

网络出版时间: 2016-10-19 13:54:51 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20161019.1354.006.html>

内源性硫化氢在低氧/无血清诱导骨髓间充质干细胞凋亡中的作用

李从圣¹, 郭碧蓉², 王爱玲³, 郭增⁴, 杨静¹, 郝玉瑜¹

摘要 目的 探讨内源性硫化氢(H_2S) 在低氧/无血清(H/SD) 诱导骨髓间充质干细胞(MSCs) 凋亡中的作用。方法 体外分离培养大鼠 MSCs, 用 H/SD 处理 MSCs 建立 H/SD 诱导 MSCs 凋亡的实验模型, 构建 CSE 重组慢病毒载体并转染 MSCs, PI 染色流式细胞术检测 MSCs 凋亡率, Western blot 法检测 MSCs 中 CSE 蛋白的表达, 亚甲基蓝分光光度计法检测 MSCs 内源性 H_2S 的含量。结果 MSCs 存在内源性 H_2S 及其合成酶 CSE 蛋白的表达, H/SD 可呈时间依赖性诱导 MSCs 凋亡, 显著抑制 MSCs 内源 H_2S 生成和 CSE 蛋白的表达; 而 CSE 过表达则明显抑制 H/SD 诱导的 MSCs 凋亡, 促进 MSCs 内源 H_2S 生成。结论 CSE/ H_2S 代谢途径功能障碍促进 H/SD 诱导 MSCs 凋亡, 内源性 H_2S 参与了 H/SD 诱导 MSCs 凋亡。

关键词 骨髓间充质干细胞; 硫化氢; 胱硫醚- γ -裂解酶; 低氧/无血清; 凋亡

中图分类号 R 542.22

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)12-1743-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.12.006

急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI) 及其引起的心力衰竭是严重危害人类健康的心血管疾病^[1]。骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs) 移植已成为治疗 AMI 最有潜力的方法之一^[2-3]。然而, MSCs 移植早期大量死亡的问题严重制约了细胞移植的疗效^[4]。研究^[5]表明, 心肌缺血微环境诱导的细胞凋亡是导致这一现象的主要因素。硫化氢(hydrogen sulfide, H_2S) 是新发现的一种气体信号分子, 在哺乳动物, 内源性 H_2S 主要由胱硫醚- γ -裂解酶(cystathionine- γ -lyase, CSE)、

胱硫醚- β -合酶(cystathionine- β -synthase, CBS) 以半胱氨酸为底物催化合成产生^[6]。研究^[7-9]表明, H_2S 在体内发挥着调节细胞凋亡的重要生物学功能。研究^[10]显示, 外源性 H_2S 可显著抑制低氧诱导 MSCs 凋亡, H_2S 预处理 MSCs 移植治疗大鼠 AMI 模型明显提高 MSCs 存活率, 减小心肌梗死面积, 改善心功能。研究^[11]表明, 内源性 H_2S 缺乏可引起 MSCs 自我更新及向成骨分化障碍。然而, 内源性 H_2S 是否参与心肌缺血微环境诱导 MSCs 凋亡的调节作用目前尚不清楚。该研究利用原代培养 MSCs, 以低氧/无血清(H/SD) 模拟心肌缺血微环境诱导 MSCs 凋亡模型, 探讨内源性 H_2S 在 H/SD 诱导 MSCs 凋亡中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 低糖-DMEM 培养基(L-DMEM)、胎牛血清(FBS) 购自美国 Hyclone 公司; 碘化丙啶(PI)、0.25% 胰酶购自美国 Sigma 公司; 低氧试剂购自法国 BioMérieuxsa 公司; N,N-二甲基-对苯二胺盐酸盐购自上海生工生物工程有限公司; β -actin、CBS 及 CSE 抗体购自美国 Santa Cruz 公司; Lipofectamine 2000 购自英国 Invitrogen 公司; Polybrene 购自美国 Chemicon 公司。

1.2 MSCs 分离、培养及传代 成年清洁型 SD 大鼠(4 周龄, 80 g 左右) 由安徽医科大学实验动物中心提供, 所有实验经安徽医科大学实验动物委员会批准。将大鼠断颈处死后, 无菌条件下取股骨及胫骨, 显露骨髓腔, 用不含 FBS 的 L-DMEM 培养液 10 ml 冲洗骨髓腔, 获取骨髓细胞悬液。将冲洗液收集离心管中, 1 200 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 在细胞沉淀中加入含 15% FBS 的 L-DMEM 培养液 5 ml, 小心吹打均匀成细胞悬液后, 将细胞悬液移入备好的培养瓶中, 置于 37℃、5% CO_2 孵箱内, 培养 3 d 后, 首次换液弃去悬浮细胞, 认为此时贴壁部分的细胞为 MSCs, 以后每隔 3 d 换液培养。每日在倒置显微镜下观察 MSCs 的生长情况和形态学变化。当细胞长至铺满培养瓶底部 80% 左右时, 以 0.25% 的胰

2016-06-15 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81301352); 北京协和医学基金-睿 E(睿意) 急诊医学科研专项基金(编号: R2015012); 安徽医科大学校科研基金(编号: 2015xkj062)

作者单位: 安徽医科大学第三附属医院(合肥市第一人民医院)¹ 急诊部、² 皮肤科, 合肥 230061

³ 安徽医科大学第一附属医院心内科, 合肥 230022

⁴ 安徽省第二人民医院重症医学科, 合肥 200041

作者简介: 李从圣, 男, 副主任医师, 责任作者, E-mail: lcs2008@yeah.net

蛋白酶消化,按1:2密度进行传代。传第3代时使用CD34、CD44、CD45、CD90单克隆抗体,采用流式细胞仪检测其表面抗原,证实培养的细胞为MSCs,选取生长良好的第3代细胞进行实验。

1.3 低氧/无血清(H/SD)诱导MSCs凋亡模型的建立 取培养融合度达80%的第3代(P3)MSCs用于造模。弃除原细胞培养液,将细胞用PBS轻轻洗3遍,充分去除原培养液,然后加入不含胎牛血清(FBS)的L-DMEM,37℃、5% CO₂细胞培养箱中孵育30 min,随后迅速将细胞放入低氧盒中,加入低氧化学催化剂和低氧指示条,密封好低氧盒。再将低氧盒置于37℃、5% CO₂细胞培养箱,分别培养3、6、12、24 h诱导MSCs凋亡。当低氧时间满足后,打开低氧盒,取出细胞用于后续实验。

1.4 PI染色流式细胞仪检测MSCs凋亡 低氧时间完成后,用0.25%胰蛋白酶消化MSCs,1 000 r/min离心10 min,去上清液,PBS漂洗2次,沉淀中加入70%冰乙醇固定。1 000 r/min离心10 min,去上清液,PBS漂洗2次,调整细胞浓度为 1×10^6 /ml。加50 μl RNase A至终浓度为1 g/L,37℃水浴30 min。加PI至终浓度5 μg/ml,350目尼龙网滤膜过滤去除细胞团块,4℃避光染色30 min后,上流式细胞仪检测(激发波长:488 nm;发射波长:610 nm)各期细胞DNA的含量。测定数据按流式细胞仪所配置的软件进行数据处理,以DNA直方图出现低于G1期DNA含量的亚G1峰的大小代表凋亡细胞的多少。

1.5 Western blot法检测MSCs中CBS、CSE蛋白的表达 低氧时间完成后,裂解细胞提取总蛋白,考马兰亮蓝法行蛋白定量,用10%分离胶、5%浓缩胶进行SDS-PAGE电泳,100 V恒压电泳30 min,再150 V恒压电泳50 min。随后用220 mA恒流转膜2 h,将凝胶中的蛋白转移至醋酸纤维素膜上(NC膜)。5%脱脂奶粉室温封闭2 h,分别加入一抗(兔抗鼠CBS、兔抗鼠CSE,均为1:500稀释),4℃孵育过夜,TBST洗膜3次,每次8 min,加入二抗(辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG,1:2 000稀释),摇床上室温孵育2 h,TBST洗膜3次,每次8 min。ECL发光压片显影,用Quantity One软件进行灰度分析定量。

1.6 MSCs培养液中内源性H₂S含量的测定 低氧时间完成后,取310 μl各组细胞培养液入EP管。分别依次加入20 g/L醋酸锌30 μl,200 g/L三氯醋酸60 μl,20 mmol/L N,N-二甲基-对苯二胺盐酸

盐(7.2 mol/L HCL配制)40 μl和30 mmol/L三氯化铁(1.2 mol/L HCL配制)30 μl,迅速合上EP管并震荡混匀,37℃静置10 min,6 000 r/min离心10 min。分光光度计检测上清液在670 nm处的吸光度(absorbance,A)值。通过BCA蛋白定量和NaHS标准曲线计算标本中H₂S的含量。

1.7 CSE慢病毒载体的构建、包装及感染 以SD大鼠MSCs细胞基因组为模板,采用特异性PCR引物扩增CSE基因(NCBI Genbank号:AY_032875)的CDS区域序列(F:5'-GTATGGAGGCACCAACAGGT-3',R:5'-GTTGGGTTTGTGGGTGTTTC-3'),通过限制性酶切、连接、转化等基因克隆技术,构建携带CSE基因的慢病毒表达载体pLV-ZsGreen-CSE lentivirus及空载体pLV-ZsGreen lentivirus,将慢病毒载体和辅助包装质粒转染293T包装细胞系,转染48 h后在荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白表达情况以判断病毒包装的效率,收获病毒上清液并用0.45 μm低蛋白结合的滤头过滤获得病毒悬液。 2×10^6 MSCs细胞接种于10 cm细胞培养皿中,培养24 h待细胞融合度达到30%左右更换含Polybrene的培养基,计入病毒悬液感染靶细胞(分别记为^{CSE}MSCs、^{GFP}MSCs),病毒感染48 h后在荧光显微镜下观察细胞内绿色荧光蛋白的表达情况以判断病毒的感染效率,收取蛋白用于检测CSE基因的过表达情况。

1.8 统计学处理 采用SPSS 13.0软件进行分析,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组均数之间比较采用方差分析(ANOVA),差异有统计学意义时组内两两比较采用SNK- η 检验。

2 结果

2.1 大鼠MSCs生长和鉴定 采用倒置显微镜下观察MSCs的生长情况,原代MSCs接种24 h后可见散在分布的贴壁MSCs,随后胞体由圆形逐渐伸展为椭圆形、多角形、短梭型、长梭型,并且呈现集落式生长。传代后,细胞形态基本趋于一致,呈长梭型。应用流式细胞仪检测第3代MSCs表面抗原标记CD44、CD90表达阳性,CD34、CD45表达阴性,各表面抗原在MSCs中的阳性比例比较稳定^[2]。见图1。

2.2 MSCs内源性H₂S合成酶的表达 采用Western blot法检测MSCs是否存在内源性H₂S合成酶CBS和CSE的表达,结果显示在MSCs中有H₂S合成酶CSE蛋白表达而无CBS蛋白表达。见图2A。为进一步证实CSE为MSCs内源性H₂S主要合成

酶,采用亚甲基蓝分光光度计方法检测 CBS 抑制剂 (AOAA) 及 CSE 抑制剂 (PAG) 对 MSCs 内源性 H_2S 生成的影响,结果显示 MSCs 在加入底物 L-半胱氨酸后能够产生内源性 H_2S ,CSE 抑制剂 PAG 显著抑制 MSCs 内源性 H_2S 生成,而 CBS 抑制剂 AOAA 对 MSCs 内源性 H_2S 生成没有影响 ($F = 447.996, P < 0.01$)。见图 2B。

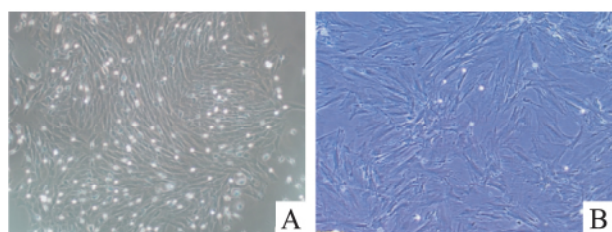


图1 倒置显微镜下观察大鼠 MSCs 的形态 $\times 10$
A: 原代 (P0); B: 第3代 (P3)

2.3 H/SD 对 MSCs 凋亡的影响 MSCs 经 PI 染色后,用流式细胞仪检测 MSCs 凋亡情况,结果显示:与对照组比较,H/SD 培养 MSCs 3、6、12、24 h 后各组细胞凋亡率显著增加,差异有统计学意义 ($F = 3817.092, P < 0.01$)。见图 3。

2.4 H/SD 对 MSCs 内源性 H_2S 生成的影响 采用亚甲基蓝分光光度计方法检测 H/SD 对 MSCs 内

源性 H_2S 生成的影响,结果显示:正常状态下 MSCs 能生成内源性 H_2S ,与对照组比较,随着 H/SD 时间

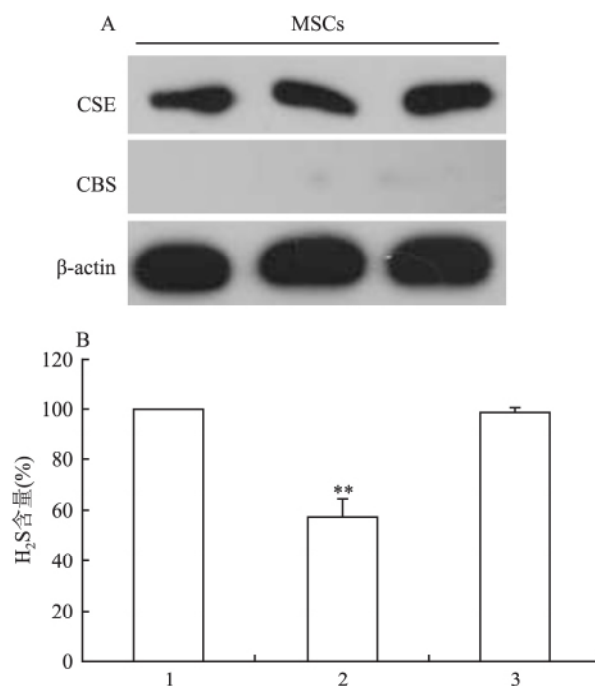


图2 MSCs 内源性 H_2S 合成酶的表达

A: Western blot 法检测 MSCs 内源性 H_2S 合成酶 CSE 及 CBS 蛋白的表达情况; B: CBS 抑制剂 (AOAA) 及 CSE 抑制剂 (PAG) 对 MSCs 内源性 H_2S 生成的影响; 1: 对照组; 2: PAG 组; 3: AOAA 组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$

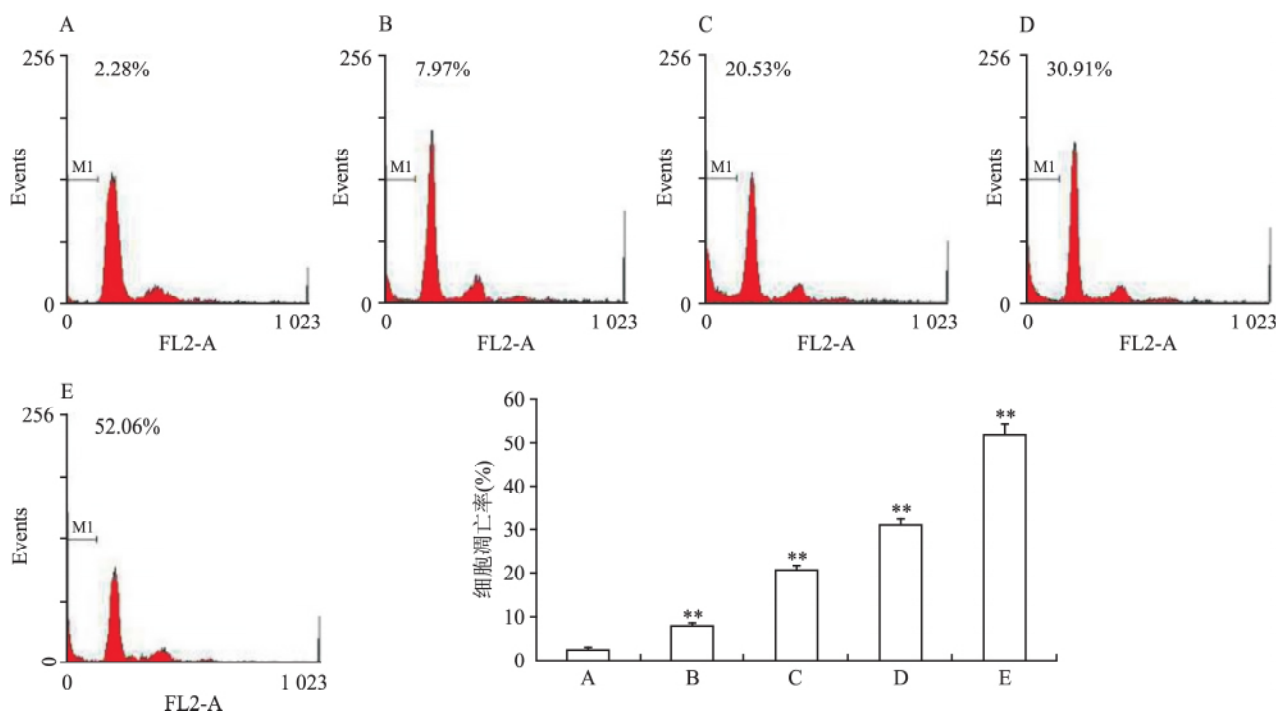


图3 H/SD 对 MSCs 凋亡的影响

A: 对照组; B: H/SD 3 h 组; C: H/SD 6 h 组; D: H/SD 12 h 组; E: H/SD 24 h 组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$

的延长(3、6、12、24 h),内源性 H_2S 水平显著降低,差异有统计学意义($F = 578.974, P < 0.01$)。见图4。

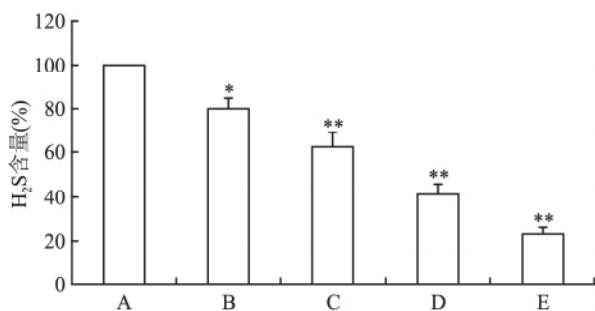


图4 H/SD 对 MSCs 内源性 H_2S 生成的影响

A: 对照组; B: H/SD 3 h 组; C: H/SD 6 h 组; D: H/SD 12 h 组; E: H/SD 24 h 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.5 H/SD 对 MSCs 内源性 H_2S 合成酶 CSE 蛋白表达的影响 采用 Western blot 法检测 H/SD 对 MSCs 内源性 H_2S 合成酶 CSE 蛋白表达影响,结果显示:与对照组比较,随着低氧时间延长(3、6、12、24 h),CSE 蛋白表达显著降低,差异有统计学意义($F = 224.505, P < 0.01$)。见图5。

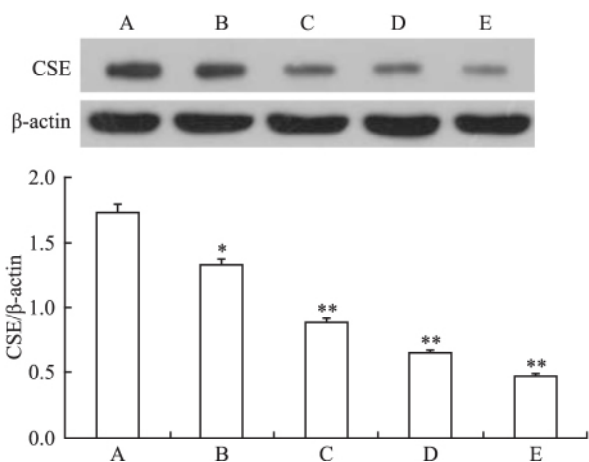


图5 H/SD 对 MSCs 内源性 H_2S 合成酶 CSE 蛋白表达的影响

A: 对照组; B: H/SD 3 h 组; C: H/SD 6 h 组; D: H/SD 12 h 组; E: H/SD 24 h 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.6 CSE 过表达对 MSCs 内源性 H_2S 生成及 MSCs 凋亡的影响 首先构建 SD 大鼠 CSE 基因的慢病毒表达载体 pLV-ZsGreen-CSE lentivirus 及空载体 pLV-ZsGreen lentivirus,利用慢病毒包装体系,在 293T 细胞中进行病毒颗粒的包装并分别感染 MC-Ss,建立稳定表达 CSE 的 MSCs。Western blot 检测结果显示,与 Norm MSCs 及 pLVX-IRES-ZsGreen 空载

组 (GFP MSCs) 比较, pLVX-IRES-ZsGreen-CSE (CSE MSCs) CSE 蛋白表达明显增加($F = 3817.092, P < 0.01$),表明 CSE 基因过表达细胞系建立成功,见图6。用 H/SD 诱导 MSCs 凋亡 12 h 后,与 GFP MSCs 及 Norm MSCs 比较, CSE MSCs 组内源性 H_2S 含量显著增加($F = 1763.797, P < 0.05$),见图7,而 CSE MSCs 组细胞凋亡率显著低于 GFP MSCs 及 Norm MSCs 组($F = 4023.529, P < 0.05$),见图8。

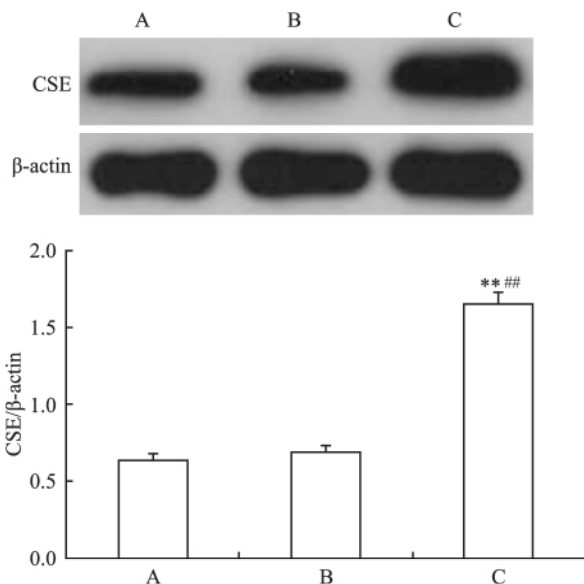


图6 慢病毒转染 MSCs CSE 蛋白的表达

A: Norm MSCs; B: GFP MSCs; C: CSE MSCs; 与 Norm MSCs 比较: ** $P < 0.01$; 与 GFP MSCs 比较: ## $P < 0.01$

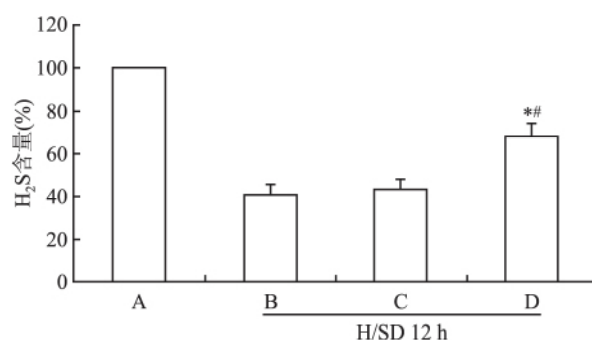


图7 CSE 过表达对 MSCs 内源性 H_2S 生成的影响

A: 对照组; B: Norm MSCs; C: GFP MSCs; D: CSE MSCs; 与 Norm MSCs 比较: * $P < 0.05$; 与 GFP MSCs 比较: # $P < 0.05$

3 讨论

H_2S 是继 NO 和 CO 之后新发现的一种气体信号分子。内源性 H_2S 是机体多种细胞以半胱氨酸为底物主要由 CSE、CBS 催化合成产生,CSE、CBS 分布广泛,但其分布具有显著组织差异性,心血管系

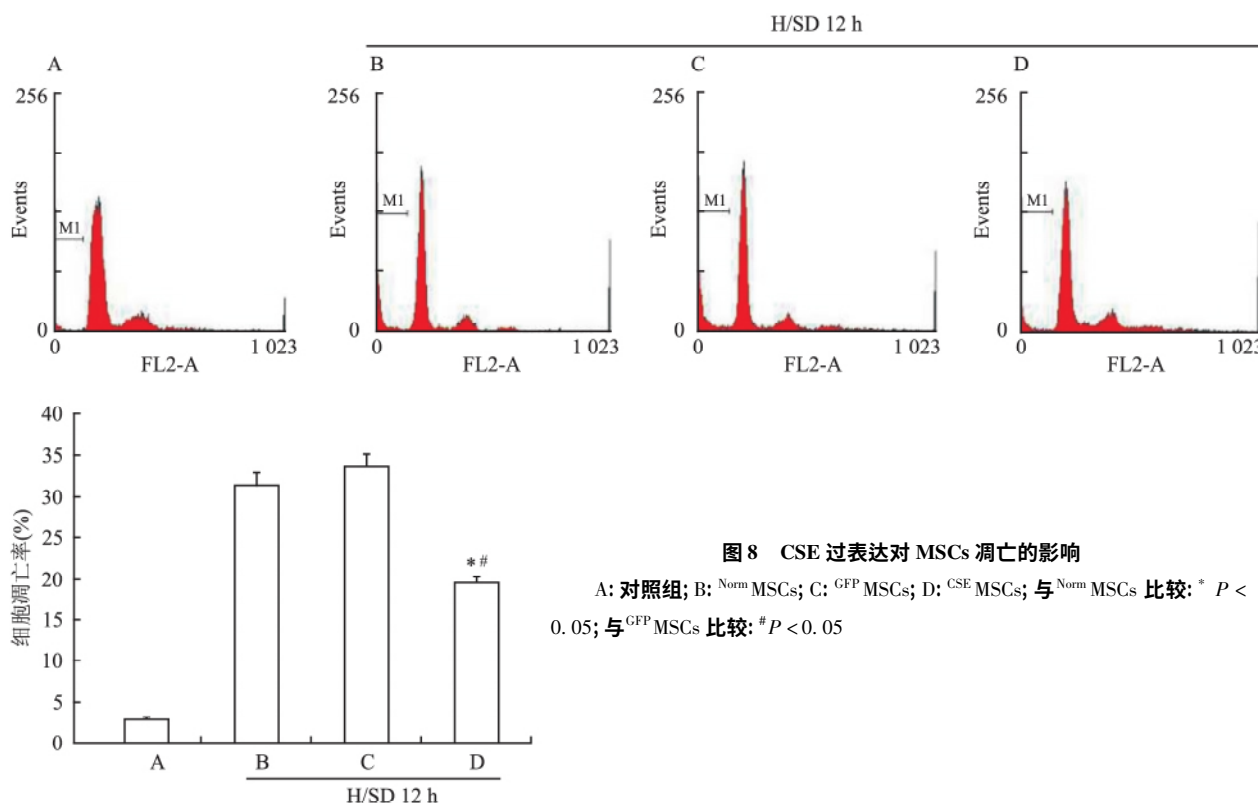


图8 CSE 过表达对 MSCs 凋亡的影响

A: 对照组; B: Norm MSCs; C: GFP MSCs; D: CSE MSCs; 与 Norm MSCs 比较: * $P < 0.05$; 与 GFP MSCs 比较: # $P < 0.05$

统主要通过 CSE 催化产生 H_2S , 神经系统主要存在 CBS, 而没有 CSE, 在肝脏和肾脏组织中 CBS 和 CSE 均有表达^[13]。MSCs 是存在于骨髓中的非造血细胞, 具备多向分化潜能、采集方便、免疫原性低、自体移植可行性高等优点^[14], 从而使 MSCs 成为细胞移植治疗 AMI 的首选靶细胞^[2-3]。本实验结果显示, MSCs 能够产生内源性 H_2S , MSCs 内仅有 H_2S 合成酶 CSE 蛋白表达而无 CBS 蛋白表达, 且 CSE 抑制剂 PAG 显著抑制了 MSCs 内源性 H_2S 生成, 而 CBS 抑制剂 AOAA 对 MSCs 内源性 H_2S 生成没有影响。提示 MSCs 具有合成内源性 H_2S 的能力, CSE 是 MSCs 内源性 H_2S 合成关键酶。

尽管 MSCs 移植已成为治疗 AMI 最有潜力的方法之一。然而, 心肌缺血微环境诱导的 MSCs 凋亡严重制约了细胞移植的疗效。因此, 探讨心肌缺血微环境诱导 MSCs 凋亡的机制并寻求一种有效的抗 MSCs 凋亡的方法有着十分重要的意义。 H_2S 的重要生物学功能是调节细胞凋亡, 研究^[7-9]证实, H_2S 参与了心肌细胞、血管内皮细胞及气管上皮细胞等凋亡的调节。那么, 内源性 H_2S 是否参与心肌缺血微环境诱导 MSCs 凋亡的调节。本研究结果显示, 与对照组比较, H/SD 可呈时间依赖性诱导 MSCs 凋亡, 这与既往实验^[13]结果相一致; 另外, 随着 H/SD 时间的延长 (3、6、12、24 h), MSCs 内源 H_2S 生成和

CSE 蛋白表达显著减少, 结合以上结果, 推测 H/SD 抑制了 MSCs 中 CSE 蛋白表达, 导致内源性 H_2S 生成减少, 最终促使 H/SD 诱导 MSCs 凋亡。

为了进一步证实内源性 H_2S 生成减少是 H/SD 诱导 MSCs 凋亡的潜在机制, 本研究观察了 CSE 过表达对 H/SD 诱导 MSCs 凋亡及内源性 H_2S 生成的影响, 结果显示, 在 H/SD 诱导 MSCs 凋亡 12 h 状态下, 与 GFP MSCs 及 Norm MSCs 比较, CSE MSCs 组内源性 H_2S 含量显著增加, 同时 CSE MSCs 组细胞凋亡率显著低于 GFP MSCs 及 Norm MSCs 组。提示 CSE/ H_2S 代谢途径功能障碍是 H/SD 诱导 MSCs 凋亡的重要原因, 内源性 H_2S 参与了 H/SD 诱导 MSCs 凋亡。

综上所述, MSCs 具有合成内源性 H_2S 的能力, CSE 是 MSCs 内源性 H_2S 合成关键酶; H/SD 可通过抑制 MSCs 中 CSE 蛋白表达, 减少内源性 H_2S 生成, 从而促使 H/SD 诱导 MSCs 凋亡; 而 CSE 过表达则明显抑制 H/SD 诱导的 MSCs 凋亡, 促进 MSCs 内源 H_2S 生成。本研究为深入阐明 H/SD 诱导 MSCs 凋亡机制提供了有意义的实验依据, 也为临床改善 MSCs 移植治疗 AMI 疗效提供了新的策略。

参考文献

- [1] Lloyd-Jones D M, Larson M G, Leip E P, et al. Lifetime risk for developing congestive heart failure: the Framingham Heart Study

- [1] . *Circulation*, 2002, 106(24): 3068–72.
- [2] Nesselmann C, Ma N, Bieback K, et al. Mesenchymal stem cells and cardiac repair [J]. *J Cell Mol Med*, 2008, 12(5B): 1795–810.
- [3] Leistner D M, Fischer-Rasokat U, Honold J, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): final 5-year results suggest long-term safety and efficacy [J]. *Clin Res Cardiol*, 2011, 100(10): 925–34.
- [4] Müller-Ehmsen J, Krausgrill B, Burst V, et al. Effective engraftment but poor mid-term persistence of mononuclear and mesenchymal bone marrow cells in acute and chronic rat myocardial infarction [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2006, 41(5): 876–84.
- [5] Zhu W, Chen J, Cong X, et al. Hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(2): 416–25.
- [6] Kimura H, Shibuya N, Kimura Y. Hydrogen sulfide is a signaling molecule and a cytoprotectant [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2012, 17(1): 45–57.
- [7] Lu F, Xing J, Zhang X, et al. Exogenous hydrogen sulfide prevents cardiomyocyte apoptosis from cardiac hypertrophy induced by isoproterenol [J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 381(1–2): 41–50.
- [8] Li X, Zhang K Y, Zhang P, et al. Hydrogen sulfide inhibits formaldehyde-induced endoplasmic reticulum stress in PC12 cells by upregulation of SIRT1 [J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e89856.
- [9] 林帆, 陈亚红, 廖程程, 等. 硫化氢对尼古丁诱导的人支气管上皮细胞内质网应激及细胞凋亡的影响 [J]. *中华内科医学杂志*, 2015, 95(28): 2297–301.
- [10] Xie X, Sun A, Zhu W, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells preconditioned with hydrogen sulfide enhances repair of myocardial infarction in rats [J]. *Tohoku J Exp Med*, 2012, 226(1): 29–36.
- [11] Liu Y, Yang R, Liu X, et al. Hydrogen sulfide maintains mesenchymal stem cell function and bone homeostasis via regulation of Ca^{2+} channel sulphydration [J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(1): 66–78.
- [12] Wang A, Shen F, Liang Y, et al. Marrow-derived MSCs and atorvastatin improve cardiac function in rat model of AMI [J]. *Int J Cardiol*, 2011, 150(1): 28–32.
- [13] Calvert J W, Coetzee W A, Lefer D J. Novel insights into hydrogen sulfide-mediated cytoprotection [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2012, 12(10): 1203–17.
- [14] Barry F P, Murphy J M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(4): 568–84.
- [15] Nie Y, Han B M, Liu X B, et al. Identification of microRNAs involved in hypoxia- and serum deprivation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells [J]. *Int J Biol Sci*, 2011, 7(6): 762–8.

Roles of endogenous hydrogen sulfide in hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis of mesenchymal stem cells

Li Congsheng¹, Guo Birong², Wang Ailing³, et al

(¹Dept of Emergency, ²Dept of Dermatology, The Third

Affiliated Hospital of Anhui Medical University, The First People's Hospital of Hefei,

Hefei 230061; ³Dept of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To explore the effect of endogenous hydrogen sulfide on hypoxia and serum deprivation (H/SD)-induced apoptosis in mesenchymal stem cells (MSCs). **Methods** Rat bone marrow MSCs were isolated and cultured *in vitro*, MSCs were treated with H/SD as a apoptosis model. CSE lentivirus vector was constructed and transfected with MSCs. Apoptosis of MSCs was assessed by flow cytometry analysis with PI staining. The protein expression of CSE in MSCs was detected by Western blot. Endogenous H₂S generation in MSCs was measured by the N,N-dimethyl-p-phenylenediamine sulphate. **Results** Exposure of MSCs to H/SD caused a significant decrease in H₂S generation and resulted in remarkable cell apoptosis. Moreover, under basal conditions MSCs expressed cystathionine gamma-lyase (CSE) and synthesized H₂S whereas CSE expression was inhibited by H/SD treatment. Overexpression of CSE not only markedly prevented H/SD-induced decrease of endogenous H₂S generation but also protected MSCs from apoptosis. **Conclusion** Inhibition of endogenous CSE/H₂S system contributes to H/SD-induced apoptosis and endogenous H₂S plays an important role in regulating H/SD-induced apoptosis in MSCs.

Key words mesenchymal stem cells; hydrogen sulfide; cystathionine gamma-lyase; hypoxia/serum deprivation; apoptosis