

胍丁胺通过AMPK途径诱导间充质干细胞的凋亡

姚孟维¹ 任婷婷^{1,2} 何骁¹ 陈卓¹ 杨奕¹ 邢伟¹ 郭韡¹ 敖罗全¹ 李战¹ 梁华平¹ 徐祥^{1*}

(¹陆军军医大学第三附属医院野战外科研究所, 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室, 重庆 400042;

²青岛大学医学院, 组织学与胚胎学教研室, 青岛 266000)

摘要 间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)具有强大的组织再生修复及免疫调节功能, 广泛应用于损伤性和免疫相关性疾病的治疗, 但其过早凋亡会降低临床疗效, 且机制不明。研究发现, 胍丁胺(agmatine, AGM)可通过抑制一氧化氮(nitric oxide, NO)生成发挥抗炎功能, 对脓毒症小鼠具有保护效应。移植MSCs治疗脓毒症也是一种有效的治疗方式, 但二者是否存在相互作用及AGM是否影响MSCs生存却未见报道。该研究旨在探讨AGM对MSCs生存的影响及其分子机制。研究MSCs之前, 该研究通过检测细胞表面marker(CD29、CD34、CD44、CD45、CD90和CD105)及三系分化(成脂、成骨、成软骨)对其进行了鉴定。为了深入探究AGM对MSCs的作用, 使用流式细胞术检测AGM处理后MSCs的凋亡率(Annexin V)以及Western blot检测经AGM处理后MSCs的凋亡相关信号通路蛋白p-AMPK、p-mTOR、p-S6K1、Cl-Caspase3的表达水平。之后进一步添加AMPK siRNA检测AGM诱导MSCs凋亡的分子机制。结果显示, AGM在体外以剂量依赖性的方式, 通过抑制mTOR信号通路诱导AMP活化蛋白激酶(AMPK)活化, 导致凋亡相关蛋白表达上调, 从而介导MSCs凋亡。而AMPK siRNA处理能明显恢复mTOR通路, 并抑制AMPK活化, 使凋亡相关蛋白表达降低, 进而减弱AGM诱导的凋亡效应。该文揭示了AGM可通过AMPK途径诱导MSCs的凋亡。

关键词 胍丁胺; 间充质干细胞; AMPK; 凋亡

Agmatine Induces Apoptosis of MSCs Through the AMPK Pathway

YAO Mengwei¹, REN Tingting^{1,2}, HE Xiao¹, CHEN Zhuo¹, YANG Yi¹, XING Wei¹, GUO Wei¹, AO Luoquan¹, LI Zhan¹, LIANG Huaping¹, XU Xiang^{1*}

(¹State Key Laboratory of Trauma, Burn and Combined Injury, Institute of Surgery Research, Chongqing 400042, China;

²Department of Histology and Embryology, Qingdao University Medical College, Qingdao 266000, China)

Abstract Mesenchymal stem cells (MSCs) are widely used in the treatment of injury and immune-related diseases because of their strong capacities of tissue regeneration and immunomodulation. However, the clinical efficacy of MSCs transplantation is limited by cell apoptosis and the mechanism is still unclear. It has been reported that agmatine (AGM) plays a protective role in septic mice through its anti-inflammatory function which inhibiting the production of nitric oxide (NO). Besides, MSCs transplantation is also an effective treatment for sepsis. However, whether AGM affects the survival of MSCs has not been reported, this study aims to investigate the effects of AGM on the survival of MSCs and its molecular mechanisms. Cell surface markers (CD29, CD34, CD44, CD45,

收稿日期: 2019-02-21 接受日期: 2019-06-19

国家自然科学基金(批准号: 81571913)和重庆市基础与前沿研究计划一般项目(批准号: cstc2015jcyjA10078)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68757412, E-mail: xiangxu@yml.com

Received: February 21, 2019 Accepted: June 19, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81571913) and the Foundational and Cutting-Edge Research Plan of Chongqing: General Projects (Grant No.csts2015jcyjA10078)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68757412, E-mail: xiangxu@yml.com

网络出版时间: 2019-09-30 12:10:45

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.q.20190930.1100.016.html>

CD90, CD105) and three lines of differentiation (adipogenic, osteogenesis and cartilage) had been identified before research. After treatment with AGM, MSCs' apoptosis and apoptosis-related signaling pathway markers were measured by flow cytometry and Western blot. It was found that AGM induced apoptosis of MSCs through AMP-activated protein kinase (AMPK) activation and mTOR signaling pathway inhibition in a dose-dependent manner which resulting in the up-regulation of apoptosis-related protein expression. However, AMPK siRNA treatment could significantly inhibit the AGM-induced apoptosis of MSCs through reversing mTOR inhibition, AMPK activation and decreasing the expression of apoptosis-related proteins. Our results demonstrated that AGM can induces MSCs apoptosis through the AMPK pathway.

Keywords agmatine; mesenchymal stem cells; AMPK; apoptosis

精氨酸是人体必需氨基酸, 不仅可以在精氨酸酶催化下生成尿素, 也可以在一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)催化下生成一氧化氮(nitric oxide, NO), 还可以经线粒体膜上的精氨酸脱羧酶脱羧生成胍丁胺(agmatine, AGM)。AGM的血液浓度为0.2~0.4 ng/mL, 并在体内广泛分布, 胃中含量最高, 其次是大肠、小肠、主动脉和脾, 但肾、肾上腺、肝、心脏、骨骼肌、输精管和睾丸中含量较低, 具有多种生物学功能^[1]。在中枢神经系统中, AGM能增强阿片类药物的镇痛作用^[2], 此外, AGM还能促进记忆巩固^[3]; 在泌尿系统中, AGM能增强近端肾小管重吸收和单个肾小球滤过率^[4]; 在消化系统中, AGM能增加胃蛋白酶和胃酸分泌, 使黏膜厚度变薄, 导致应激引起的黏膜病变恶化等; 在心血管系统中, AGM能降低心率(heart rate)、平均动脉压(blood pressure)、左室压(cardiac output)、心肌收缩力(myocardial contractility)等^[5]; 并且还有研究表明, AGM能通过抑制NO的生成发挥抗炎效应, 从而提高脓毒症小鼠的生存率^[6]; 此外AGM还能抑制多种细胞的增殖^[7]。

临床上用于治疗脓毒症最有效的方法之一是间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)移植。MSCs是一种多能干细胞, 除了能分化为脂肪细胞、骨细胞和软骨细胞^[8], 还具有显著的免疫调节功能^[9]。炎症反应期间的各种信号分子是MSCs发挥免疫调节能力的必要条件, 并决定了MSCs免疫调节的命运。已有研究揭示, MSCs的免疫调节有着很强的可塑性^[10], 这样的可塑性依赖于免疫细胞与MSCs之间通过细胞因子、趋化因子和一些小分子物质形成的调节网络^[11]。

近来MSCs越来越多的应用于临床疾病的治疗, 包括脓毒症、急性肺损伤以及自身免疫性疾病, 而影响MSCs疗效的主要原因之一是MSCs存活率较

低, 但影响MSCs存活的因素仍不完全清楚。AGM对脓毒症小鼠也具有保护效应, 作为保健品在人群中被广泛应用, 且内源性AGM在体内广泛分布, 同样具有抗炎功能的AGM和MSCs是否存在相互关系以及AGM是否影响MSCs的生存目前仍未见报道。因此本研究探讨了AGM对MSCs生存的影响及其分子机制, 为临床上改善MSCs的疗效提供了可能的依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

人脐带MSCs培养基(ultraculture™ serum-free medium)和人脐带MSCs三系诱导分化试剂盒(试剂盒成分, 成软骨诱导包括: 97 mL基础培养基、100 μL脯氨酸、300 μL抗坏血酸、1 mL TGF-β3、1 mL ITS、1 mL青链霉素双抗、100 μL丙酮酸钠。成骨诱导包括: 175 mL基础培养基、400 μL抗坏血酸、2 mL青链霉素双抗、20 μL地塞米松、20 mL专用血清、2 mL谷氨酰胺、2 mL β-甘油磷酸钠。成脂分化A液包括: 175 mL基础培养基、2 mL青链霉素双抗、200 μL地塞米松、20 mL专用血清、2 mL谷氨酰胺、200 μL罗格列酮、400 μL胰岛素、200 μL IBMX。成脂分化B液包括: 175 mL基础培养基、2 mL青链霉素双抗、20 mL专用血清、2 mL谷氨酰胺、400 μL胰岛素)均购自广东赛业公司; 胰蛋白酶购自美国Gibco公司; 抗人AMPK、p-T¹⁷²AMPK、mTOR、p-S²⁴⁴⁸mTOR、S6K1、p-T³⁸⁹S6K1、Cl-Caspase3和β-actin抗体购自美国CST公司; 抗人CD29、CD34、CD44、CD45、CD90和CD105抗体购自美国BD公司; AGM购自美国Sigma公司; AMPK siRNA(s: CAU UUG UAA UCA AGU UAU ACA, as: UAU AAC UUG AUU ACA AAU GGA)购自瑞博(广州)生物科技有

限公司;流式细胞仪购自艾森生物(杭州)有限公司。

1.2 人脐带MSCs的分离、培养与鉴定

1.2.1 人脐带MSCs的分离培养 从新鲜脐带中剥离出华通氏胶(Wharton's Jelly)(经中国人民解放军陆军特色医学中心伦理委员会批准和产妇及家属知情同意),将其剪至约0.5 cm×0.5 cm大小,放入25 cm²细胞培养瓶中,加入1~2 mL干细胞培养基,置于细胞孵箱(37 °C、5% CO₂)中培养10~15天,待细胞爬出并增殖至>70%密度时用胰蛋白酶消化传代,此为P1代细胞。本实验选择P5~P10代细胞作为实验细胞。

1.2.2 人脐带MSCs的表型鉴定 将1.5×10⁶个第5代MSCs用4.2 mL PBS重悬,每支600 μL均分至7支1.5 mL EP管中,离心去上清,各加入100 μL PBS以及1 μL的Isotype Control-PE、CD29-PE、CD34-PE、CD44-PE、CD45-PE、CD90-PE和CD105-PE,混匀后室温避光静置30 min,然后离心去上清,PBS洗1~2次后再各加入100 μL PBS重悬细胞,流式细胞仪采样分析。

1.2.3 人脐带MSCs的体外诱导三系分化 (1)成软骨分化。将第5代MSCs以2×10⁵/孔接种至6孔板,汇合至70%后,将培养基更换为成软骨诱导培养基,每隔2~3天换液1次。诱导21天,4%多聚甲醛固定细胞后用阿尔新蓝染色10 min。(2)成骨分化。将第5代MSCs以2×10⁵/孔接种于预先用0.1%明胶包被的6孔板,待细胞汇合为60%~70%,将培养基更换为成骨诱导培养基,每隔2~3天换液1次。诱导21天后,用4%多聚甲醛固定细胞,之后用茜素红染色5 min。(3)成脂分化。将第5代MSCs以2×10⁵/孔接种至6孔板,至细胞汇合至100%,更换培养基为成脂诱导培养基A液,维持3天后更换为B液,24 h后再次更换为A液,交替循环5个周期后,用B液维持培养7天(每2~3天换液1次)。4%多聚甲醛固定细胞后用油红O工作液染色30 min。染色后,显微镜下鉴定上述分化效果。

1.3 AGM诱导MSCs的凋亡检测

将第5代MSCs以2×10⁵/孔接种至6孔板(含10% FBS、2 mmol/L L-谷氨酰胺的α-MEM培养基),待汇合至30%,使用或不使用AMPK siRNA预处理后添加不同浓度(0.1 mmol/L、1.0 mmol/L和2.0 mmol/L)的AGM,48 h后收集细胞,使用Annexin V-FITC和PI凋亡试剂盒对细胞进行染色。使用流式细胞仪对染色细胞进行分析。

1.4 AGM诱导MSCs凋亡的信号分子检测

将第5代MSCs以5×10⁶个/皿接种至10 cm细胞

培养皿(含10% FBS、2 mmol/L L-谷氨酰胺的α-MEM培养基),待汇合至30%,使用或不使用AMPK siRNA预处理,添加1 mmol/L的AGM,48 h后在冰上使用预冷的裂解液裂解细胞。使用BCA试剂盒对裂解物的蛋白质总量进行定量。将等量的蛋白质在10%的SDS-PAGE凝胶中进行电泳分离,并转至PVDF膜。用含有5%脱脂牛奶的TBST溶液(Tris缓冲液中添加0.05%的吐温20)对PVDF膜进行封闭,4 °C孵育一抗过夜。TBST洗膜3次,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:10 000)室温孵育2 h, TBST洗膜3次, ECL蛋白质印迹底物(Thermo Scientific, Waltham, MA)显色。上述实验使用的一抗分别为AMPK、p-T¹⁷²AMPK、mTOR、p-S²⁴⁴⁸mTOR、S6K1、p-T³⁸⁹S6K1、caspase3和Cl-caspase3和β-actin。

1.5 统计学分析

数据采用SPSS 13.0软件进行统计分析,所有数据以均数±标准差表示,方差齐性比较采用通用的*F*检验,数据采用单因素方差分析和*t*检验,以*P*<0.05为差异有统计学意义。

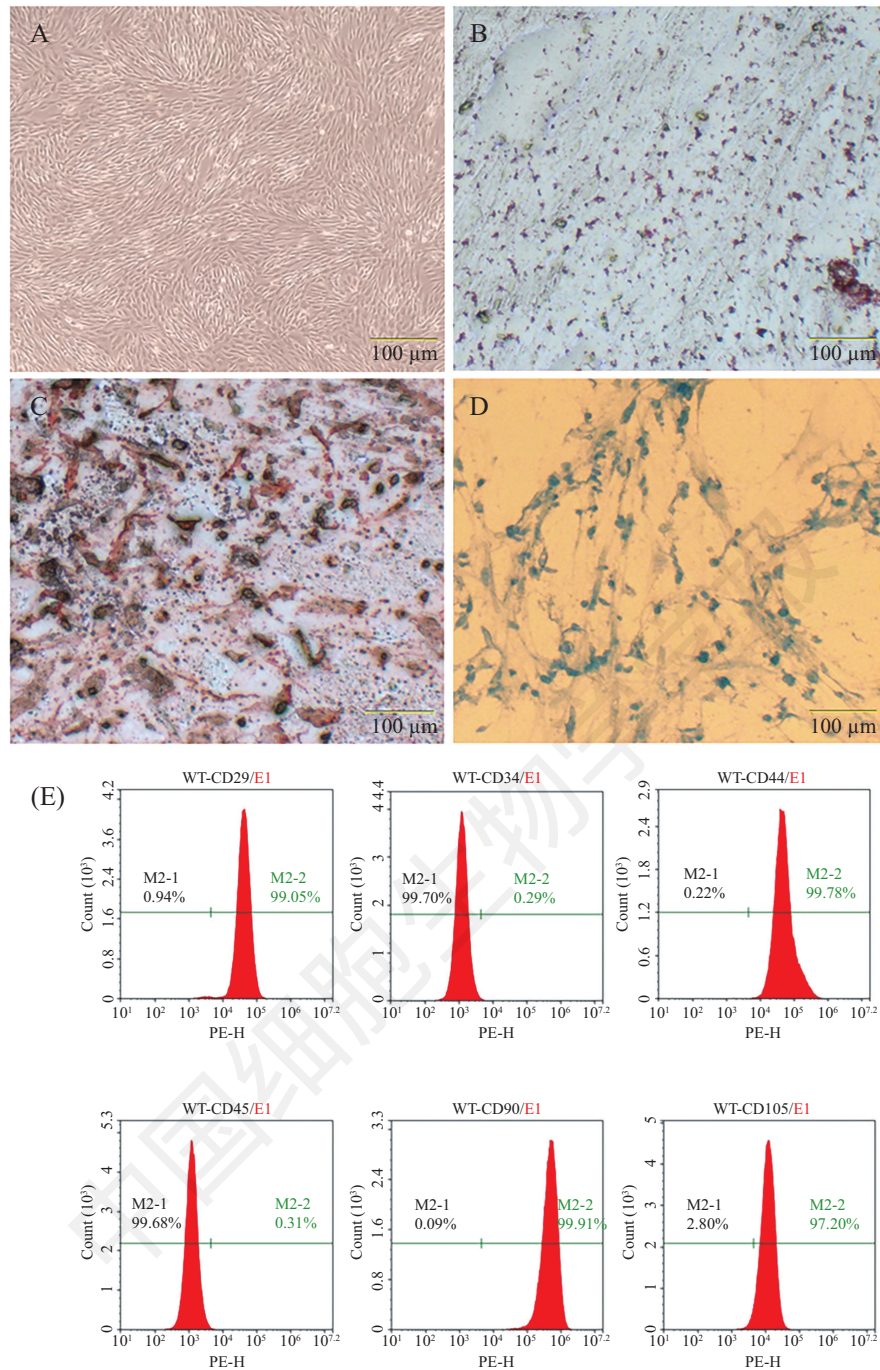
2 结果

2.1 MSCs的形态及鉴定

人脐带来源的MSCs呈短梭形、极性排列、贴壁生长,生长状态良好时,增殖旺盛,表现为漩涡状。经流式细胞术检测,细胞表面标志物CD29、CD44、CD90、CD105的阳性率均>95%,CD34和CD45阳性率均<5%,符合国际细胞治疗协会(International Society for Cellular Therapy, ISCT)2006年的标准^[8]。另外,MSCs经体外定向诱导,可以向骨细胞、脂肪细胞及软骨细胞分化(图1)。

2.2 AGM诱导MSCs凋亡

MSCs在体内过早凋亡严重影响其治疗效果,并且AGM具有抑制多种细胞(例如,大鼠肝细胞、PC12、HepG2和HT29细胞等)增殖的特性^[7]。我们探讨了AGM对于MSCs生存率的影响,在体外检测经不同浓度AGM处理后MSCs的凋亡。图2结果表明,AGM以剂量依赖性的方式(0 mmol/L~2 mmol/L)诱导MSCs的凋亡,差异有统计学意义(***P*<0.01, *****P*<0.000 1),但AGM浓度为0.1 mmol/L时,尽管没有显著性差异(*P*>0.05),但也反应了其诱导MSCs凋亡的趋势。从图中可以看出,用2 mmol/L AGM处理MSCs 48 h后,MSCs凋亡率增加至51.57%。



A: 正常培养的hUC-MSCs; B~D: hUC-MSCs的成脂、成骨和成软骨分化(依次为油红O、茜素红和阿尔新蓝染色); E: 流式细胞仪检测干细胞表面标志物CD29、CD34、CD44、CD45、CD90和CD105。

A: normally cultured hUC-MSCs; B-D: the analysis of the differentiation capacity of the hUC-MSCs; adipogenesis, osteogenesis, and chondrogenesis identified by staining with Oil Red O, Alizarin Red, and Alcian Blue, respectively; E: CD29, CD34, CD44, CD45, CD90 and CD105 in hUC-MSCs detected by flow cytometry.

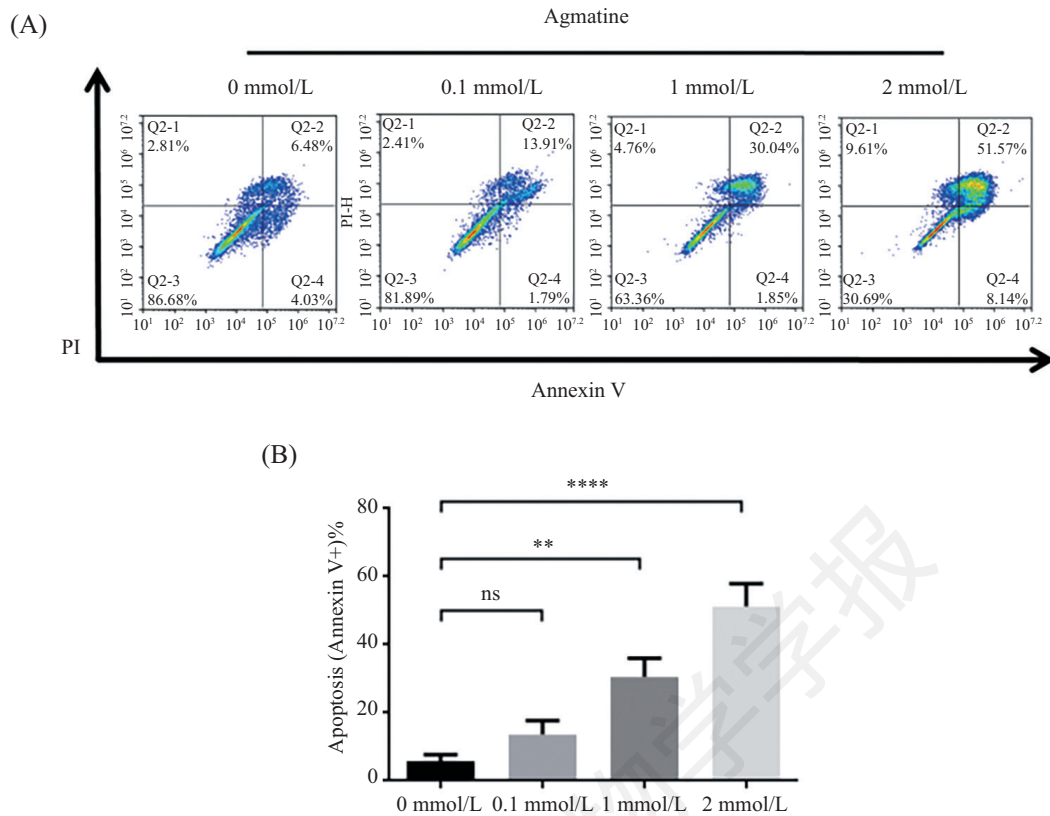
图1 人脐带间充质干细胞的鉴定

Fig.1 The identification of hUC-MSCs

2.3 AGM通过活化AMP-活化蛋白激酶(AMPK)介导凋亡

先前研究证实, 治疗糖尿病的一线药物二甲双胍可通过活化AMPK和抑制mTOR诱导MSCs凋亡^[12]。而

AGM与之结构相似, 并且能通过竞争骨骼肌I_{2B}-受体和抑制阳离子转运蛋白对二甲双胍的转运, 增强二甲双胍的降糖作用^[13-14]。因此我们猜测, AGM也可能通过类似的机制诱导MSCs凋亡。图3结果显



A, B: hUC-MSCs经不同浓度AGM诱导48 h的凋亡率。n=3, ns: $P>0.05$, ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$, 单因素方差分析。

A,B: human umbilical cord MSCs apoptosis ratio(annexin V⁺) induced by different concentrations of agmatine at 48 h. n=3, ns: $P>0.05$, ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$, One-Way ANOVA.

图2 AGM诱导MSCs凋亡

Fig.2 Agmatine induces MSCs apoptosis

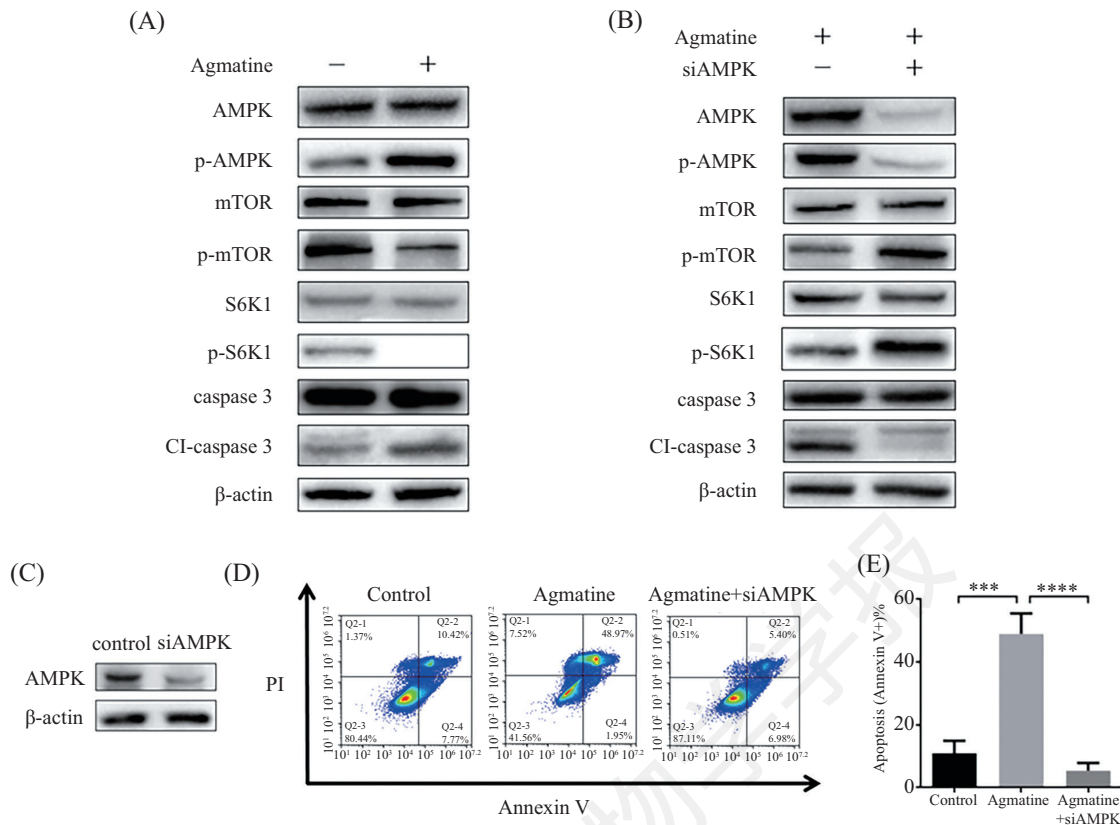
示, AGM确实通过激活AMPK, 抑制mTOR及其下游效应分子S6K1的活化, 使cleaved-caspase 3水平升高, 进而导致MSCs凋亡。且在添加特异性siAMPK siRNA后, 解除了其对mTOR和S6K1活化的抑制效应, 逆转了AGM对MSCs凋亡的诱导作用, 使凋亡率从48.97%减少到5.40%, 差异有统计学意义($P<0.0001$)。

3 讨论

随着干细胞研究的深入, 研究证实, MSCs除具有很强的自我更新、多向分化潜能、参与组织再生修复外, 其还可通过分泌相关免疫和炎症调节因子如PGE2、IDO、TSG-6和IL-10等, 进而影响免疫细胞炎症相关介质的表达、巨噬细胞M1与M2的极化以及Th17与Treg间的平衡, 而发挥强大的免疫调节和抗炎功能^[9]。同时, 因MSCs又具有较低的免疫原性, 所以MSCs被广泛用于治疗各种组织损伤疾病和免疫或者炎症相关性疾病。但外源性MSCs输入

机体后往往会过早凋亡^[15-16], 因而严重影响其临床疗效。特别是在高炎症微环境下, 如已证实, 高水平的IFN- γ 和TNF- α 协同诱导NO产生, 进而诱发MSCs的凋亡^[17]。另有研究证实, 自噬也会促进MSCs的凋亡^[18]。还有研究报道, 通过敲除盐皮质激素受体能增强MSCs的存活, 进而改善其对心肌梗死的治疗效果^[19]。上述研究结果提示, 多种因素刺激均能导致MSCs的凋亡。

此外, 本团队前期研究发现, 糖尿病一线药物二甲双胍可通过AMPK-mTOR途径诱导MSCs的凋亡^[12]。在分子结构上, AGM与之相似, 并能协同增强二甲双胍的降糖效应, 且作为保健品在人群中广为服用, 内源性AGM也在体内广泛分布。因此本研究进一步探讨AGM对MSCs凋亡的影响, 结果发现, AGM在一定的浓度范围内可显著诱导MSCs凋亡, 并呈浓度依赖性, 表明内源性的AGM可能是在体内诱导外源性MSCs的凋亡的因素之一。同时, 为了进一步了解其诱导MSCs凋亡的具体机制, 研究



A: 通过Western blot检测经过或未经过AGM(2 mmol/L)处理的MSCs的AMPK、mTOR、S6K1及其磷酸化结构, caspase 3和cleaved-caspase 3表达水平; B: siAMPK显著抑制AGM诱导的AMPK磷酸化; C: AMPK siRNA转染MSCs 24h后AMPK的蛋白表达水平; D、E: AMPK siRNA处理显著抑制AGM诱导的MSCs凋亡。 β -actin作为内参, $n=3$, $***P<0.001$, $****P<0.0001$, 单因素方差分析。

A: AMPK, mTOR, S6K1, their phosphorylated forms, caspase 3 and cleaved-caspase 3 were assessed by Western blot analysis after treatment with or without agmatine (2 mmol/L); B: siAMPK significantly inhibited agmatine-induced AMPK phosphorylation; C: expression of AMPK in MSCs 24 h after transient transfection of AMPK si RNA; D,E: treatment with AMPK siRNA significantly blocked agmatine-induced hUC-MSCs apoptosis. β -actin was used as loading control, $n=3$, $***P<0.001$, $****P<0.0001$, One-Way ANOVA.

图3 AGM通过AMPK途径诱导MSCs的凋亡

Fig.3 Agmatine induces MSCs apoptosis via activating AMP-activated protein kinase (AMPK)

发现, 与细胞生长、增殖与存活密切相关的AMPK-mTOR-S6K1信号通路^[20]也参与了AGM介导的MSCs凋亡。具体机制为AGM活化了AMPK, 进而抑制mTOR和S6K1的活化, 最终上调cleaved-caspase 3, 而参与MSCs的凋亡调控。并且当AMPK被抑制时, 上述系列生物学效应被逆转。另外, 除了AMPK之外, mTOR途径还被Akt调控, 并且PI3K/Akt相关信号通路也可以调节MSCs的存活^[21-22], 本文未做进一步探究, 有待后续研究继续深入。

综上所述, AGM可以通过激活AMPK, 抑制mTOR进而诱导MSCs的凋亡。由此提示, 在一些内源性AGM升高或者应用外源性AGM时, 应关注其诱导内外源性MSCs凋亡可能引起的副作用, 但AGM诱发MSCs凋亡与疾病发生发展或者相关副作用仍需进一步研究和探索。

参考文献 (References)

- 1 Stickle D, Bohrer A, Berger R, Morrissey J, Klahr S, Turk J. Quantitation of the putative neurotransmitter agmatine as the hexafluoroacetylacetonate derivative by stable isotope dilution gas chromatography and negative-ion chemical ionization mass spectrometry. *Anal Biochem* 1996; 238(2): 129-36.
- 2 Aricioglu-Kartal F, Regunathan S. Effect of chronic morphine treatment on the biosynthesis of agmatine in rat brain and other tissues. *Life Sci* 2002; 71(14): 1695-701.
- 3 Arteni NS, Lavinsky D, Rodrigues AL, Frison VB, Netto CA. Agmatine facilitates memory of an inhibitory avoidance task in adult rats. *Neurobiol Learn Mem* 2002; 78(2): 465-9.
- 4 Lortie MJ, Novotny WF, Peterson OW, Vallon V, Malvey K, Mendonca M, *et al*. Agmatine, a bioactive metabolite of arginine. Production, degradation, and functional effects in the kidney of the rat. *J Clin Invest* 1996; 97(2): 413-20.
- 5 Li XT, He RR. Hemodynamic effects of agmatine and its cellular mechanism in anesthetized rats. *Acta Physiologica Sinica* 1999; 51(2): 229-33.

- 6 李炫飞. 胍丁胺对脓毒症小鼠的保护作用及分子机制研究. 重庆医科大学(硕士学位论文), 2014.
- 7 Regunathan S, Feinstein DL, Reis DJ. Anti-proliferative and anti-inflammatory actions of imidazoline agents. Are imidazoline receptors involved? *Ann N Y Acad Sci* 1999; 881: 410-9.
- 8 Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, *et al*. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8(4): 315-7.
- 9 De Miguel MP, Fuentes-Julian S, Blazquez-Martinez A, Pascual CY, Aller MA, Arias J, *et al*. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. *Curr Mol Med* 2012; 12(5): 574-91.
- 10 Wang Y, Chen X, Cao W, Shi Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implication. *Nat Immunol* 2014; 15(11): 1009-16.
- 11 Lippolis JD. Immunological signaling networks: integrating the body's immune response. *J Anim Sci* 2008; 86(14 suppl): E53-63.
- 12 He X, Yao MW, Zhu M, Liang DL, Guo W, Yang Y, *et al*. Metformin induces apoptosis in mesenchymal stromal cells and dampens their therapeutic efficacy in infarcted myocardium. *Stem Cell Res Ther* 2018; 9(1): 306.
- 13 Lee JP, Chen W, Wu HT, Lin KC, Cheng JT. Metformin can activate imidazoline I-2 receptors to lower plasma glucose in type I-like diabetic rats. *Horm Metab Res* 2011; 43(1): 26-30.
- 14 Gründemann D, Hahne C, Berkels R, Schömig E. Agmatine is efficiently transported by non-neuronal monoamine transporters extraneuronal monoamine transporter (EMT) and organic cation transporter 2 (OCT2). *J Pharmacol Exper Ther* 2003; 304(2): 810-7.
- 15 Robey TE, Saiget MK, Reinecke H, Murry CE. Systems approaches to preventing transplanted cell death in cardiac repair. *J Mol Cell Cardiol* 2008; 45(4): 567-81.
- 16 Mastro M, Lin H, Lee T. Enhancing the efficacy of mesenchymal stem cell therapy. *World J Stem Cells* 2014; 6(2): 82-93.
- 17 Li X, Shang B, Li YN, Shi Y, Shao C. IFN γ and TNF α synergistically induce apoptosis of mesenchymal stem/stromal cells via the induction of nitric oxide. *Stem Cell Res Ther* 2019; 10(1): 18.
- 18 Dang S, Yu ZM, Zhang CY, Zheng J, Li KL, Wu Y, *et al*. Autophagy promotes apoptosis of mesenchymal stem cells under inflammatory microenvironment. *Stem Cell Res Ther* 2015; doi: 10.1186/s13287-015-0245-4.
- 19 Xie X, Shen Y, Chen J, Huang Z, Ge J. Mineralocorticoid receptor deficiency improves the therapeutic effects of mesenchymal stem cells for myocardial infarction via enhanced cell survival. *J Cell Mol Med* 2019; 23(2): 1246-56.
- 20 Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8(8): 627-44.
- 21 Lim SY, Kim YS, Ahn Y, Jeong MH, Hong MH, Joo SY, *et al*. The effects of mesenchymal stem cells transduced with Akt in a porcine myocardial infarction model. *Cardiovasc Res* 2006; 70(3): 530-42.
- 22 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.