

脂肪来源间充质干细胞及外泌体对地塞米松诱导肌肉减少症小鼠的治疗作用

袁为远^{1,2}, 雷秦祎³, 李秀琪³, 卢铁柱³, 傅子文^{4,5}, 梁志丽⁵, 季韶洋⁶, 李一佳^{1,2}, 任宇³

https://doi.org/10.12307/2025.576

投稿日期: 2024-11-20

采用日期: 2025-01-24

修回日期: 2025-02-25

在线日期: 2025-03-11

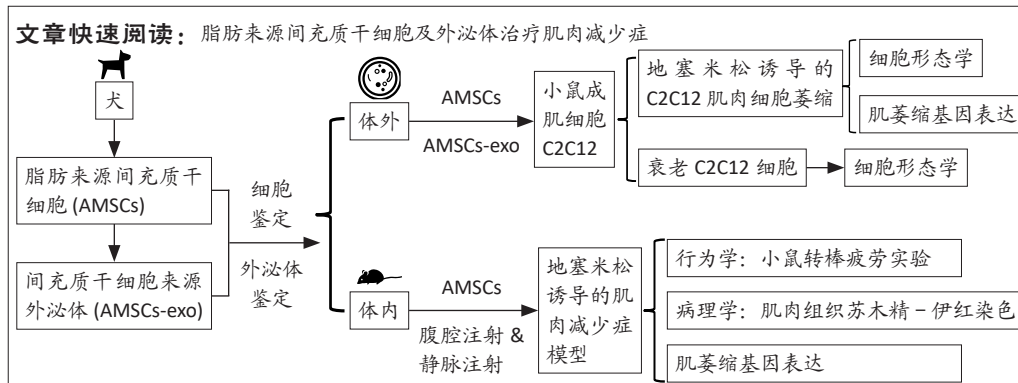
中图分类号:

R459.9; R318; R322.7+4

文章编号:

2095-4344(2026)01-00058-10

文献标识码: A



文题释义:

间充质干细胞: 是一类来源于中胚层的具有自我更新和多向分化能力的多能成体干细胞, 具有抗炎、免疫调节、组织再生等生物学作用, 已被作为新型疗法广泛运用到临床研究中。

肌肉减少症: 是一种增龄相关的骨骼肌肉量减少、肌肉力量下降和/或躯体功能减退的老年性疾病。

摘要

背景: 肌肉减少症是一种增龄相关的骨骼肌肉量减少、肌肉力量下降和/或躯体功能减退的老年性疾病。目前, 针对肌肉减少症的有效治疗手段仍然匮乏, 探索新的治疗方法以改善肌肉减少症患者的症状和预后具有重要的临床意义。

目的: 探讨犬脂肪来源间充质干细胞及外泌体对地塞米松诱导的小鼠肌肉减少症模型的影响。

方法: 从犬脂肪组织中分离并培养脂肪间充质干细胞, 通过流式细胞术和成骨、成脂肪、成软骨分化实验进行细胞鉴定及功能评估。随后提取脂肪间充质干细胞外泌体, 通过透射电镜、Western blot、库尔特纳单颗粒检测技术对外泌体进行表征。在体外, 使用地塞米松诱导C2C12肌管萎缩模型和C2C12衰老模型, 观察犬脂肪来源间充质干细胞及外泌体对肌管生长和肌肉萎缩基因表达的影响。在体内, 使用地塞米松诱导构建小鼠肌少症模型, 腹腔或静脉注射犬脂肪间充质干细胞治疗, 通过小鼠转棒行为学研究、组织病理检查、肌肉萎缩基因检测进行疗效评估。

结果与结论: ①分离的犬脂肪间充质干细胞高表达CD73、CD90、CD105, 低表达MHC-II、CD14、CD19、CD34、CD45, 在体外能够成功分化为成骨、成脂和成软骨细胞; ②脂肪间充质干细胞外泌体粒径大小、电镜形态、特异性标志物阳性表达符合鉴定标准; ③与地塞米松诱导的萎缩C2C12细胞相比, 脂肪间充质干细胞及外泌体治疗后均可促进肌管的恢复和生长, 抑制肌肉萎缩相关基因MuRF1和Atrogin-1的表达; ④与衰老C2C12细胞组比, 脂肪间充质干细胞及外泌体可显著促进衰老细胞肌管的恢复和生长; ⑤与对照组小鼠相比, 地塞米松诱导的肌少症模型小鼠在棒时间显著减少($P < 0.01$), 脂肪间充质干细胞腹腔和静脉给药后7 d($P < 0.01$)和10 d($P < 0.01$, $P < 0.05$)均可显著增加在棒时间, 给药后14 d, 各治疗组小鼠在棒时间均高于模型组, 但无显著差异; ⑥与对照组相比, 地塞米松组胫前肌肌管面积显著减小($P < 0.01$), 脂肪间充质干细胞腹腔和静脉给药后可显著增加胫前肌肌管横截面积($P < 0.05$, $P < 0.01$); ⑦与地塞米松组相比, 脂肪间充质干细胞腹腔和静脉给药可显著抑制MuRF1和Atrogin-1基因表达($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.01$)。结果表明, 脂肪来源间充质干细胞及外泌体可通过抑制肌肉萎缩基因表达, 促进萎缩肌管细胞恢复和生长, 腹腔和静脉注射脂肪来源间充质干细胞均对肌肉减少症小鼠有良好的治疗作用。

关键词: 脂肪间充质干细胞; 肌少症; 细胞治疗; 外泌体; 衰老; 肌肉萎缩; 地塞米松

Therapeutic effects of adipose-derived mesenchymal stem cells and their exosomes on dexamethasone-induced sarcopenia in mice

Yuan Weiyuan^{1,2}, Lei Qinhuai³, Li Xiuqi³, Lu Tiezhu³, Fu Ziwen^{4,5}, Liang Zhili⁵, Ji Shaoyang⁶, Li Yijia^{1,2}, Ren Yu³

¹CiMSC Therapeutics Co., Ltd., Shanghai 200233, China; ²Baoshan Institute of Synthetic Biology and Translational Research, Shanghai 200233, China; ³Mitoch Therapeutics Co., Ltd., Beijing 101319, China; ⁴Miyimi Biotech Co., Ltd., Zhangjiagang 215628, Jiangsu Province, China; ⁵AdvanCell Biotech Co., Ltd., Zhuhai 519060, Guangdong Province, China; ⁶Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

¹上海喜迈思生物医药有限公司, 上海市 200233; ²上海宝山合成生物学转化研究院, 上海市 200233; ³觅投克(北京)生物医学技术有限公司, 北京市 101319; ⁴觅外觅(张家港)生物科技有限公司, 江苏省张家港市 215628; ⁵广东艾万生物科技有限公司, 广东省珠海市 519060; ⁶中国科学院过程工程研究所, 北京市 100190

第一作者: 袁为远, 男, 1993年生, 湖南省张家界市人, 土家族, 2019年南京中医药大学毕业, 硕士, 主要从事细胞治疗研究。

共同第一作者: 雷秦祎, 女, 1994年生, 陕西省渭南市人, 汉族, 2020年甘肃农业大学毕业, 硕士, 主要从事细胞治疗研究。

通讯作者: 李一佳, 博士, 副研究员, 上海喜迈思生物医药有限公司, 上海市 200233; 上海宝山合成生物学转化研究院, 上海市 200233

共同通讯作者: 任宇, 博士, 觅投克(北京)生物医学技术有限公司, 北京市 101319

https://orcid.org/0000-0003-0588-3802 (袁为远)

引用本文: 袁为远, 雷秦祎, 李秀琪, 卢铁柱, 傅子文, 梁志丽, 季韶洋, 李一佳, 任宇. 脂肪来源间充质干细胞及外泌体对地塞米松诱导肌肉减少症小鼠的治疗作用 [J]. 中国组织工程研究, 2026, 30(1):58-67.



Yuan Weiyuan, MS, CiMSC Therapeutics Co., Ltd., Shanghai 200233, China; Baoshan Institute of Synthetic Biology and Translational Research, Shanghai 200233, China

Lei Qinhui, MS, Mitoch Therapeutics Co., Ltd., Beijing 101319, China

Yuan Weiyuan and Lei Qinhui contributed equally to this work.

Corresponding author: Li Yijia, PhD, Associate researcher, CiMSC Therapeutics Co., Ltd., Shanghai 200233, China; Baoshan Institute of Synthetic Biology and Translational Research, Shanghai 200233, China

Co-corresponding author: Ren Yu, PhD, Mitoch Therapeutics Co., Ltd., Beijing 101319, China

Abstract

BACKGROUND: Sarcopenia is an age-related condition characterized by the loss of skeletal muscle mass, strength, and/or physical function. Currently, effective treatments for sarcopenia remain limited. A new therapeutic approach to improve symptoms and prognosis of sarcopenia patients clinically was important.

OBJECTIVE: To explore the effects of canine adipose-derived mesenchymal stem cells and their exosomes on a dexamethasone-induced sarcopenia in mice.

METHODS: Mesenchymal stem cells were isolated and cultured from canine adipose tissue, and identified and functionally evaluated through flow cytometry and differentiation assays for osteogenesis, adipogenesis, and chondrogenesis. Subsequently, exosomes from adipose-derived mesenchymal stem cells were extracted and characterized using transmission electron microscopy, western blot assay, and nanocoulter tracking analysis. *In vitro*, the effects of canine adipose-derived mesenchymal stem cells and their exosomes on myotube growth and the expression of muscle atrophy-related genes were investigated using dexamethasone-induced C2C12 myotube atrophy and aging C2C12 models. *In vivo*, a dexamethasone-induced mouse sarcopenia model was established and received intraperitoneal or intravenous injection of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. Therapeutic efficacy was assessed through mouse rotarod performance, histopathological analysis, and muscle atrophy-related genes testing.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The isolated canine adipose-derived mesenchymal stem cells highly expressed CD73, CD90, and CD105, and lowly expressed MHC-II, CD14, CD19, CD34, and CD45, and successfully differentiated into osteoblasts, adipocytes, and chondrocytes *in vitro*. (2) The adipose-derived mesenchymal stem cells-derived exosomes met the identification criteria in terms of particle size, electron microscopy morphology, and positive expression of specific markers. (3) Compared to the dexamethasone-induced C2C12 atrophy group, treatment with adipose-derived mesenchymal stem cells and their exosomes promoted the recovery and growth of myotubes, inhibited the expression of muscle atrophy-related genes MuRF1 and Atrogin-1. (4) Compared to the aging C2C12 group, adipose-derived mesenchymal stem cells and their exosomes significantly enhanced the recovery and growth of aged muscle tubes in aging cells. (5) Compared to the control group, the rotarod time in dexamethasone-induced sarcopenia model mice was significantly decreased ($P < 0.01$). After 7 days ($P < 0.01$, $P < 0.01$) and 10 days ($P < 0.01$, $P < 0.05$) of adipose-derived mesenchymal stem cells treatment via intraperitoneal and intravenous injection, rotarod time was significantly increased, respectively. After 14 days, all treatment groups showed longer rotarod times than the model group, although with no significant differences between them. (6) Compared to the control group, the cross-sectional area of anterior tibial muscle in the model group was significantly reduced ($P < 0.01$), and it was significantly increased after intraperitoneal and intravenous administration of adipose-derived mesenchymal stem cells ($P < 0.05$, $P < 0.01$). (7) Compared to the model group, intraperitoneal and intravenous administration of adipose-derived mesenchymal stem cells significantly inhibited the mRNA expression of MuRF1 and Atrogin-1 genes ($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.01$). The results indicated that adipose-derived mesenchymal stem cells and their exosomes promoted recovery and growth of atrophic myotube cells by inhibiting the expression of muscle atrophy-related genes, and both intraperitoneal and intravenous administration of adipose-derived mesenchymal stem cells provided good therapeutic effects on sarcopenia in mice.

Key words: adipose-derived mesenchymal stem cell; sarcopenia; cell therapy; exosome; aging; muscle atrophy; dexamethasone

How to cite this article: YUAN WY, LEI QH, LI XQ, LU TZ, FU ZW, LIANG ZL, JI SY, LI YJ, REN Y. Therapeutic effects of adipose-derived mesenchymal stem cells and their exosomes on dexamethasone-induced sarcopenia in mice. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2026;30(1):58-67.

0 引言 Introduction

肌肉减少症(以下简称肌少症)是一种增龄相关的骨骼肌肉量减少、肌肉力量下降和/或躯体功能减退的老年性疾病^[1]。该病最早由 IRWIN ROSENBERG 于 1989 年提出^[2], 并自 2010 年起, 国内外分别出台了一系列关于肌少症的共识^[1, 3-5]。2016 年, 世界卫生组织报告肌少症已成为全球范围内影响老年人健康的主要问题之一, 并正式定义肌少症为一种疾病, 代码为 ICD-10-CM(M62.84)^[6]。随着疾病的发展, 肌少症不仅影响老年人的日常生活能力, 还增加了跌倒和骨折的风险, 给社会医疗保健系统带来沉重负担。

肌少症的发病机制复杂, 目前尚未完全了解, 已报道的可能因素包括细胞衰老、氧化应激、线粒体功能障碍及慢性炎症等^[7]。目前, 肌少症唯一治疗策略是改变生活方式、增加运动和补充营养^[8], 但治疗效果有限, 且对于长期卧床或年纪较大的患者来说, 治疗需求无法得到充分满足^[9-10]。因此, 迫切需要开发一种新型、安全、有效的治疗方法, 以改善肌少症患者的预后。

随着再生医学的快速发展, 间充质干细胞因具有多向分化潜能、自我更新能力、免疫调节和抗炎等作用而成为治疗多种疾病的新方法。已有研究表明间充质干细胞在肌

肉萎缩类疾病中具有潜在的治疗作用, 间充质干细胞治疗后可显著改善肌肉萎缩和功能障碍^[11-12], 并在肌肉稳态维持中发挥重要作用^[13-14]。最新临床研究显示, 脐带、骨髓和脂肪来源间充质干细胞在衰老引起的虚弱及炎症疾病中展示了良好的有效性和安全性^[15-19], 但目前尚无间充质干细胞治疗肌少症的临床研究。临床前研究显示, 脐带来源间充质干细胞可抑制肌肉萎缩^[10-11]; 骨髓来源间充质干细胞可有效抑制肌肉萎缩^[20-21]、增强骨骼肌质量^[22]、促进肌肉再生^[23]; WANG 等^[24]验证了脐带来源间充质干细胞可显著改善后肢悬挂诱导的小鼠肌肉减少症状, 主要通过恢复骨骼肌耐力、减少细胞凋亡及抑止炎症反应来发挥作用。此外, WANG 等^[25]研究表明脐带来源间充质干细胞改善了肌少症小鼠的肌肉功能障碍。但目前仍缺少脂肪来源间充质干细胞治疗肌少症的相关研究。

外泌体(exosomes)作为细胞间信息通讯的重要递质, 具有良好的生物学活性、生物相容性、低免疫原性和低毒性^[26], 近年来在医学领域受到广泛关注。外泌体是细胞分泌的纳米级囊泡, 含有蛋白质、脂质和核酸等生物活性分子, 可调节受体细胞的多种功能, 如炎症反应、细胞凋亡和血管生成, 以及促进组织修复和再生等。在肌肉相关性疾病治疗中, 间充质干细胞来源外泌体已显示出巨大的潜力^[27]。脐带

来源间充质干细胞外泌体可缓解肌肉萎缩^[11]；脂肪来源间充质干细胞外泌体可减少肌肉损伤^[28-29]、促进肌肉再生^[30]；骨髓来源间充质干细胞外泌体可缓解肌肉损伤^[31]、肌肉萎缩和衰老虚弱^[32-33]。在肌少症研究中，骨髓来源间充质干细胞外泌体可有效缓解老年肌少症小鼠的肌肉萎缩^[34]；脐带来源间充质干细胞的培养液（间充质干细胞分泌组）可显著改善D-半乳糖诱导的肌少症相关生物标志物表达^[35]。然而，目前仍缺少脂肪来源间充质干细胞外泌体治疗肌少症的相关研究。

地塞米松是一种常见的糖皮质激素类药物，具有抗炎、免疫抑制作用，广泛用于临床治疗各种疾病。然而，长期使用地塞米松类药物会导致肌肉萎缩和肌肉功能障碍，因此常用于建立肌肉萎缩模型。该研究通过地塞米松诱导构建了体外肌管细胞萎缩模型和小鼠肌少症模型，旨在初步探索犬脂肪来源间充质干细胞（adipose-derived mesenchymal stem cells, AMSCs）及外泌体（AMSCs-derived exosome, AMSCs-exo）对肌少症的治疗效果及作用机制。研究结果有望为肌少症的治疗提供新的思路，并为患者带来新的希望。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞学实验、体内药效学实验。

1.2 时间及地点 实验于2022年5月至2023年12月在觅投克（北京）生物医学技术有限公司研发中心、中国科学院过程工程研究所和天津天诚新药评价有限公司完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 3岁龄健康雌性比格犬1只，体质量约为7.1 kg，购自天津天诚新药评价有限公司，许可证号：SCXK（沪）2017-0006，动物质量合格证号：20170006000163。8-10周龄雄性SPF级C57BL/6J小鼠35只，体质量22-25 g，购自斯贝福（北京）生物技术有限公司，许可证号：SCXK（京）2019-0010，动物质量合格证号：11032422110669174。所有小鼠均饲养在天津天诚新药评价有限公司实验动物中心无病原体的环境中，温度（23±2）℃，湿度50%-60%，12 h光照/12 h黑暗交替循环，保证所有动物能够自由饮水及饮食。

动物实验遵循研究所实验管理条例，且获得天津天诚新药评价有限公司动物关怀及使用委员会（IACUC）批准，批准号为2022092501，严格遵循实验室动物护理和使用指导方针。

1.3.2 实验细胞、试剂 小鼠成肌细胞C2C12（CL-0044，武汉普诺赛生命科技有限公司，中国）；生理盐水（2301253402，石家庄四药有限公司，中国）；Dulbecco's磷酸盐缓冲液（DPBS）（B210KJ，上海源培生物科技股份有限公司，中国）；磷酸盐缓冲液（PBS）（B320KJ，上海源培生物科技股份有限公司，中

国）；苏木精染液（C220801、C230710，珠海贝索生物技术有限公司，中国）；伊红染液（醇溶性，C221103、C230704，珠海贝索生物技术有限公司，中国）；小鼠用地塞米松（D4902，Sigma，美国）；细胞用地塞米松试剂（D1756，北京兰博利德商贸有限公司，中国）；II型胶原酶（C2-BIOC，Sigma，美国）；胎牛血清（C04001-500，VivaCell，德国）；DMEM高糖培养基（C3113-0500，武汉普诺赛生命科技有限公司，中国）；马血清（164215，武汉普诺赛生命科技有限公司，中国）；0.25%胰酶+EDTA（25200056，Gibco，美国）；青霉素/链霉素（PB180120，武汉普诺赛生命科技有限公司，中国）；成脂分化培养基（PD-006，武汉普诺赛生命科技有限公司，中国）；成骨分化培养基（PD-007，武汉普诺赛生命科技有限公司，中国）；成骨细胞矿化结节染色试剂盒（茜素红S法，C0148S，碧云天生物技术有限公司，中国）；阿利新蓝-核固红染色试剂盒（pH2.5，C0155S，碧云天生物技术有限公司，中国）；油红O（0684，北京兰博利德商贸有限公司，中国）；PC5.5-CD73单克隆抗体（561260，BD Pharmingen，美国）；FITC-CD90单克隆抗体（555595，BD Pharmingen，美国）；APC-CD105单克隆抗体（17-1057-42，Thermo Fisher Scientific，美国）；FITC-MHC-II单克隆抗体（11-5909-42，Thermo Fisher Scientific，美国）；FITC-CD14单克隆抗体（MA1-82074，Thermo Fisher Scientific，美国）；FITC-CD19单克隆抗体（11-0193-82，Thermo Fisher Scientific，美国）；FITC-CD34单克隆抗体（11-0341-82，Thermo Fisher Scientific，美国）；FITC-CD45单克隆抗体（11-5450-42，Thermo Fisher Scientific，美国）；兔抗CD9单克隆抗体（A19027，ABclonal，中国）；兔抗CD63单克隆抗体（A19023，ABclonal，中国）；兔抗TSG101单克隆抗体（A5789，ABclonal，中国）；兔抗Calnexin单克隆抗体（A4846，ABclonal，中国）；聚乙二醇（76293，MERCK，德国）；醋酸双氧钼（GZ02625-5，河南欣锐，中国）；RNA Easy Fast动物组织/细胞总RNA提取试剂盒 [DP451，天根生化科技（北京）有限公司，中国]；反转录试剂盒（F0202A，北京兰博利德商贸有限公司，中国）；2×Realab Green PCR Fast mixture（R0202，北京兰博利德商贸有限公司，中国）。

1.3.3 实验仪器 二氧化碳培养箱（MCO-18AIC，SANYO，日本）；流式细胞仪（CytoFLEX S，BECKMAN COULTER，美国）；水浴锅（XMTD-600，长风，中国）；超净工作台（BSC-1500-II-A2-X，BIOBSAE，中国）；倒置荧光显微镜（XD，SOPTOP，中国）；电泳仪（EPS300，天能，中国）；凝胶成像系统（5200SF，天能，中国）；透射电子显微镜（HT-7700，Hitachi，日本）；小鼠转棒疲劳仪（ZH-YLS-4C，安徽正华生物仪器设备公司，中国）；

Nanocoulter G 纳米库尔特粒度仪 (RESUN-G02, 瑞芯智造, 中国); 实时荧光定量 PCR 系统 (QuantStudio™ 5, Applied Biosystems, 美国)。

1.4 实验方法

1.4.1 犬 AMSCs 的提取与培养 在无菌手术台上取 3 岁龄健康比格犬腹股沟处皮下脂肪 (1.0–2.0 g), DPBS 清洗后, 用已灭菌解剖剪将组织团块剪碎, 加入 II 型胶原酶 (1 mg/mL) 于 37 °C 消化 1 h, 随后 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 细胞沉淀再次清洗、过滤后用间充质干细胞培养液重悬, 计数后培养, 待细胞融合度达 80%–90% 后传代。

1.4.2 流式细胞术鉴定 AMSCs 取 1×10^6 第 5 代 AMSCs 于若干 1.5 mL EP 管中, 1 000 r/min 离心 5 min 后弃去上清, 向各管中加入 200 μ L 5% 牛血清白蛋白冰上封闭 40 min, 随后 1 000 r/min 离心 5 min 弃去上清, 再分别向各管中加入 200 μ L 1% 牛血清白蛋白稀释好的抗体 CD73(5 μ L/Test)、CD90(5 μ L/Test)、CD105(5 μ L/Test)、MHC-II (5 μ L/Test)、CD14(5 μ L/Test)、CD19(0.5 μ L/Test)、CD34(5 μ L/Test)、CD45 (5 μ L/Test) 及对应的同型抗体进行免疫标记反应, 混合均匀后冰上孵育 40 min, 用含 0.1% 牛血清白蛋白的 DPBS 洗涤 2 次, 最后用 500 μ L 含 0.1% 牛血清白蛋白的 DPBS 重悬细胞, 使用 CytoFLEX 流式细胞仪及 FLOWJO 分析软件对各样本进行检测及数据分析。

1.4.3 AMSCs 三系分化能力 第 5 代 AMSCs 以 2×10^4 / cm^2 密度接种 6 孔板用于成骨和成脂肪细胞分化实验, 待细胞 90% 融合后换成骨和成脂肪分化培养液, 每隔 3 d 换液, 21 d 后进行茜素红、油红 O 染色鉴定。第 5 代 AMSCs 以 5×10^5 / 管密度接种于 15 mL 离心管用于成软骨分化实验, 细胞接种后离心 (1 000 r/min, 5 min) 去上清, 用 500 μ L 成软骨分化液重悬, 再次离心后放入培养箱进行成软骨分化, 21 d 后进行阿利新蓝染色鉴定。按照茜素红、阿利新蓝、油红 O 染色试剂盒说明书操作并拍照观察。

1.4.4 AMSCs-exo 提取 收集第 5 代 AMSCs 培养上清, 以 4 500–5 000 \times g 离心 25–35 min, 沉淀上清液中的细胞碎片, 将离心后的上清液转移至新容器中, 得到外泌体粗体液, 使用微滤膜过滤粗体液, 保留滤液, 聚乙二醇与水配制成质量浓度 180–240 g/L 的聚乙二醇水溶液, 将聚乙二醇水溶液与滤液 1 : 1 混匀, 低温过夜沉淀, 24 h 后再以 8 000–12 000 \times g 离心 50–80 min, 弃去上清, 加入 1.5–2.0 mL PBS 重悬沉淀, 从而得到纯化外泌体, 分装后 –80 °C 冰箱保存。

1.4.5 AMSCs-exo 鉴定 ①外泌体形态: 吸取 10 μ L 外泌体滴加在铜网沉淀 1 min, 滤纸吸去浮液, 吸取 10 μ L 醋酸双氧铀滴加在铜网沉淀 1 min, 用滤纸吸去浮液, 常温干燥数分钟,

再使用透射电子显微镜观察并拍摄外泌体的形态。②外泌体的纳米粒径分布及浓度: 从 –80 °C 冰箱中取出外泌体样本, 室温融化后, 立即低速离心 5 s, 混匀外泌体悬液, 取 20 μ L 外泌体加入到含有 980 μ L PBS 的离心管中, 混合均匀, 随后使用 1 mL 注射器吸取稀释后的外泌体悬液进行上样, 利用库尔特纳米单颗粒检测技术 (电阻脉冲传感法) 进行粒径、颗粒浓度检测。③外泌体标志蛋白表达: 使用 Western blot 检测外泌体阳性标志物 (CD9、CD63、TSG101) 和阴性标志物 (Calnexin) 的表达。

1.4.6 C2C12 肌管萎缩模型与肌管衰老模型的建立 ①肌管萎缩模型: 取 C2C12 细胞 (第 5–10 代), 按 5×10^3 / cm^2 密度接种于 6 孔板, 在含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中培养, 待细胞融合度达 80% 以上时, 更换含体积分数 2% 马血清的 DMEM 高糖培养基持续培养 6 d 后可见肌管分化成型。然后将细胞分 4 组干预: 对照组继续用含体积分数 2% 马血清的 DMEM 高糖培养基培养 3 d; 肌管萎缩组加入 100 μ mol/L 地塞米松诱导 3 d; AMSCs 组和 AMSCs-exo 组在加入 100 μ mol/L 地塞米松的同时加入 AMSCs (4×10^5 / 孔) 或 AMSCs-exo (3×10^9 particles/mL) [AMSCs 或 AMSCs-exo 重悬于 2 mL 含体积分数 2% 马血清的 DMEM 高糖培养基中混合均匀后再加入各孔中] 共同孵育 3 d, 培养结束后镜下观察。②肌管衰老模型: C2C12 培养至第 25 代后, 按 5×10^3 / cm^2 密度接种于 6 孔板, 在含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中培养至细胞融合度达 80% 以上时, 更换含体积分数 2% 马血清的 DMEM 高糖培养基持续培养 6 d。然后将细胞分 3 组干预: 衰老对照组再继续用含体积分数 2% 马血清的 DMEM 高糖培养基培养 3 d; AMSCs 组和 AMSCs-exo 组加入 AMSCs (4×10^5 / 孔) 或 AMSCs-exo (3×10^9 particles/mL) [AMSCs 或 AMSCs-exo 重悬于 2 mL 含体积分数 2% 马血清的 DMEM 高糖培养基中混合均匀后再加入各孔中] 共同孵育 3 d, 培养结束后镜下观察。另外, 第 5 代 C2C12 细胞按 5×10^3 / cm^2 密度接种于 6 孔板, 在含有体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中培养至细胞融合度达 80% 以上时, 更换含体积分数 2% 马血清的 DMEM 高糖培养基持续培养 6 d, 再继续用含体积分数 2% 马血清的 DMEM 高糖培养基持续培养 3 d, 设置为健康对照组。

1.4.7 RT-qPCR 检测肌肉萎缩相关基因的 mRNA 表达 使用 RNA Easy Fast 动物组织 / 细胞总 RNA 提取试剂盒分别提取各组 C2C12 细胞和小鼠胫前肌组织总 RNA, 随后使用反转录试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA, 再使用 2 \times Realab Green PCR Fast mixture 在 QuantStudio™ 5 实时荧光定量 PCR 系统上进行 qPCR, 详细操作见试剂盒说明书。引物序列见表 1。反应

条件为: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火及延伸 30 s, 共 40 个循环。GAPDH 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 mRNA 相对表达水平。

表 1 | 基因引物序列
Table 1 | Gene primer sequences

基因	上游引物 (5'-3')	下游引物 (5'-3')
MuRF1	GCT ACC TTC CTC TCA AGT GC	CCT CTG CTA TGT GTT CTA AGT CC
Atrogin-1	AGA ACA GCA AAA CCA AAA CTC AG	GTC GAG AAG TCC AGT CTG TTG
GAPDH	CTT TGT CAA GCT CAT TTC CTG G	TCT TGC TCA GTG TCC TTG C

1.4.8 动物分组 C57BL/6J 小鼠适应性饲养 1 周后, 35 只小鼠随机分为以下 4 组: ①对照组 ($n=5$); ②模型组 ($n=10$); ③ AMSCs 腹腔注射治疗组 (AMSCs-i.p. 组, $n=10$); ④ AMSC 静脉注射治疗组 (AMSCs-i.v. 组, $n=10$)。除对照组外, 其余各组小鼠均进行造模处理。小鼠成功造模后, AMSCs-i.p. 组每只小鼠腹腔注射 200 μ L 含 1×10^6 个 AMSCs 的细胞悬液; AMSCs-i.v. 组每只小鼠尾静脉注射 200 μ L 含 1×10^6 个 AMSCs 的细胞悬液; 对照组和模型组小鼠尾静脉注射等体积的生理盐水。在所有实验结束后, 各组小鼠进行 CO₂ 安乐死后, 收集对应组织进行后续实验。

1.4.9 地塞米松诱导建立肌少症模型 基于 WANG 等^[36]前期研究, 并由天津天诚新药评价有限公司进行改良。使用生理盐水提前配制地塞米松溶液 (地塞米松使用终质量浓度为 1 mg/mL)。将配制好的地塞米松溶液按照 20 mL/kg 的剂量经由小鼠腹腔注射进行造模, 每天按时注射 1 次, 连续注射 14 d, 通过转棒疲劳实验评估造模效果。

1.4.10 转棒疲劳实验 每日观察各组小鼠的生理状态, 在正式检测之前, 将动物置于小鼠转棒式疲劳仪中进行模拟适应, 经过一两次简单训练 (300 s/次), 小鼠可逐渐适应转棒运动。在给药后第 7, 10, 14 天进行正式检测, 转速由 5 r/min 开始, 匀速增加, 直至 20 r/min, 最长观察 300 s。自小鼠在转棒上保持平衡并运动开始计时, 直至跌落转棒, 记录小鼠的在棒停留时间。实验期间, 每只小鼠需重复检测 3 次, 每次检测间隔时间为 10 min, 最终取平均值进行数据分析。

1.4.11 苏木精-伊红染色 取各组小鼠胫前肌, 梯度乙醇脱水后进行石蜡包埋处理, 将蜡块进行切片, 切片厚度约为 5 μ m, 切好的薄片置于 40 °C 温水浸泡, 随后用载玻片装片, 石蜡切片晾干后置于二甲苯 I、二甲苯 II 中各浸泡 10 min, 依次置于梯度乙醇 (体积分数为 100%, 95%, 85%, 70%, 50%) 中各浸泡 5 min, 置于蒸馏水中浸泡 5 min, 共清洗 2 次, 置于苏木精染液中浸泡 5 min, 使用流水冲洗 5 min, 使用 1% 盐酸乙醇分化 10 s, 用流水冲洗 2 min, 置于伊红染液中浸泡 3 min, 将切片依次置于梯度乙醇 (体积分数为 50%, 70%, 85%, 95% I, 95% II, 100% I, 100% II) 中各浸泡

1 min, 置于二甲苯 I 和 II 中浸泡 5 min, 通风橱中晾干各切片, 使用中性树脂进行封固, 置于显微镜下观察拍照, 通过 Image J 软件标记胫骨前肌横截面积, 进行数据分析。

1.5 主要观察指标 ① AMSCs 及 AMSCs-exo 体外抑制肌细胞萎缩能力; ② 体外肌细胞萎缩相关基因表达; ③ 小鼠转棒疲劳行为能力; ④ 小鼠肌肉组织病理变化; ⑤ 小鼠肌肉萎缩相关基因表达。

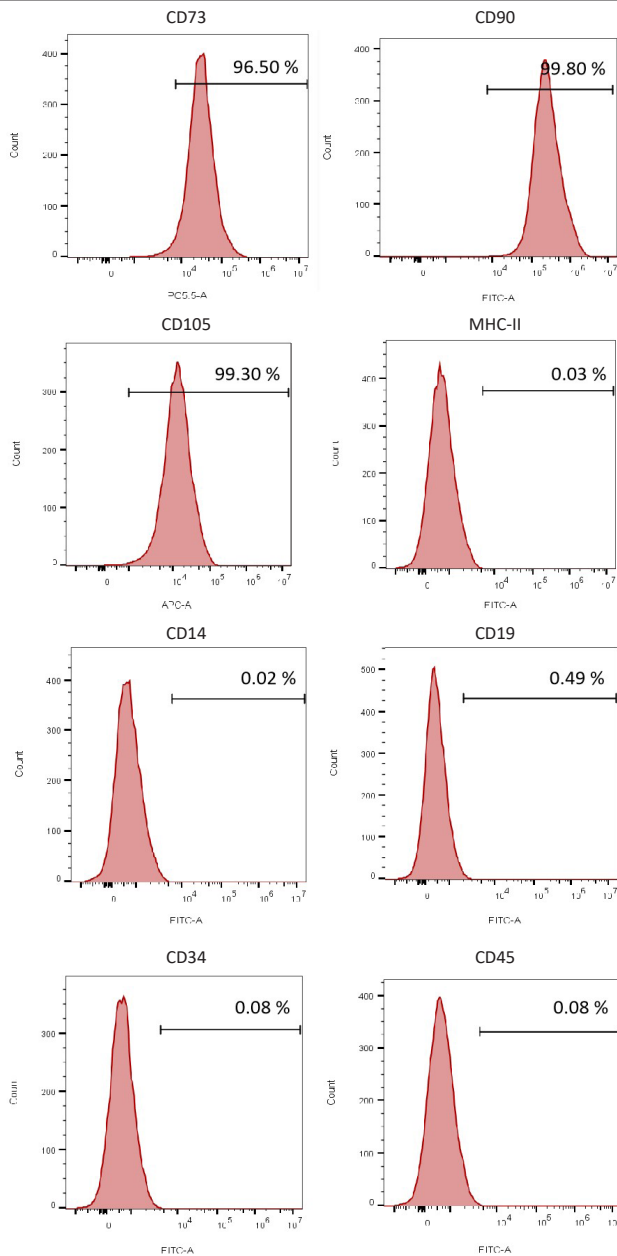
1.6 统计学分析 实验数据以均值 \pm 标准误 (Mean \pm SEM) 表示, 使用 GraphPad Prism 9.5 软件进行统计。多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 两组间比较采用 *t* 检验进行分析。P < 0.05 为差异有显著性意义。文章统计学方法已通过中国科学院过程工程研究所生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 AMSCs 鉴定结果 流式细胞术结果显示, AMSCs 阳性标志物 CD73、CD90、CD105 的阳性百分比分别为 96.50%, 99.80%, 99.30%, 阴性指标 MHC-II、CD14、CD19、CD34、CD45 的阳性百分比分别为 0.03%, 0.02%, 0.49%, 0.08%, 0.08%, 以上数据表明分离培养的 AMSCs 纯度达到 95% 以上, 状态良好, 见图 1。AMSCs 三系分化结果显示, 经茜素红染色可见红色钙结节, 表明具有成骨分化能力; 经油红 O 染色可见红色脂滴, 表明具有成脂分化能力; 经阿利新蓝染色可见浅蓝色软骨, 表明具有成软骨分化能力, 见图 2。以上结果表明, 分离培养的 AMSCs 具有良好的分化潜能。

2.2 AMSCs-exo 鉴定结果 纳米库尔特粒度仪检测结果显示, AMSCs-exo 粒径分布为 50-100 nm, 平均粒径为 60 nm, 且呈单峰, 提示所获得的外泌体纯度较高。Western blot 结果显示, 与 AMSCs 相比, 分离制备的 AMSCs-exo 高表达 CD9、CD63、TSG101, 低表达 Calnexin, 符合外泌体的表征验证。透射电子显微镜观察到 AMSCs-exo 呈现不聚团的具有清晰膜结构的茶托状或杯状结构, 边缘清晰。以上结果表明, 已成功分离纯化获得高质量的外泌体, 见图 3。

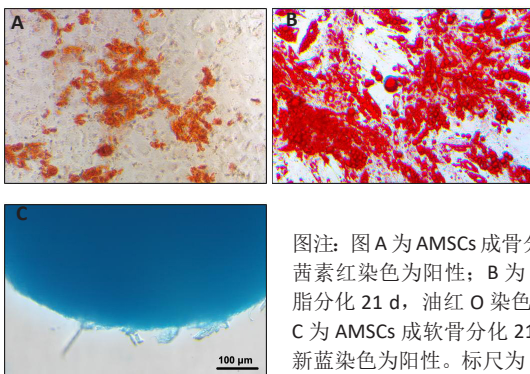
2.3 AMSCs 和 AMSCs-exo 可逆转地塞米松诱导的体外肌肉细胞萎缩 C2C12 细胞使用地塞米松刺激后, 肌管直径及面积显著减少, 提示体外肌管萎缩模型构建成功。使用 AMSCs 和 AMSCs-exo 进行处理后, 可促进肌管的恢复和生长, 见图 4。与对照组相比, 肌管萎缩组肌肉萎缩相关基因 MuRF1 和 Atrogin-1 mRNA 表达显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.05$), AMSCs 和 AMSCs-exo 处理后可显著抑制 MuRF1 和 Atrogin-1 mRNA 表达 ($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.05$), 见图 5。以上数据表明 AMSCs 及 AMSCs-exo 均可缓解地塞米松诱导的肌管细胞萎缩, 抑制肌肉萎缩相关基因表达。



图注: CD73、CD90、CD105 表达为阳性; MHC-II、CD14、CD19、CD34、CD45 表达为阴性。

图 1 | 脂肪来源间充质干细胞 (AMSCs) 的流式细胞学鉴定

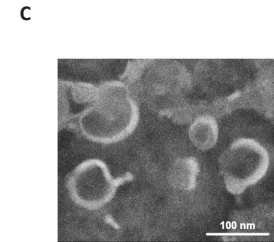
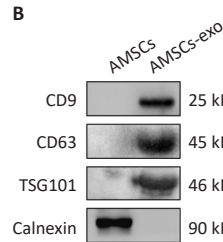
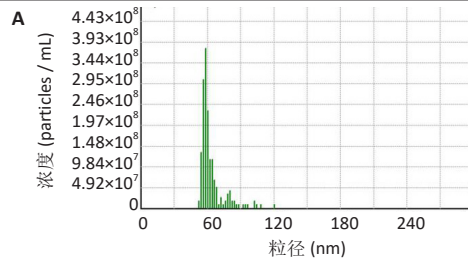
Figure 1 | Flow cytometric identification of adipose-derived mesenchymal stem cells (AMSCs)



图注: 图 A 为 AMSCs 成骨分化 21 d, 茜素红染色为阳性; B 为 AMSCs 成脂分化 21 d, 油红 O 染色为阳性; C 为 AMSCs 成软骨分化 21 d, 阿利新蓝染色为阳性。标尺为 100 μm。

图 2 | 脂肪来源间充质干细胞 (AMSCs) 三系分化鉴定

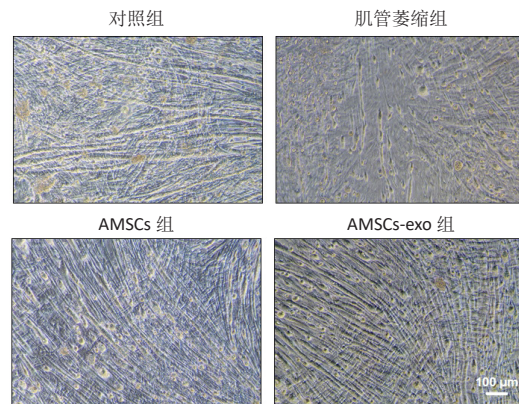
Figure 2 | Identification of trilineage differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells (AMSCs)



图注: 图 A 为纳米库尔特粒度仪检测 AMSCs-exo 粒径; B 为 Western blot 检测外泌体阳性标志物 (CD9、CD63、TSG101) 和阴性标志物 Calnexin 表达; C 为透射电子显微镜观察外泌体形态, 标尺为 100 nm。

图 3 | 脂肪间充质干细胞来源外泌体 (AMSCs-exo) 鉴定

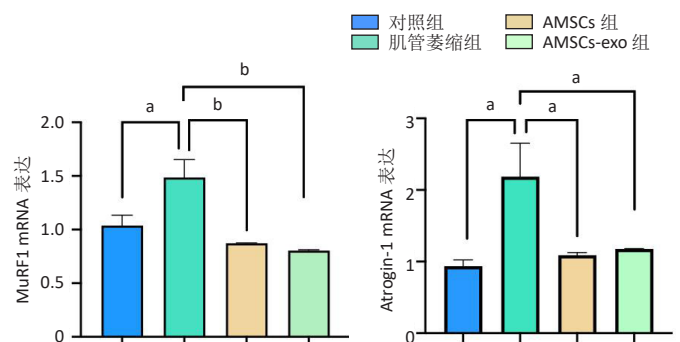
Figure 3 | Identification results of adipose-derived mesenchymal stem cells-derived exosomes (AMSCs-exo)



图注: C2C12 细胞给予地塞米松刺激后, 肌管直径及面积显著减少; AMSCs 和 AMSCs-exo 处理后可促进肌管的恢复和生长。标尺为 100 μm。

图 4 | 脂肪间充质干细胞 (AMSCs) 及外泌体 (AMSCs-exo) 逆转肌管细胞萎缩

Figure 4 | Adipose-derived mesenchymal stem cells (AMSCs) and their exosomes (AMSCs-exo) reversed myotube cell atrophy



图注: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ 。

图 5 | 脂肪间充质干细胞 (AMSCs) 及外泌体 (AMSCs-exo) 对 C2C12 细胞肌肉萎缩相关基因 MuRF1 和 Atrogin-1 的影响

Figure 5 | Effects of adipose-derived mesenchymal stem cells (AMSCs) and their exosomes (AMSCs-exo) on muscle atrophy-related genes MuRF1 and Atrogin-1 in C2C12 cells

2.4 AMSCs 和 AMSCs-exo 可缓解肌管细胞衰老 体外培养 C2C12 细胞至衰老状态 (第 25 代) 后进行肌管分化。明场结果显示,与健康对照组 (第 5 代 C2C12 细胞) 相比,衰老对照组 (第 25 代 C2C12 细胞) 肌管不易形成,给予 AMSCs 和 AMSCs-exo 处理后,可明显恢复衰老细胞中肌管的数量及形态,见图 6。以上结果表明 AMSCs 及 AMSCs-exo 均可缓解肌管细胞衰老。

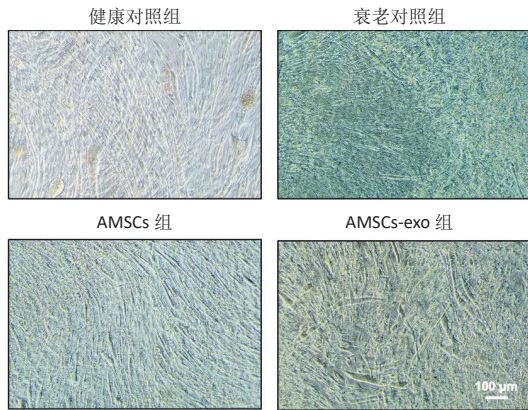


图 6 | 脂肪间充质干细胞 (AMSCs) 及外泌体 (AMSCs-exo) 缓解肌管细胞衰老 (标尺为 100 μm)

Figure 6 | Adipose-derived mesenchymal stem cells (AMSCs) and their exosomes (AMSCs-exo) alleviated myotube cell aging (scale bar: 100 μm)

2.5 实验动物数量分析 实验选用 C57BL/6J 小鼠 35 只,造模及给药后无死亡,全部进入结果分析。

2.6 AMSCs 腹腔和静脉给药可增加肌少症小鼠肌肉耐力 通过转棒疲劳实验评估肌少症小鼠药物治疗后的肌肉耐力行为变化。在给药前,与对照组相比,模型组、AMSCs-i.p. 组和 AMSCs-i.v. 组小鼠的在棒时间均显著降低 ($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.01$), 分别为 (71.3±5.5) s, (71.4±5.6) s, (70.9±5.2) s, 提示地塞米松诱导的小鼠肌少症模型构建成功。给药后 7 d, 与对照组相比,模型组小鼠的在棒时间为 (74.5±5.0) s, 差异有显著性意义 ($P < 0.01$), 提示肌少症小鼠肌肉耐力下降。与模型组相比, AMSCs-i.p. 组和 AMSCs-i.v. 组小鼠的在棒时间显著增加 ($P < 0.01$, $P < 0.01$), 分别为 (146.0±15.7) s, (112.5±11.1) s; 给药后 10 d, 与模型组相比, AMSCs-i.p. 组和 AMSCs-i.v. 组小鼠的在棒时间也显著增加 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 分别为 (150.5±12.1) s, (166.9±25.0) s; 给药后 14 d, AMSCs-i.p. 组和 AMSCs-i.v. 组小鼠的在棒时间 [(173.5±26.8) s, (142.5±17.7) s] 虽高于模型组,但无明显差异 ($P > 0.05$), 见表 2。

表 2 | 脂肪来源间充质干细胞腹腔注射 (AMSCs-i.p.) 和静脉注射 (AMSCs-i.v.) 对肌少症小鼠在棒时间的影响 (均值 ± 标准误, s)
Table 2 | Effects of intraperitoneal injection (AMSCs-i.p.) and intravenous injection (AMSCs-i.v.) of adipose-derived mesenchymal stem cells on sarcopenia mice at stick time

组别	n	给药前	给药后 7 d	给药后 10 d	给药后 14 d
对照组	5	179.2±24.4	229.6±19.1	247.9±29.5	211.2±31.2
模型组	10	71.3±5.5 ^a	74.5±5.0 ^a	99.7±10.6 ^a	139.4±18.6
AMSCs-i.p. 组	10	71.4±5.6 ^a	146.0±15.7 ^c	150.5±12.1 ^c	173.5±26.8
AMSCs-i.v. 组	10	70.9±5.2 ^a	112.5±11.1 ^c	166.9±25.0 ^b	142.5±17.7

表注: 与对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$ 。

2.7 AMSCs 腹腔和静脉给药促进肌少症小鼠肌肉恢复 苏木精-伊红染色结果显示,与对照组相比,模型组胫前肌肌管面积显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组相比, AMSCs-i.p. 组和 AMSCs-i.v. 组给药后均可显著增加胫前肌肌管面积 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 这与增强肌少症小鼠的肌肉耐力直接相关, 见图 7。与对照组相比,模型组胫前肌肌肉萎缩相关基因 MuRF1 和 Atrogin-1 mRNA 表达显著升高 ($P < 0.01$, $P < 0.01$), AMSCs-i.p. 组和 AMSCs-i.v. 组给药后可显著抑制 MuRF1 和 Atrogin-1 mRNA 表达 ($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.01$), 见图 8。以上结果表明, AMSCs-i.p. 和 AMSCs-i.v. 给药后可显著促进肌少小鼠的肌肉恢复和生长, 抑制肌肉萎缩相关基因表达。

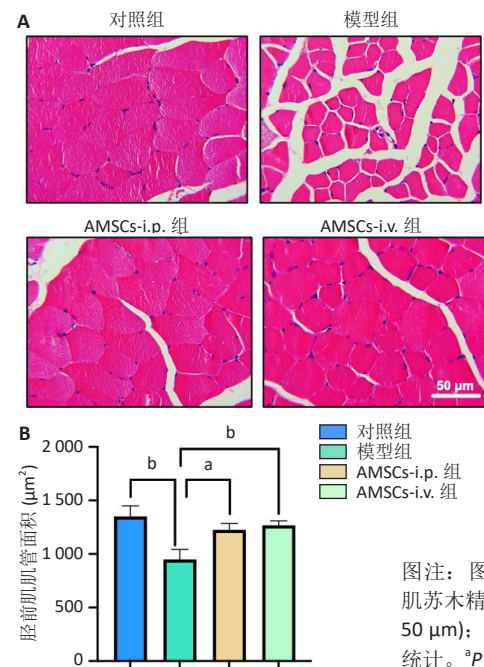
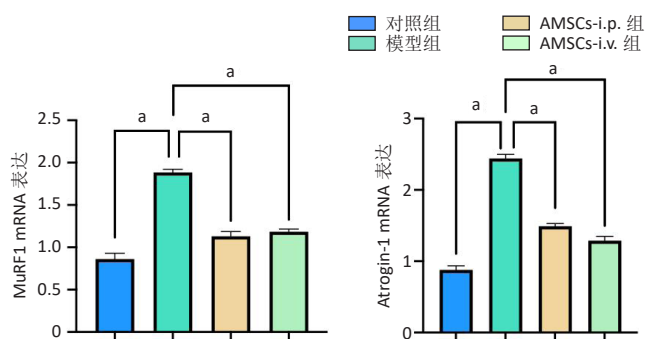


图 7 | 脂肪来源间充质干细胞腹腔注射 (AMSCs-i.p.) 和静脉注射 (AMSCs-i.v.) 治疗后肌少症小鼠胫前肌病理变化

Figure 7 | Pathological changes in the tibialis anterior muscle of sarcopenic mice after intraperitoneal injection (AMSCs-i.p.) and intravenous injection (AMSCs-i.v.) of adipose-derived mesenchymal stem cells



图注: ^a $P < 0.01$ 。

图 8 | 脂肪来源间充质干细胞腹腔注射 (AMSCs-i.p.) 和静脉注射 (AMSCs-i.v.) 对肌少症小鼠肌肉萎缩相关基因 MuRF1 和 Atrogin-1 的影响

Figure 8 | Effects of intraperitoneal injection (AMSCs-i.p.) and intravenous injection (AMSCs-i.v.) of adipose-derived mesenchymal stem cells on the expression of the muscular atrophy-related genes MuRF1 and Atrogin-1 in sarcopenic mice

3 讨论 Discussion

肌少症是一种典型的老年性疾病，特征为骨骼肌质量、功能和表现显著下降^[1, 37]。肌少症显著降低了老年人的生活质量，特别是对行动不便和长期住院的患者^[38]，也增加了再入院率及死亡率^[39]，给患者家庭和社会公共卫生系统带来了巨大的压力。适当规律的运动及营养补充是肌少症的主要治疗方法，但疗效十分有限^[40-41]，目前仍缺乏更有效的治疗方式。因此，积极探索具有良好治疗作用的新型疗法，对于肌少症患者具有重要意义。

近年来，间充质干细胞因具有多种生物学活性、低免疫原性、易获取和培养以及在多种疾病中的广泛治疗潜力，成为基础研究和临床应用的热点^[42-43]。最新临床研究显示，脐带来源间充质干细胞 (ClinicalTrials.gov. 注册号: NCT04314011)^[45]、骨髓来源间充质干细胞 (ClinicalTrials.gov. 注册号: NCT03169231)^[46]、NCT02065245^[18-19]均是治疗衰老虚弱的安全有效方法，脂肪来源间充质干细胞 (ClinicalTrials.gov. 注册号: NCT05827757)对衰老引起的炎症具有良好的治疗作用^[47]。在临床前研究中，脐带、骨髓来源间充质干细胞在肌肉相关性疾病中均有报道，但目前仍缺乏脂肪来源间充质干细胞在肌少症中的研究。为了弥补这部分的空白，该研究首次在体内外水平评估脂肪来源间充质干细胞在肌少症中的疗效。该研究从犬脂肪中分离培养出 AMSCs，并对 AMSCs 的特异性标志物及多向分化潜能 (骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞) 进行了表征及验证，所有结果均符合国际细胞治疗协会 (ISCT) 提出的间充质干细胞应满足的基本要求^[44]，为后续药效研究提供重要支撑。

间充质干细胞主要通过旁分泌反应发挥作用，其中外泌体是主要方式之一。外泌体作为一种潜在的治疗策略，尤其在肌肉修复和再生领域引起了广泛关注。与传统细胞治疗相比，外泌体治疗具有诸多优势，包括低免疫原性、低毒性、无成瘤性、易存储、易运输以及能够在体内广泛扩散等优点^[28, 45]。最新临床研究显示，骨髓来源间充质干细胞分泌的神经营养因子 (ClinicalTrials.gov. 注册号: NCT01051882) 已用于肌萎缩侧索硬化症 (又名渐冻症，临床表现常伴随肌肉萎缩) 的 III 期临床研究^[46]。在临床前研究中，脐带、骨髓、脂肪来源间充质干细胞外泌体在肌肉相关性疾病中均有报道^[11, 30, 32]；而在肌少症研究中，主要集中于脐带和骨髓来源间充质干细胞外泌体，目前尚缺乏 AMSCs-exo 的研究。该研究从犬 AMSCs 的培养液中分离纯化出外泌体，并通过透射电镜、Western blot 和纳米颗粒跟踪分析技术对获得的外泌体进行表征与鉴定，结果符合国际细胞外囊泡协会 (MISEV2023) 提出的外泌体应满足的基本要求^[47]，为后续 AMSCs-exo 研究提供基础。

骨骼肌是人体最大的器官之一，基本结构单元是肌纤维，组成肌纤维的肌管细胞的衰老与萎缩是肌少症研究的核心关注点^[13]。该研究显示地塞米松可诱导 C2C12 肌管萎缩，给予 AMSCs 和 AMSCs-exo 可有效促进萎缩肌管的恢复和生长。有研究表明，脐带来源间充质干细胞可通过抗炎、抗凋亡、缓解线粒体损伤来改善骨骼肌萎缩和功能障碍^[10]。NAKAMURA 等^[31] 研究显示，骨髓来源间充质干细胞外泌体也可促进 C2C12 细胞的增殖与分化。MA 等^[48] 研究表明，脐带来源间充质干细胞外泌体可抑制 C2C12 肌管萎缩。FIGLIOLINI 等^[29] 发现 AMSCs-exo 可增强 C2C12 肌管分化。此外，细胞衰老也是肌少症的主要风险因素，因此该研究也考察了 AMSCs 及 AMSCs-exo 对衰老 C2C12 的影响，结果显示 AMSCs 及 AMSCs-exo 均可缓解肌管细胞衰老。

肌少症动物体内研究是评估药物疗效最直接的手段。WANG 等^[24] 通过构建后肢悬挂诱导的小鼠肌少症模型来评估脐带来源间充质干细胞的疗效，发现脐带来源间充质干细胞主要通过恢复骨骼肌耐力、减少细胞凋亡及抑制炎症反应来发挥作用。此外，WANG 等^[25] 通过构建 2 种肌少症小鼠模型 (一种是 D-半乳糖诱导的肌少症模型，另一种是 SAMP8 加速衰老小鼠) 来考察脐带来源间充质干细胞的疗效，发现脐带来源间充质干细胞可通过增加细胞外基质蛋白表达、激活卫星细胞、增强自噬及阻碍细胞衰老等机制恢复肌肉力量和功能。该研究构建了地塞米松诱导的小鼠肌少症模型，结果显示通过腹腔和静脉注射给予 AMSCs 治疗后均可显著增加小鼠的在棒时间，提示给药后可有效增加肌少症小鼠的肌肉耐力；苏木精-伊红染色结果显示通过腹腔和静脉注射给予 AMSCs 治疗后可显著增加胫前肌肌管面积，该病理变化与增强肌少症小鼠的肌肉耐力直接相关，且 2 种给药方式无明显差异。WIAFE 等^[49] 研究表明，间充质干细胞通过腹腔或静脉给药后均可有效缓解大鼠膀胱纤维化，且 2 种给药方式效果类似，但腹腔注射需要更高的给药剂量。该研究首次在地塞米松诱导的小鼠肌少症模型中验证 AMSCs 的治疗效果，结果显示腹腔和静脉注射等量 AMSCs 达到了相似的治疗效果，这为后续肌少症研究提供了重要的数据支撑及指导。

MuRF1 和 Atrogin-1 是公认的肌肉萎缩特异性标志物^[50]。该研究显示地塞米松诱导的 C2C12 细胞中 MuRF1 和 Atrogin-1 基因表达显著增加，给予 AMSCs 及 AMSCs-exo 均可显著抑制 MuRF1 和 Atrogin-1 基因表达，这可能与促进肌管生长有密切关系；此外，在地塞米松诱导的小鼠肌少症模型中，模型组小鼠肌肉组织中 MuRF1 和 Atrogin-1 基因表达显著增加，腹腔和静脉注射给予 AMSCs 治疗后均可显著抑

制 MuRF1 和 Atrogin-1 基因表达, 这可能与给药后增加胫前肌肌管面积直接相关。

综上, 实验结果表明 AMSCs 和 AMSCs-exo 可逆转肌管细胞的萎缩, 腹腔注射或静脉注射 AMSCs 可有效增加肌少症小鼠的肌肉耐力, 促进肌肉组织的恢复和生长, 作用机制可能与抑制肌肉萎缩基因 MuRF1 和 Atrogin-1 的表达有关, 这一研究有望为肌少症的疗效探索及后续临床转化提供新的思路和治疗策略。

该研究仍存在一些不足之处: ①该研究使用犬 AMSCs, 无法直接类比说明人源 AMSCs 的作用, 后续将使用人源细胞进行研究; ②该研究为 AMSCs 和 AMSCs-exo 对肌少症的疗效探索, 尚未对分子作用机制进行深入研究; ③ AMSCs-exo 对小鼠肌少症的治疗效果待验证; ④ AMSCs-exo 为复杂成分, 尚不清楚该实验条件下外泌体中所含的主要成分及活性物质, 需通过高通量测序及体内外实验进行验证。以上问题将在后续研究中进一步补充说明。

作者贡献: 袁为远负责实验设计、实验数据分析处理、论文撰写; 雷秦祎负责实验设计、实验实施及数据分析、论文撰写; 李秀琪、卢铁柱、傅子文、梁志丽、季韶洋负责实验实施、数据分析处理、文章校对; 李一佳、任宇负责实验设计、实验指导、数据及文章校对。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》; 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次文字和图表查重; 文章经小同行外审专家双盲审稿, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

[1] CRUZ-JENTOFT AJ, BAEYENS JP, BAUER JM, et al. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing*. 2010;39(4):412-423.

[2] Epidemiologic and methodologic problems in determining nutritional status of older persons. Proceedings of a conference. Albuquerque, New Mexico, October 19-21, 1988. *Am J Clin Nutr*. 1989;50(5 Suppl): 1121-1235.

[3] CHEN LK, WOO J, ASSANTACHAI P, et al. Asian Working Group for Sarcopenia: 2019 Consensus Update on Sarcopenia Diagnosis and Treatment. *J Am Med Dir Assoc*. 2020;21(3):300-307.e2.

[4] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 肌少症共识 [J]. *中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志*, 2016,9(3):215-227.

[5] 崔华, 王朝晖, 吴剑卿, 等. 老年人肌少症防控干预中国专家共识 (2023)[J]. *中华老年医学杂志*, 2023,42(2):144-153.

[6] ANKER SD, MORLEY JE, VON HAEHLING S. Welcome to the ICD-10 code for sarcopenia. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2016;7(5):512-514.

[7] MANKHONG S, KIM S, MOON S, et al. Experimental Models of Sarcopenia: Bridging Molecular Mechanism and Therapeutic Strategy. *Cells*. 2020;9(6):1385.

[8] NAJM A, MOLDOVEANU ET, NICULESCU AG, et al. Advancements in Drug Delivery Systems for the Treatment of Sarcopenia: An Updated Overview. *Int J Mol Sci*. 2024;25(19):10766.

[9] FLACK KD, DAVY KP, HULVER MW, et al. Aging, resistance training, and diabetes prevention. *J Aging Res*. 2010;2011:127315.

[10] PIAO L, HUANG Z, INOUE A, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells ameliorate aging-associated skeletal muscle atrophy and dysfunction by modulating apoptosis and mitochondrial damage in SAMP10 mice. *Stem Cell Res Ther*. 2022; 13(1):226.

[11] SONG J, LIU J, CUI C, et al. Mesenchymal stromal cells ameliorate diabetes-induced muscle atrophy through exosomes by enhancing AMPK/ULK1-mediated autophagy. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2023;14(2):915-929.

[12] MAHINDRAN E, LAW JX, NG MH, et al. Mesenchymal Stem Cell Transplantation for the Treatment of Age-Related Musculoskeletal Frailty. *Int J Mol Sci*. 2021;22(19):10542.

[13] KUROSAWA T, IKEMOTO-UEZUMI M, YOSHIMOTO Y, et al. Tissue-specific functions of MSCs are linked to homeostatic muscle maintenance and alter with aging. *Aging Cell*. 2024;23(11):e14299.

[14] WOSCYZYNA MN, KONISHI CT, PEREZ CARBAJAL EE, et al. Mesenchymal Stromal Cells Are Required for Regeneration and Homeostatic Maintenance of Skeletal Muscle. *Cell Rep*. 2019;27(7):2029-2035.e5.

[15] ZHU Y, HUANG C, ZHENG L, et al. Safety and efficacy of umbilical cord tissue-derived mesenchymal stem cells in the treatment of patients with aging frailty: a phase I/II randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Stem Cell Res Ther*. 2024;15(1):122.

[16] YOUSEFI K, RAMDAS KN, RUIZ JG, et al. The Design and Rationale of a Phase 2b, Randomized, Double-Blinded, and Placebo-Controlled Trial to Evaluate the Safety and Efficacy of Lomecel-B in Older Adults with Frailty. *J Frailty Aging*. 2022;11(2):214-223.

[17] NGUYEN NT, PHAN HT, LE PM, et al. Safety and efficacy of autologous adipose tissue-derived stem cell transplantation in aging-related low-grade inflammation patients: a single-group, open-label, phase I clinical trial. *Trials*. 2024;25(1):309.

[18] GOLPANIAN S, DIFEDE DL, KHAN A, et al. Allogeneic Human Mesenchymal Stem Cell Infusions for Aging Frailty. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2017;72(11):1505-1512.

[19] TOMPKINS BA, DIFEDE DL, KHAN A, et al. Allogeneic Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Aging Frailty: A Phase II Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2017;72(11):1513-1522.

[20] SHEHATA AS, AL-GHONEMY NM, AHMED SM, et al. Effect of mesenchymal stem cells on induced skeletal muscle chemodeneration atrophy in adult male albino rats. *Int J Biochem Cell Biol*. 2017;85: 135-148.

[21] LI TS, SHI H, WANG L, et al. Effect of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells on Satellite Cell Proliferation and Apoptosis in Immobilization-Induced Muscle Atrophy in Rats. *Med Sci Monit*. 2016;22:4651-4660.

- [22] TAKEGAKI J, SASE K, KONO Y, et al. Intramuscular injection of mesenchymal stem cells augments basal muscle protein synthesis after bouts of resistance exercise in male mice. *Physiol Rep.* 2024;12(7):e15991.
- [23] ARCHACKA K, GRABOWSKA I, MIERZEJEWSKI B, et al. Hypoxia preconditioned bone marrow-derived mesenchymal stromal/stem cells enhance myoblast fusion and skeletal muscle regeneration. *Stem Cell Res Ther.* 2021;12(1):448.
- [24] WANG QQ, JING XM, BI YZ, et al. Human Umbilical Cord Wharton's Jelly Derived Mesenchymal Stromal Cells May Attenuate Sarcopenia in Aged Mice Induced by Hindlimb Suspension. *Med Sci Monit.* 2018;24:9272-9281.
- [25] WANG C, ZHAO B, ZHAI J, et al. Clinical-grade human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells improved skeletal muscle dysfunction in age-associated sarcopenia mice. *Cell Death Dis.* 2023;14(5):321.
- [26] 陈三, 杨润泽, 吴家媛. 预处理来源外泌体在细胞增殖分化及凋亡中的作用 [J]. *中国组织工程研究*, 2023,27(19):3029-3039.
- [27] MAHINDRAN E, WAN KAMARUL ZAMAN WS, AHMAD AMIN NOORDIN KB, et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles: Hope or Hope for Skeletal Muscle Anti-Frailty. *Int J Mol Sci.* 2023;24(9):7833.
- [28] LO SICCO C, REVERBERI D, BALBI C, et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles as Mediators of Anti-Inflammatory Effects: Endorsement of Macrophage Polarization. *Stem Cells Transl Med.* 2017;6(3):1018-1028.
- [29] FIGLIOLINI F, RANGHINO A, GRANGE C, et al. Extracellular Vesicles From Adipose Stem Cells Prevent Muscle Damage and Inflammation in a Mouse Model of Hind Limb Ischemia: Role of Neuregulin-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2020;40(1):239-254.
- [30] WANG C, SONG W, CHEN B, et al. Exosomes Isolated From Adipose-Derived Stem Cells: A New Cell-Free Approach to Prevent the Muscle Degeneration Associated With Torn Rotator Cuffs. *Am J Sports Med.* 2019;47(13):3247-3255.
- [31] NAKAMURA Y, MIYAKI S, ISHITOBI H, et al. Mesenchymal-stem-cell-derived exosomes accelerate skeletal muscle regeneration. *FEBS Lett.* 2015;589(11):1257-1265.
- [32] LI Z, LIU C, LI S, et al. BMSC-Derived Exosomes Inhibit Dexamethasone-Induced Muscle Atrophy via the miR-486-5p/FoxO1 Axis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021;12:681267.
- [33] SANZ-ROS J, ROMERO-GARCÍA N, MAS-BARGUES C, et al. Small extracellular vesicles from young adipose-derived stem cells prevent frailty, improve health span, and decrease epigenetic age in old mice. *Sci Adv.* 2022;8(42):eabq2226.
- [34] DAI H, ZHENG W, LUO J, et al. Inhibiting uptake of extracellular vesicles derived from senescent bone marrow mesenchymal stem cells by muscle satellite cells attenuates sarcopenia. *J Orthop Translat.* 2022;35:23-36.
- [35] KARTIKA RW, SIDHARTA VM, DJUARTINA T, et al. New Insight in Using of Mesenchyme Stem Cell Conditioning Medium for the Impaired Muscle related Biomarkers: In vivo Study with Rat Model. *Ann Afr Med.* 2024;23(4):674-679.
- [36] WANG L, JIAO XF, WU C, et al. Trimetazidine attenuates dexamethasone-induced muscle atrophy via inhibiting NLRP3/GSDMD pathway-mediated pyroptosis. *Cell Death Discov.* 2021;7(1):251.
- [37] CRUZ-JENTOFT AJ, LANDI F, TOPINKOVÁ E, et al. Understanding sarcopenia as a geriatric syndrome. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2010;13(1):1-7.
- [38] GE J, ZENG J, MA H, et al. A New Index Based on Serum Creatinine and Cystatin C Can Predict the Risks of Sarcopenia, Falls and Fractures in Old Patients with Low Bone Mineral Density. *Nutrients.* 2022;14(23):5020.
- [39] BURGEL CF, CARVALHO BZO, MILESI BM, et al. SARC-CalF using calf circumference adjusted for BMI predicts 6-mo readmission and mortality in hospitalized patients: a secondary analysis of a cohort study. *Am J Clin Nutr.* 2025;121(1):151-157.
- [40] HEN LK, LEE WJ, PENG LN, et al. Recent Advances in Sarcopenia Research in Asia: 2016 Update From the Asian Working Group for Sarcopenia. *J Am Med Dir Assoc.* 2016;17(8):767.e1-7.
- [41] BOWEN TS, SCHULER G, ADAMS V. Skeletal muscle wasting in cachexia and sarcopenia: molecular pathophysiology and impact of exercise training. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2015;6(3):197-207.
- [42] ZHIDU S, YING T, RUI J, et al. Translational potential of mesenchymal stem cells in regenerative therapies for human diseases: challenges and opportunities. *Stem Cell Res Ther.* 2024;15(1):266.
- [43] HOANG DM, PHAM PT, BACH TQ, et al. Stem cell-based therapy for human diseases. *Signal Transduct Target Ther.* 2022;7(1):272.
- [44] DOMINICI M, LE BLANC K, MUELLER I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-317.
- [45] WIDJAJA G, JALIL AT, BUDI HS, et al. Mesenchymal stromal/stem cells and their exosomes application in the treatment of intervertebral disc disease: A promising frontier. *Int Immunopharmacol.* 2022;105:108537.
- [46] CUDKOWICZ ME, LINDBORG SR, GOYAL NA, et al. A randomized placebo-controlled phase 3 study of mesenchymal stem cells induced to secrete high levels of neurotrophic factors in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve.* 2022;65(3):291-302.
- [47] WELSH JA, GOBERDHAN DCI, O'DRISCOLL L, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *J Extracell Vesicles.* 2024;13(2):e12404.
- [48] MA H, JING Y, ZENG J, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes ameliorate muscle atrophy via the miR-132-3p/FoxO3 axis. *J Orthop Translat.* 2024;49:23-36.
- [49] WIAFE B, KADAM R, METCALFE PD. Intraperitoneal administration of mesenchymal stem cells is effective at mitigating detrusor deterioration after pBOO. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2020;318(3):F549-F556.
- [50] BODINE SC, BAEHR LM. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2014;307(6):E469-484.

(责任编辑: 马征华, 邱杨, 张楠)