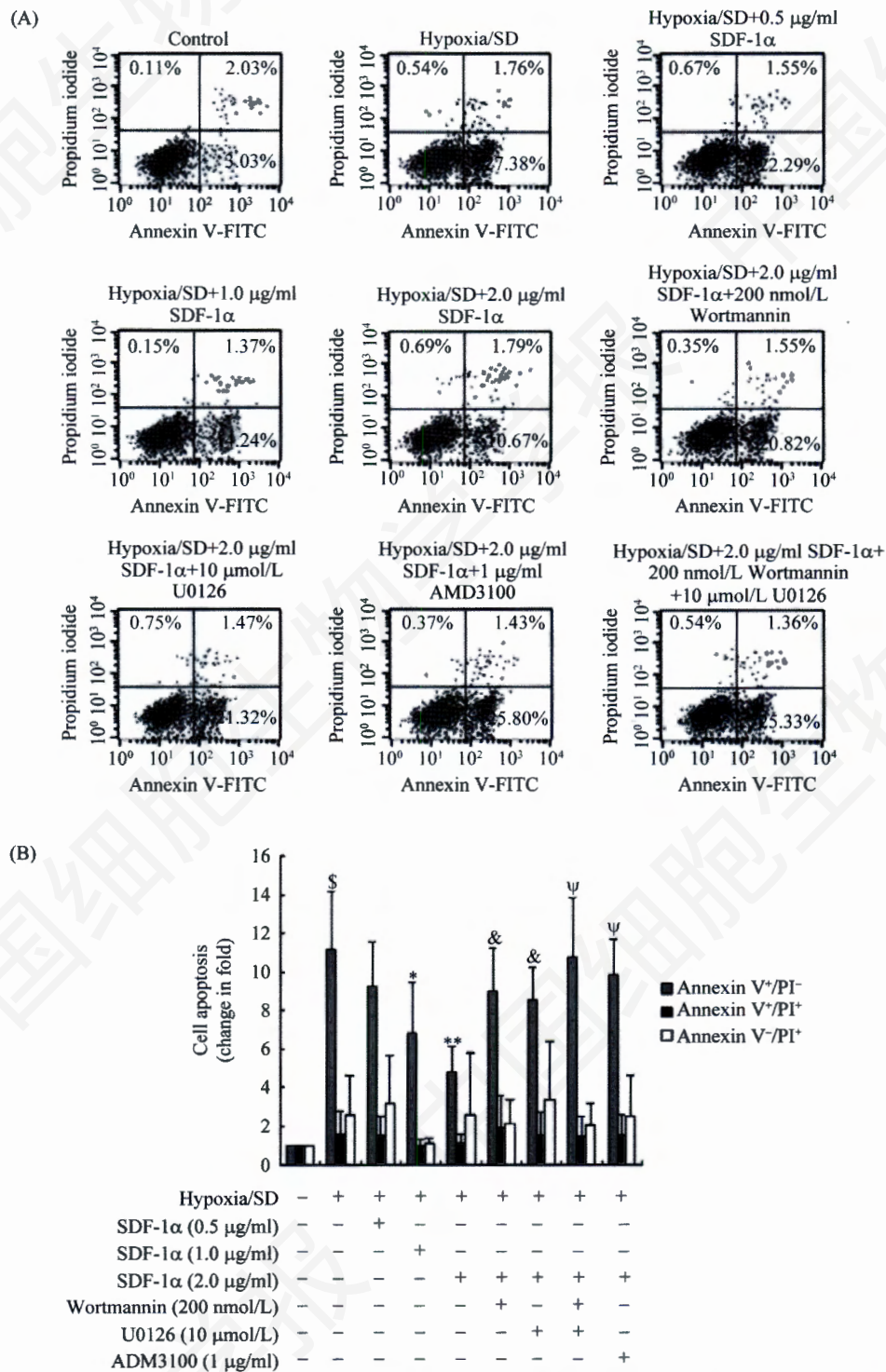


Fig.2 Apoptosis is quantified by FACS analysis after staining with annexin V and propidine iodine (PI)

A: FACS analysis after staining with annexin V and PI; B: statistical analysis of cell apoptosis in A. Annexin V⁺/PI⁻: cells in the early apoptotic process; Annexin V⁺/PI⁺: cells in the late apoptosis process; Annexin V⁻/PI⁺: the necrotic cells. $^{\$}P<0.01$ vs control; $^{*}P<0.05$ vs hypoxia/SD group; $^{**}P<0.01$ vs hypoxia/SD group; $^{\&}P<0.05$ vs hypoxia/SD plus 2 $\mu\text{g/ml}$ SDF-1 α group; $^{\Psi}P<0.01$ vs hypoxia/SD plus 2 $\mu\text{g/ml}$ SDF-1 α group.

AMD3100 几乎完全阻断了 SDF-1 α 介导的抗凋亡作用。阻断 PI3K/Akt 和 ERK1/2 通路则部分抑制 SDF-1 α 介导的抗凋亡作用,提示两条通路在该过程中的作用。而同时阻断两条通路则完全抑制了这种作用。

2.2 SDF-1 α 激活了 PI3K/Akt 通路

为了研究 PI3K/Akt 通路是否参与了 SDF-1 α 介导的抗凋亡作用,我们用 PI3K 的特异性抑制剂 Wortmannin 在缺氧无血清诱导前预处理干细胞。图 2 结果显示,相较于 SDF-1 α 组, Wortmannin 预处理后早期凋亡增加但并没有达到凋亡组的水平,提示该通路参与了凋亡机制。接下来我们用 Western 印迹来验证 Akt 是否被 SDF-1 α 所激活。如图 3 所示,缺氧无血清抑制了磷酸化 Akt 的表达,而 SDF-1 α 却增加了磷酸化 Akt 的表达。Wortmannin 几乎完全阻断了 Akt 的磷酸化而 ERK1/2 阻滞剂 U0126 对 Akt 的磷酸化没有影响。Western 印迹的变化与流式结果相一致,表明 SDF-1 α 激活了 PI3K/Akt 通路。

2.3 SDF-1 α 促进 ERK1/2 的磷酸化

接下来我们进一步验证 ERK1/2 通路是否与 SDF-1 α 介导的抗凋亡作用相关。图 2 结果显示 ERK1/2 的

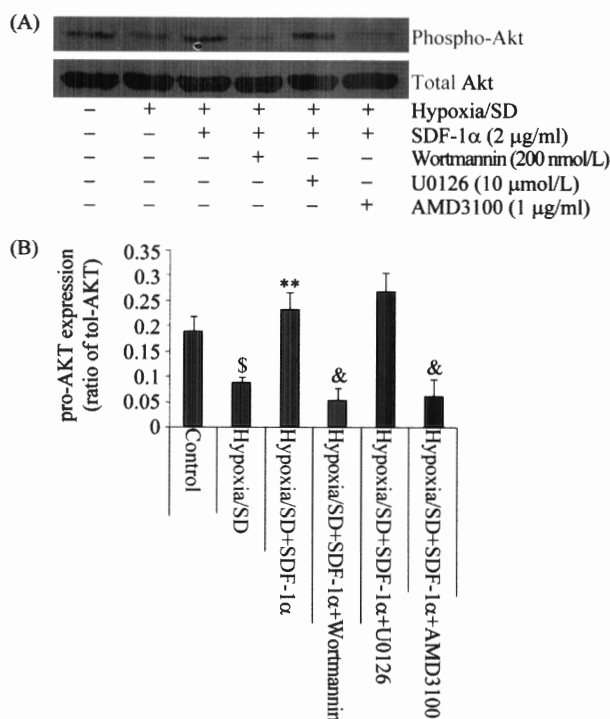


Fig.3 SDF-1 α prevents BMSCs from hypoxia/SD-induced apoptosis by the activation of Akt

A: western blot result of SDF-1 α 's influence on PI3K/Akt pathway; B: statistical result of Western blot. $^{\$}P<0.05$ vs control; $^{**}P<0.01$ vs hypoxia/SD group; $^{\&}P<0.01$ vs hypoxia/SD plus 2 μ g/ml SDF-1 α group.

特异性阻断剂 U0126 预处理后早期凋亡细胞数量增加但未到凋亡组的数量,与 Wortmannin 组一致。Western 印迹(图 4A)显示 U0126 阻断了 ERK1/2 的表达。图 4B 显示无血清处理后磷酸化 ERK1/2 的水平不变或者降低了一些,而缺氧无血清处理后表达却大大升高。而在无血清的情况下 SDF-1 α 能增加磷酸化 ERK1/2 的水平,但是增加的程度却没有单纯缺氧无血清组明显。

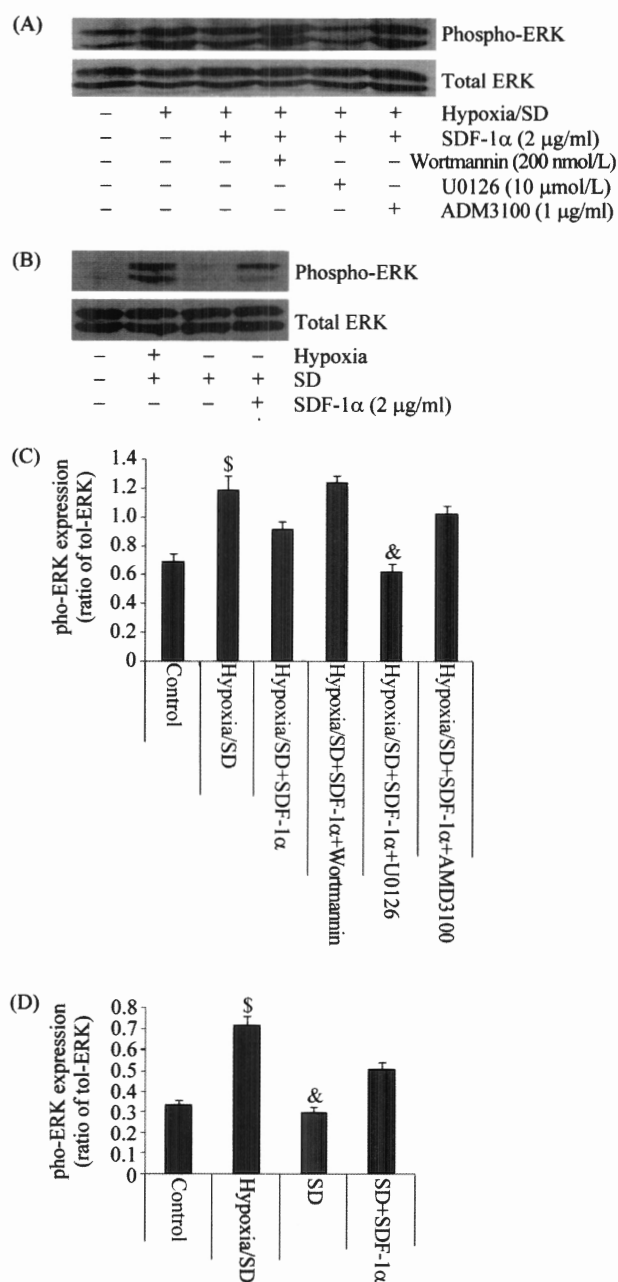


Fig.4 SDF-1 α prevents BMSCs from hypoxia/SD-induced apoptosis by the activation of ERK1/2

A, C: Western blot result of SDF-1 α 's influence on ERK1/2 pathway and statistical result of Western blot. $^{\$}P<0.01$ vs control; $^{\&}P=0.02$ vs hypoxia/SD plus 2 μ g/ml SDF-1 α group; B, D: hypoxia and/or SD's influence on the expression of ERK1/2. $^{\$}P<0.01$ vs control; $^{\&}P<0.01$ vs SD plus 2 μ g/ml SDF-1 α group.

2.4 SDF-1 α 通过 PI3K/Akt 和 ERK1/2 通路保护线粒体功能

线粒体膜电位的下降发生在细胞凋亡的早期。我们对罗丹明 123 标记的细胞进行流式计数发现 SDF-1 α (2 μ g/ml) 有效地阻止了线粒体膜电位的下降。此外,用 Wortmannin 和 U0126 则分别抵消了 SDF-1 α 的这种作用(图 5)。细胞色素 *c* 从线粒体释放到胞浆是线粒体通路介导凋亡和触发 caspase-3 活性的重要机制。我们从细胞中分离出上述的两种组份(细胞浆和线粒体中的细胞色素 *c*)进行 Western 印迹分析(图 5)发现, SDF-1 α (2 μ g/ml) 抑制了细胞色素 *c* 从线粒体释放到胞浆, 而 Wortmannin 和 U0126 则抵消了这种作用。这些数据显示, 线粒体通路作为凋亡通路的下游参与了 SDF-1 α 介导的抗凋亡作用, 同时受到上游的 PI3K/Akt 和 ERK1/2 通路的调节。

2.5 SDF-1 α 通过 PI3K/Akt 和 ERK1/2 通路抑制 caspase-3 活性

Caspase-3 是凋亡的执行人, 部分或者全部地调节着许多重要蛋白比如 PARP 的蛋白水解。我们用 caspase-3 比色试剂盒来检测 caspase-3 的活性。图 6 显示 SDF-1 α (2 μ g/ml) 明显地减少了其活性, 而分别阻断 PI3K/Akt 和 ERK1/2 两条通路后又导致其活性的升高, 提示 SDF-1 α 是通过这两条通路来抑制 caspase-3 活性的。

3 讨论

骨髓基质干细胞是心梗后再生心肌和恢复心功能的有前景的细胞源。但移植后细胞的低生存率影响了治疗效果。Toma 等^[12]和 Gojo 等^[13]报道在移植后 4 天或者 1 周后, 仅仅有 0.25%~0.44% 的存活细胞被发现。对于这种大量细胞死亡现象的解释有很多种如机械张力、炎症反应、基质与细胞之间的存活信号的缺失、氧供不足、缺血心肌产生的促凋亡或者细胞毒因子、缺血再灌注等, 这其中缺血微环境尤为重要^[2,14,15]。Zhu 等^[11]已经研究证实无血清和缺氧是缺血环境(比如心肌缺血时)的主要构成, 即缺氧和无血清能够模拟恶劣的缺血微环境并成功地诱导干细胞的凋亡。并且缺氧和无血清能在 6 h 内诱导出明显的早期凋亡, 而无血清或者缺氧单独作用在某些文献里往往需要 24~48 h 才能诱导出期望的凋亡效果。这是缺氧和无血清的优势所在, 所以在本文中使用该模型来进行实验。

我们的研究首次证实了 SDF-1 α 在体外能保护缺氧和无血清诱导的干细胞凋亡。这与 Kortesidis 等^[8]

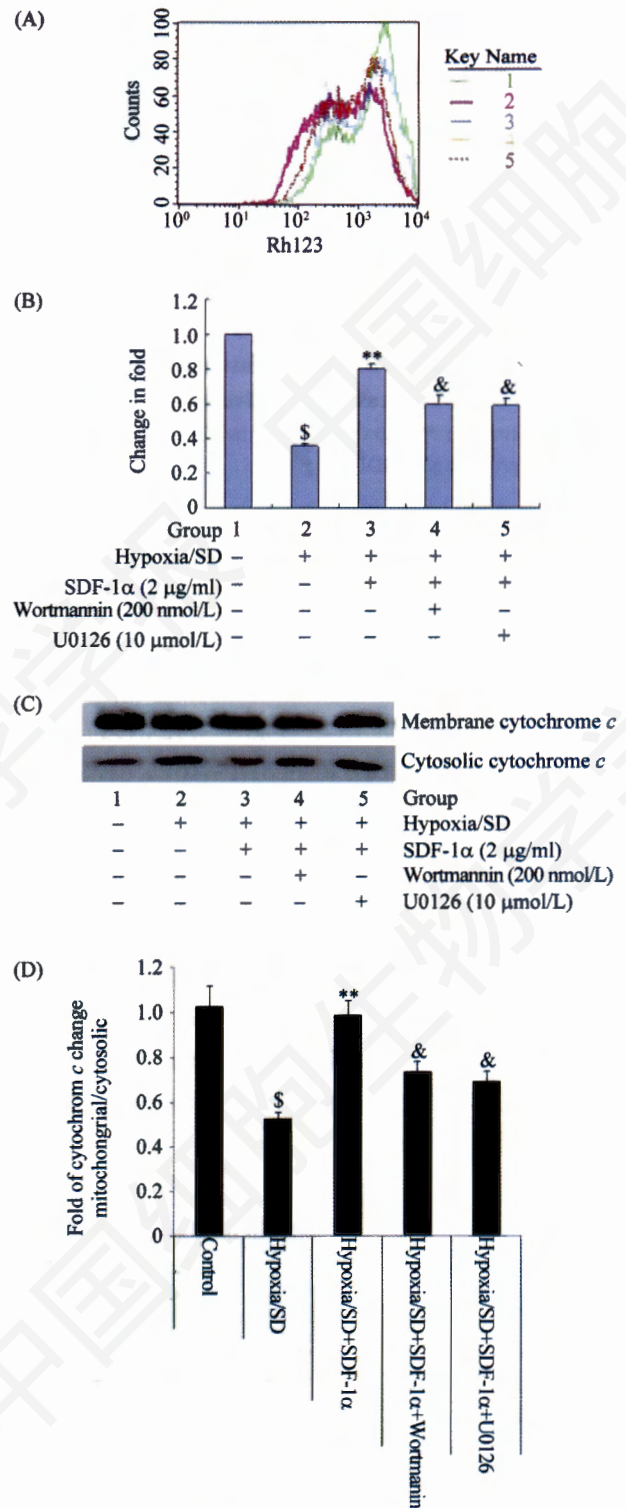


Fig.5 SDF-1 α inhibits hypoxia/SD-induced loss of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and cytochrome *c* release

A, B: SDF-1 α inhibits loss of $\Delta\Psi_m$ detected by flow cytometry of Rhodamine 123-stained cells; C, D: Western blot of cytosolic and mitochondrial fractions of BMSCs shows a clear reduction of cytochrome *c* release with SDF-1 α treatment before hypoxia/SD. [§]*P*<0.01 vs control (group 1); ^{**}*P*<0.01 vs hypoxia/SD group (group 2); [&]*P*<0.05 vs hypoxia/SD plus 2 μ g/ml SDF-1 α group (group 3).

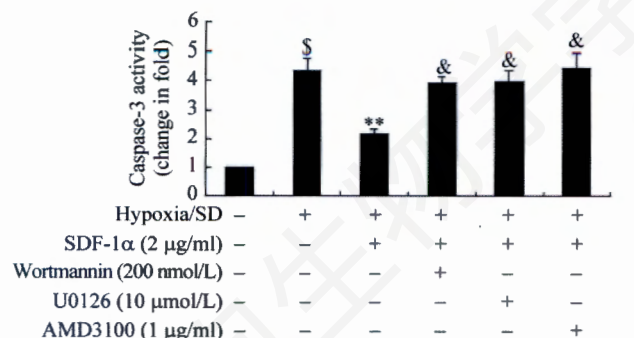


Fig.6 SDF-1 α protects BMSCs against hypoxia/SD-induced apoptosis by inhibiting caspase-3 activation

[§] $P < 0.01$ vs control; ^{**} $P < 0.01$ vs hypoxia/SD group; [&] $P < 0.01$ vs hypoxia/SD plus 2 $\mu\text{g/ml}$ SDF-1 α group.

和 Zhang 等^[9]报道的高表达 SDF-1 α 的干细胞凋亡减少相一致。但是我们使用的是一个相对而言比较高的浓度(0.5~2.0 $\mu\text{g/ml}$), Zhang 等报道的文章中高表达 SDF-1 α 的干细胞分泌的 SDF-1 α 浓度最高才 500 pg/ml 左右。我们推断这可能主要是因为高表达 SDF-1 α 的干细胞自我分泌的 SDF-1 α 以一种旁分泌的形式起作用, 这种情况下的细胞因子相比于外源性给予的蛋白更能被细胞所吸收利用。其次使用的不同的诱导凋亡的模型也是产生浓度上差别的因素。

有研究显示 SDF-1 α 介导的趋化、细胞增殖等需要 PI3K/Akt 信号通路的活化^[16-18]。我们的研究发现, PI3K/Akt 信号通路在 SDF-1 α 介导的抗凋亡作用中受到激活。这个结果也与 Lataillade 等^[19]报道的 SDF-1 α 通过 PI3K 通路保护了外周血 CD34⁺ 细胞的凋亡的结果相一致。

ERK1/2 也是一条促存活通路^[20]。有些报道显示 SDF-1 α 能通过 ERK1/2 的激活增加人肺癌细胞的移动、提高内皮黏附和迁移^[21]。我们发现, ERK 抑制剂 U0126 能特异地阻断 ERK1/2 的磷酸化, 进一步通过流式实验发现 U0126 能抑制 SDF-1 α 介导的对干细胞的保护作用, 这提示 ERK1/2 在这个过程中起抗凋亡作用。而 Western 印迹结果显示 BMSCs 受到缺氧和无血清的联合刺激后, ERK1/2 的磷酸化水平显著上升, 提示 ERK1/2 信号通路参与了细胞对外界刺激的应答调节。我们推断有两种可能的机制: ① ERK1/2 参与了缺氧无血清诱导的促 BMSCs 凋亡通路; ② ERK1/2 参与了促凋亡之外的其它应激性的病理生理反应^[20]。如果 ERK1/2 的磷酸化参与了促 BMSCs 凋亡通路, 那么, 加入 ERK 抑制剂 U0126 后, 此促凋亡通路被阻断, 则 BMSCs 凋亡率应该降低; 但我们的流式实验却发现, 同时加入 U0126 和 SDF-1 α 后, SDF-1 α 的抗缺氧无血清诱导的 MSCs 凋亡作用却被阻断了, 从这一结果我们可以推断在本实验中 ERK1/2 没有参与促 BMSCs 凋亡作用, 从而推翻可能性①。所以, 在本实验中, BMSCs 受到缺氧和无血清的联合刺激后, ERK1/2 的磷酸化水平升高很可能是因为其参与了细胞对外界刺激的应答; 而 SDF-1 α 又能激活 ERK1/2 通路, 使其参与抗凋亡作用中, 因此对于 ERK1/2 的磷酸化而言, 缺氧和 SDF-1 α 可能是存在协同作用的。

另外, 有文献报道 NF- κ B 和 PKC 通路在 SDF-1 α 介导的细胞生长、迁移和转录激活中起作用, 这提示这些通路在某种条件下也能调节细胞凋亡^[16,17]。

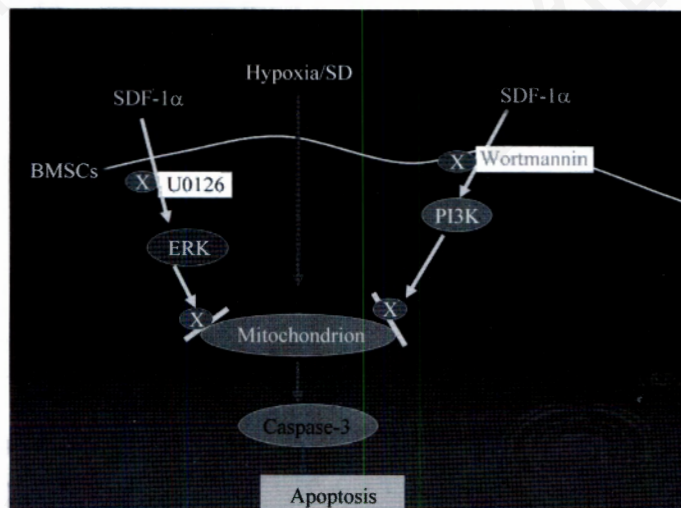


Fig.7 SDF-1 α inhibits hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis in BMSCs through PI3K/Akt and ERK1/2 signaling pathways

未来的研究可能会集中于这些通路来进一步研究 SDF-1 α 介导的干细胞抗凋亡的机制。

总之, 我们的实验阐明了 SDF-1 α 能有效地保护缺氧和无血清诱导的干细胞的凋亡。同时也证实, 这种抗凋亡作用是 PI3K/Akt 和 ERK1/2 通路介导的通过线粒体通路下行最后减少 caspase-3 酶活性来实现的(如图 7 所示)。本研究阐明的机制对于干细胞结合基因(如 SDF-1 α)治疗缺血性心脏病将起到很好的帮助作用。

参考文献(References)

- 1 Tomita S, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Kim EJ, Sakai T, *et al.* Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 1999; 100(19 Suppl): II247-56.
- 2 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: 687-97.
- 3 Abbott JD, Huang Y, Liu D, Hickey R, Krause DS, Giordano FJ. Stromal cell-derived factor-1 α plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. *Circulation* 2004; 110(21): 3300-5.
- 4 Aiuti A, Webb IJ, Bleul C, Springer T, Gutierrez-Ramos JC. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34⁺ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34⁺ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med* 1997; 185(1): 111-20.
- 5 Guo Y, Hangoc G, Bian H, Pelus LM, Broxmeyer HE. SDF-1/CXCL12 enhances survival and chemotaxis of murine embryonic stem cells and production of primitive and definitive hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells* 2005; 23(9): 1324-32.
- 6 Ma J, Ge J, Zhang S, Sun A, Shen J, Chen L, *et al.* Time course of myocardial stromal cell-derived factor 1 expression and beneficial effects of intravenously administered bone marrow stem cells in rats with experimental myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 2005; 100(3): 217-23.
- 7 Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, Kawamoto A, Silver M, Murasawa S, *et al.* Stromal cell-derived factor-1 effects on *ex vivo* expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation* 2003; 107(9): 1322-8.
- 8 Kortessidis A, Zannettino A, Isenmann S, Shi S, Lapidot T, Gronthos S. Stromal-derived factor-1 promotes the growth, survival, and development of human bone marrow stromal stem cells. *Blood* 2005; 105(10): 3793-801.
- 9 Zhang M, Mal N, Kiedrowski M, Chacko M, Askari AT, Popovic ZB, *et al.* SDF-1 expression by mesenchymal stem cells results in trophic support of cardiac myocytes after myocardial infarction. *FASEB J* 2007; 21(12): 3197-207.
- 10 Yang LY, Huang TH, Ma L. Bone marrow stromal cells express neural phenotypes *in vitro* and migrate in brain after transplantation *in vivo*. *Biomed Environ Sci* 2006; 19(5): 329-35.
- 11 Zhu W, Chen J, Cong X, Hu S, Chen X. Hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006; 24(2): 416-25.
- 12 Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002; 105(1): 93-8.
- 13 Gojo S, Gojo N, Takeda Y, Mori T, Abe H, Kyo S, *et al.* *In vivo* cardiovascularogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 2003; 288(1): 51-9.
- 14 Mangi AA, Noiseux N, Kong D, He H, Rezvani M, Ingwall JS, *et al.* Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat Med* 2003; 9(9): 1195-201.
- 15 Zhang M, Methot D, Poppa V, Fujio Y, Walsh K, Murry CE. Cardiomyocyte grafting for cardiac repair: graft cell death and anti-death strategies. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33(5): 907-21.
- 16 Ganju RK, Brubaker SA, Meyer J, Dutt P, Yang Y, Qin S, *et al.* The α -chemokine, stromal cell-derived factor-1 α , binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways. *J Biol Chem* 1998; 273(36): 23169-75.
- 17 Schober A, Karshovska E, Zerneck A, Weber C. SDF-1 α -mediated tissue repair by stem cells: a promising tool in cardiovascular medicine? *Trends Cardiovasc Med* 2006; 16(4): 103-8.
- 18 Wang JF, Park IW, Groopman JE. Stromal cell-derived factor-1 α stimulates tyrosine phosphorylation of multiple focal adhesion proteins and induces migration of hematopoietic progenitor cells: roles of phosphoinositide-3 kinase and protein kinase C. *Blood* 2000; 95(8): 2505-13.
- 19 Lataillade JJ, Clay D, Bourin P, Herodin F, Dupuy C, Jasmin C, *et al.* Stromal cell-derived factor 1 regulates primitive hematopoiesis by suppressing apoptosis and by promoting G₀/G₁ transition in CD34⁺ cells: evidence for an autocrine/paracrine mechanism. *Blood* 2002; 99(4): 1117-29.
- 20 Gonzalez-Zulueta M, Feldman AB, Klesse LJ, Kalb RG, Dillman JF, Parada LF, *et al.* Requirement for nitric oxide activation of p21(ras)/extracellular regulated kinase in neuronal ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(1): 436-41.
- 21 Huang YC, Hsiao YC, Chen YJ, Wei YY, Lai TH, Tang CH. Stromal cell-derived factor-1 enhances motility and integrin up-regulation through CXCR4, ERK and NF- κ B-dependent pathway in human lung cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2007; 74(12): 1702-12.

Hypoxia and Serum Deprivation-induced Apoptosis in Bone Marrow Stromal Cells is Inhibited by SDF-1 α through PI3K/Akt and ERK1/2 Signaling Pathways

Qi Yin[#], Pei-Feng Jin[#], Ling-Ling Li¹, Xiao-Ming Lin, Chuang Chi, Yu Liu, Cheng-Chao Sun*

(Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China; ¹Department of Microbiology & Immunology, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China)

Abstract Bone marrow stromal cells (BMSCs) have been demonstrated to be one of the most promising cell sources to regenerate infarcted myocardium and restore impaired cardiac function. However, poor viability of BMSCs in infarcted myocardium apparently attenuated its clinical application potential. It has been reported that stromal cell derived factor-1 α (SDF-1 α) protected several cell types such as endothelial progenitor cells and embryonic stem cells from apoptosis. But whether SDF-1 α protein has the same protective effects on BMSCs under conditions of hypoxia and serum deprivation (hypoxia/SD) *in vitro* and its mechanism is still unknown. In our study, we verified that SDF-1 α (0.50–2.0 μ g/ml) conspicuously inhibited the apoptosis of BMSCs, which was induced by hypoxia/SD, through mitochondrial pathway. The loss of mitochondrial membrane potential and cytochrome *c* release from mitochondria to cytosol were significantly inhibited, and caspase-3 activity also detected to be declined by SDF-1 α . Furthermore, we found that the effect of SDF-1 α on mitochondrial pathway was evidently neutralized by using PI3K inhibitor Wortmannin and ERK1/2 inhibitor U0126. Our observations suggest that SDF-1 α inhibits apoptosis induced with hypoxia/SD in BMSCs through PI3K/Akt and ERK1/2 signaling pathways. And these data also imply that the anti-apoptotic effect mediated by SDF-1 α may enhance cell survival in cell transplantation.

Key words stromal cell derived factor-1 α (SDF-1 α); apoptosis; bone marrow stromal cells (BMSCs); signaling pathways

Received: January 4, 2010 Accepted: March 12, 2010

This work was supported by the Natural Science Foundation of Wenzhou City (No.h20090019) and Key Projects in the National Science & Technology Pillar Program during the Eleventh Five-year Plan Period of China (No.2006BAI01A09)

[#] These authors contribute equally to this work.

*Corresponding author. Tel: 86-577-88069555, E-mail: suncc6@163.com