

# 不同鼠龄大鼠骨骼肌卫星细胞生物学特性的探讨

任宇 俞兰 赵兴胜\*

(内蒙古自治区人民医院, 呼和浩特 010017)

**摘要** 该文探讨了5、10、15、21、42日龄大鼠骨骼肌卫星细胞(muscle-derived satellite cells, MDSCs)生物学特性。利用二次酶消化法提取MDSCs原代细胞。利用不同的诱导培养液使MDSCs定向分化为神经细胞、成骨细胞和肌细胞,并通过特异性染色和免疫组化法对其进行鉴定。结果显示,5、10、15、21日鼠龄大鼠骨骼肌中均可高效分离出原代MDSCs且细胞活力旺盛,42日大鼠MDSCs原代分离困难。以上结果一定程度上拓展了MDSCs的取材范围。第5、10、15、21日大鼠来源MDSCs经成神经细胞诱导后呈多角形、有明显的树突结构且表达神经特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE),证明MDSCs可以分化为神经细胞;经成骨诱导后细胞形成明显的骨节结,茜素红及骨钙蛋白(osteocalcin)染色均呈阳性;经成肌诱导后细胞发生融合形成成熟肌管细胞且表达快肌肌球蛋白。出生后5、10、15、21日大鼠来源MDSCs取材范围广,易于体外分离培养,增殖能力强且具有一定的多能性,适合作为再生医学的种子细胞。

**关键词** 骨骼肌卫星细胞; 鉴定; 成神经细胞诱导; 成骨诱导; 成肌诱导

## Study on the Biological Characteristics of Rat Skeletal Muscle-Derived Satellite Cells from Rats in Different Age

Ren Yu, Yu Lan, Zhao Xingsheng\*

(Inner Mongolia People's Hospital, Hohhot 010017, China)

**Abstract** This study was aimed to study on the biological characteristics of rat skeletal muscle-derived satellite cells (MDSCs) in rats aged 5, 10, 15, 21, 42 days. MDSCs were separated and cultured by double enzyme digestion and differential adherent culture. Neurogenic, osteogenic and myogenic induction media were used to induce directed differentiation. Differentiated nerve cells, osteoblasts and myotubes cells were identified by morphology and immunohistochemical staining, respectively. Primary MDSCs of the 5<sup>th</sup>, 10<sup>th</sup>, 15<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> day were highly efficiently separate from homologous skeletal muscles with a wide range of source. It was difficult to separate the MDSCs from 42<sup>nd</sup> day rat. After neurogenesis, four groups MDSCs formed neuron-specific enolase positive polygonal-shaped dendritic cells. It is the first time to identified that MDSCs can be differentiated into neural cells. After osteogenesis, MDSCs in rats aged 5, 10, 15, 21, 42 days formed Alizarin red- and osteocalcin-positive bone nodules. After myogenesis, myotubes were formed and expressed fast muscle myosin-positive. MDSCs of the 5<sup>th</sup>, 10<sup>th</sup>, 15<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> day are easy to isolate culture and amplify *in vitro* with pluripotency, which increases the range of source material available for tissue engineering and are suitable as seed cells for regenerative medicine.

**Keywords** muscle-derived satellite cells; identification; neurogenesis induction; osteogenic induction; myogenic induction

收稿日期: 2016-12-08 接受日期: 2017-03-01

内蒙古自治区自然科学基金项目(批准号: 2016BS0314)和内蒙古自治区人民医院院内基金(批准号: 2016012)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0471-3283228, E-mail: zhaoxs1121@163.com

Received: December 8, 2016 Accepted: March 1, 2017

This work was supported by the Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region of China (Grant No.2016BS0314) and the Foundation of Inner Mongolia People's Hospital (Grant No.2016012)

\*Corresponding author. Tel: +86-471-3283228, E-mail: zhaoxs1121@163.com

网络出版时间: 2017-04-11 10:34:19 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170411.1034.006.html>

根据国家统计局《2014年国民经济和社会发展统计公报》,中国已经进入老龄化社会,并处于老龄化逐步加剧的阶段,随之而来的多种老龄化疾病日益成为社会关注的焦点。肌肉减少症(sarcopenia)就是其中之一,临床上也将其称为“骨骼肌衰老”或“少肌症”,指的就是由衰老引起的骨骼肌质量下降和肌力减退。1989年, Irwin第一次用“肌肉减少症”来描述老年性的肌肉减少和力量衰减<sup>[1]</sup>。与肌肉减少症相似的另一种肌肉相关疾病被称恶病质(cachexia)<sup>[2]</sup>,是指体重不断减轻及肌肉逐渐耗损的症候群,其症状包括厌食、长期恶心、便秘、四肢无力、忧郁、身体外型改变等<sup>[3]</sup>。少肌症和恶病质均表现出异常的肌肉代谢,说明它们在肌肉萎缩过程中有着相似的分子机理。尽管国内外学者开展了大量关于延缓肌肉萎缩、增强肌肉功能的研究,然而这些措施并不能从根本上解决萎缩肌功能恢复的问题。随着近年来干细胞移植治疗技术的日益进步,骨骼肌卫星细胞(muscle-derived satellite cells, MDSCs)移植为肌肉萎缩的治疗带来新希望。目前,免疫排斥是细胞移植治疗中首要解决的问题, Qu等<sup>[4]</sup>研究发现,高度纯化的MDSCs能够完全克服移植后的迅速死亡现象,并发现这些纯化的MDSCs能够同时表现出I型和H型主要组织相容性复合体,为克服MDSCs移植排斥反应奠定了基础。

随着年龄的增加,哺乳动物骨骼肌卫星细胞逐渐减少,在出生后一定时期内骨骼肌卫星细胞核的比例下降明显,肌细胞核总数明显增加,卫星细胞核总数减少而出现净减少,到一定程度后终身维持<sup>[5-6]</sup>。本研究摒弃长期以来人们认为只有出生后10日内大鼠骨骼肌中才可分离出骨骼肌卫星细胞的思想,探讨出生后42日内大鼠MDSCs的生长增殖及多向分化能力,为MDSCs是否可以成为再生医学理想的种子细胞及临床应用提供更加充实的依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及试剂

地塞米松、IV型胶原酶、DMSO、茜素红、明胶、胰岛素等购自Sigma公司。DMEM/F12、胰蛋白酶、PBS等购自Invitrogen公司。FBS、HS购自Gibco公司。Desmin等抗体购自Abcam公司。35 mm培养皿、60 mm培养皿、100 mm培养皿、6孔板、12孔板、冻存管等均购自Corning公司。

### 1.2 实验动物

出生后5、10、15、21、42日SPF级Sprague-Dawley(SD)大鼠购自内蒙古大学哺乳动物繁殖生物学与生物技术重点实验室。

本文所有的研究都遵循国际医学科学组织理事会颁布的《涉及动物的生物医学研究的国际指导原则》,并经内蒙古自治区人民医院伦理委员会批准。

### 1.3 MDSCs体外分离、纯化与培养

分别选取出生后5、10、15、21、42日5组SD大鼠腿部肌肉组织各4 g,每组至少重复3次,显微镜下尽可能剔除脂肪组织、结缔组织、血液等杂物。首先,将肌肉组织剪至1~2 mm<sup>3</sup>小块分装入50 mL离心管中,加入与肌肉组织等体积的PBS(含0.1% I型胶原酶),37 °C摇床中震荡酶解60 min,每隔20 min涡旋震荡1次。然后,离心后去上清液,加入0.25%胰蛋白酶,37 °C孵育20 min,血清中止消化离心后去上清液。最后,用生长培养基(DMEM/F12+20% FBS+10% HS+1%青/链霉素)重悬细胞,滤过200目细胞筛网,1 200 r/min离心5 min弃上清液,2 mL生长培养基重悬、接种细胞<sup>[7]</sup>。采用Gharaibeh等<sup>[8]</sup>差速贴壁法纯化大鼠MDSCs。

### 1.4 生长曲线

将第5代MDSCs制成单细胞悬液,调整细胞浓度为 $1 \times 10^4$ /mL,接种于24孔板,自接种第2 d起每天取3孔进行细胞计数取平均值,以时间为横坐标,细胞数量为纵坐标,绘制细胞生长曲线。

### 1.5 MDSCs标志蛋白鉴定

MDSCs以 $1 \times 10^5$ /mL的密度接种于24孔板内,待细胞生长至80%汇合时,经固定、渗透、封闭后分别加入Desmin、 $\alpha$ -Sarcomeric Actinin、MyoD1(myogenic differentiation 1)、Myf5(myogenic factor 5)和PAX7(paired box 7)一抗于4 °C孵育。12 h后去掉多余的一抗,然后用FITC标记二抗室温孵育2 h,最后DAPI复染细胞核。PBS代替一抗作为阴性对照,显微镜下观察细胞染色情况。

### 1.6 MDSCs成神经细胞诱导与鉴定

MDSCs生长至70%汇合时,实验组首先用10 ng/mL EGF+10 ng/mL bFGF+DMEM/F12培养基预诱导,24 h后更换为5 mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇+10% FBS+DMEM/F12培养基进行正式诱导,6 h后更换为2% DMSO+200  $\mu$ mol/L BHA+20 ng/mL bFGF+DMEM/F12维持培养液,每隔1 h更换1次新鲜

维培养液并观察细胞形态变化<sup>[9]</sup>。对照组只加入生长培养基。待细胞形态有明显变化时,吸出培养液,经固定、渗透、封闭处理后,加入NSE一抗检测神经细胞特异性基因NSE的表达。

### 1.7 MDSCs成骨诱导与鉴定

MDSCs生长至80%汇合时加入成骨诱导培养基:DMEM/F12+10% FBS+10 mmol/L  $\beta$ -甘油磷酸钠+20 nmol/L地塞米松+50  $\mu$ g/mL抗坏血酸进行成骨诱导,期间每3 d更换1次新鲜培养基,并不断观察细胞形态变化<sup>[10]</sup>。诱导21 d后,经2%茜素红染色并于显微镜下观察骨化结的形成情况。细胞免疫组化鉴定成骨细胞特异性基因骨钙蛋白(osteocalcin)的表达。对照组只加入生长培养基。

### 1.8 MDSCs成肌诱导与鉴定

MDSCs生长至80%汇合时更换为成肌诱导培养基:2% HS+DMEM/F12,每3 d更换1次新鲜培养基<sup>[11]</sup>。当培养皿中出现短粗或细长棒状细胞时,5 mg/L Hoechst 33342染核,观察细胞融合现象。细胞免疫组化鉴定肌管细胞特异性基因快肌肌球蛋白的表达。对照组只加入生长培养基。

### 1.9 Real-time PCR

根据Genebank中相应序列设计一对特异性引物,以分离前MDSCs为对照,Real-time PCR分析目的基因*Desmin*、 *$\alpha$ -Sarcomeric Actinin*、*MyoD1*、*Myf5*和*PAX7*在分离纯化后MDSCs中的mRNA水平。以诱导前MDSCs为对照,Real-time PCR分别检测成神经细胞诱导、成骨诱导和成肌诱导后目的基因NSE、骨钙蛋白和快肌肌球蛋白mRNA相对水平。

### 1.10 统计学分析

每组实验重复至少3次,统计结果用平均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。所有数据用SPSS 19.0软件进行分析,采用*t*检验对5、10、15、21日龄大鼠来源MDSCs各项指标的差值进行统计分析比较,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 细胞形态

采用差速贴壁法接种细胞悬液2 h后,大部分杂细胞均已贴壁。将未贴壁的绝大多数MDSCs连同培养液移入新的明胶处理后的培养皿中贴壁生长。刚分离出来的MDSCs呈球形(图1),折光性强,其中,21日龄大鼠骨骼肌组织经消化后细胞悬液中

有少量成熟棒状肌管细胞(图1D),而42日龄大鼠骨骼肌组织消化后细胞悬液中有大量棒状成熟肌管细胞(图1E)。培养10~14 h后细胞开始贴壁,部分细胞贴壁呈圆形、梭形或多角形,部分仍未贴壁。培养48~72 h后完全贴壁,细胞逐渐延展成梭形或多角形(图2)。以上结果表明,非MDSCs在2 h内完成贴壁。MDSCs贴壁时间为48~72 h。42日龄大鼠来源MDSCs分离困难不宜,作为分离原代细胞的组织材料。

### 2.2 生长曲线

5、10、15、21日龄的MDSCs在20% FBS培养基中2、4、6 d后的倍增时间相似且倍增速度较快。在相同的接种密度和培养条件下,5、10、15、21日龄大鼠MDSCs培养2、4、6 d的平均倍增时间分别为11.6、24.2、26.7 h( $P<0.05$ )(图3)。以上结果表明,MDSCs在体外生长正常,即使日龄稍大的21日龄大鼠MDSCs仍保持良好的活性。

### 2.3 MDSCs标志蛋白的水平

本研究中分离得到的4个时期MDSCs均表达Desmin、 $\alpha$ -Sarcomeric Actinin、MyoD1、Myf5和PAX7(图4),且密集于细胞的胞质中。细胞核位于细胞中央,DAPI复染细胞核呈蓝色(图5)。

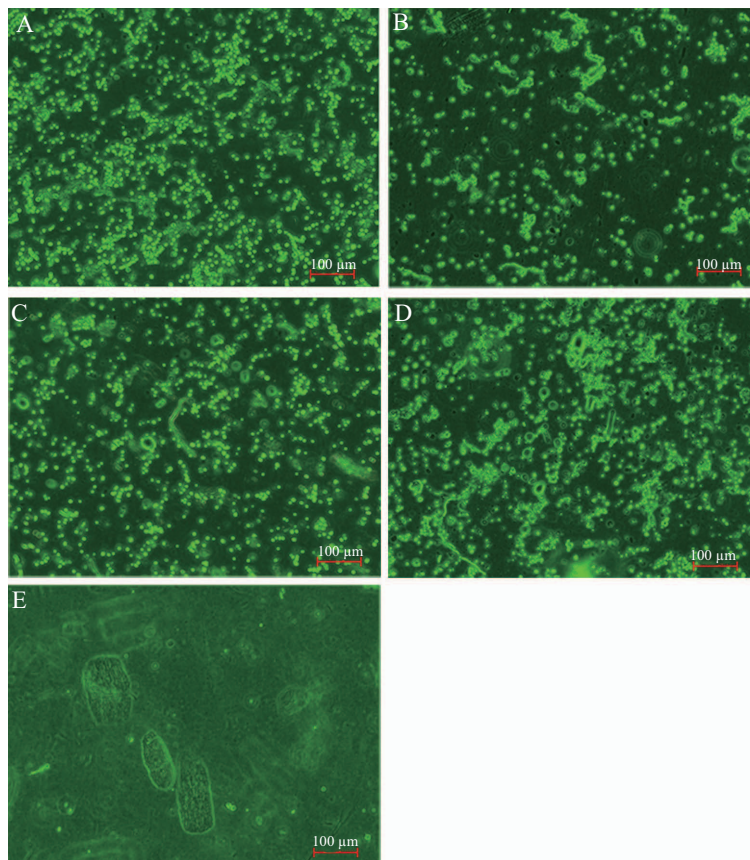
### 2.4 成神经细胞诱导

正式诱导6 h后,5、10、15、21日龄大鼠来源MDSCs无明显形态变化,待加入维持培养液30 min后,胞质开始收缩,细胞膜形成刺状小突起,1 h后5、10日龄大鼠MDSCs形态发生显著变化,胞体呈现多突起锥形、圆形以及三角形(图6A和图6B)。1.5 h后15、21日龄大鼠MDSCs出现相似的变化(图6C和图6D)。2 h后,4个时期细胞均伸出类似轴突的突起,末端出现一级和二级分叉类似树突。其中,5、10日龄大鼠MDSCs诱导4 h后细胞形态变化更加显著,胞质收缩尤为明显,部分细胞胞质几乎消失。15、21日龄大鼠MDSCs诱导4 h后形态变化较5日、10日龄大鼠MDSCs缓和,对照组无明显变化。将维持诱导2 h后细胞进行NSE免疫组化结果显示,诱导后5、10、15、21日龄大鼠MDSCs均表达NSE(图6A1~图6D1和图4),对照组不表达(图6A2~图6D2)。

### 2.5 成骨诱导

诱导初期MDSCs呈单克隆样生长,细胞由梭形变为不规则形态,接着细胞开始聚集,18 d后聚集成立体结构,21 d后经茜素红染色后呈鲜红色,表



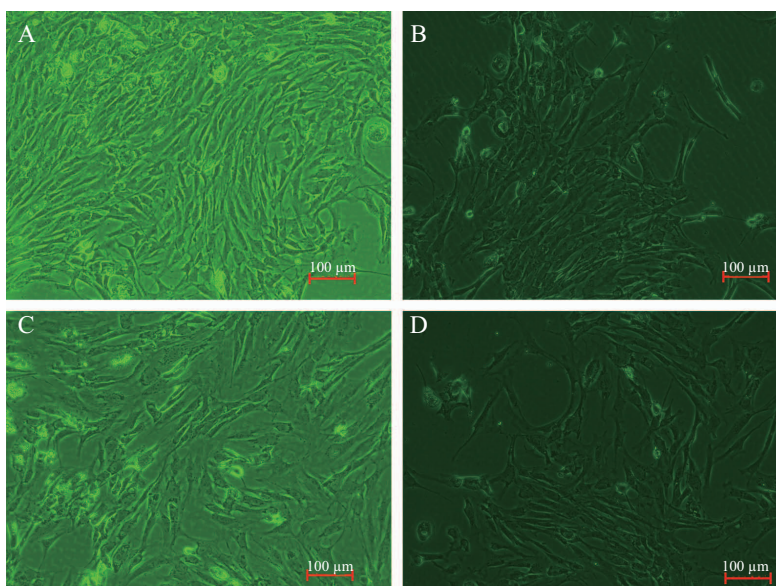


A: 5日龄大鼠MDSCs; B: 10日龄大鼠MDSCs; C: 15日龄大鼠MDSCs; D: 21日龄大鼠MDSCs, 有微小肌管细胞出现; E: 42日龄大鼠MDSCs, 圆形骨骼肌卫星细胞很少, 有粗大肌管细胞出现。

A: MDSCs in rats aged 5 days; B: MDSCs in rats aged 10 days; C: MDSCs in rats aged 15 days; D: MDSCs in rats aged 21 days with tiny myotubes; E: MDSCs in rats aged 42 days with thick muscle cells.

图1 不同日龄大鼠MDSCs经二次酶消化后细胞形态

Fig.1 Cell morphology of MDSCs after two times of enzyme digestion in rats of different ages



A: 5日龄大鼠MDSCs; B: 10日龄大鼠MDSCs; C: 15日龄大鼠MDSCs; D: 21日龄大鼠MDSCs。

A: MDSCs in rats aged 5 days; B: MDSCs in rats aged 10 days; C: MDSCs in rats aged 15 days; D: MDSCs in rats aged 21 days.

图2 不同日龄大鼠MDSCs原代细胞形态

Fig.2 The morphology of primary MDSCs in rats of different ages

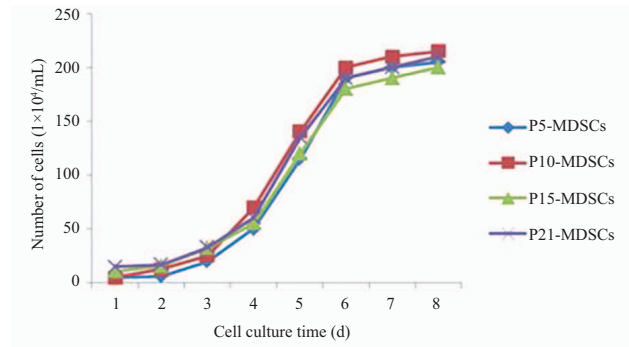


图3 不同日龄大鼠第5代MDSCs生长曲线

Fig.3 The growth curve of the fifth generation MDSCs in rats of different ages

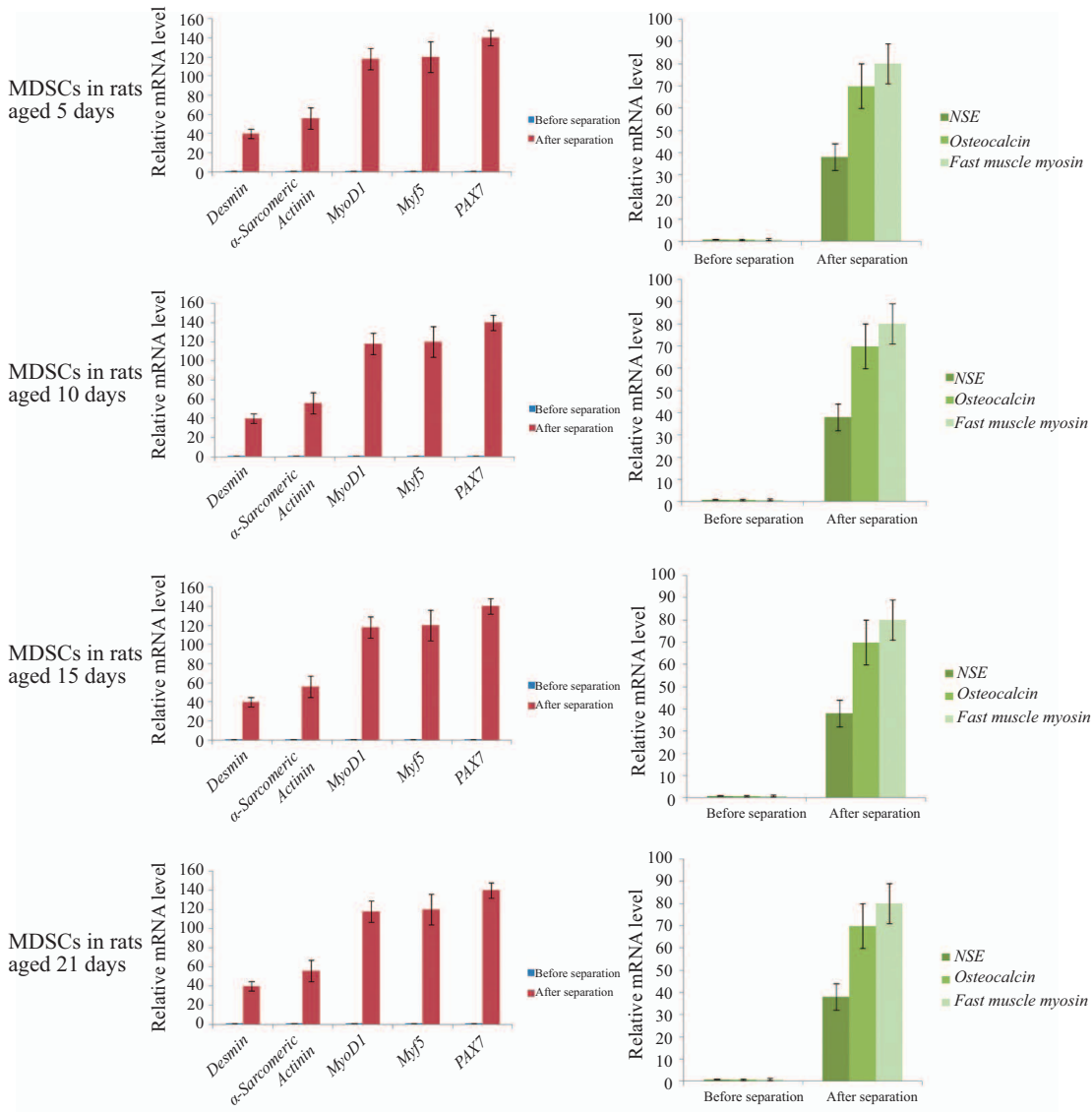


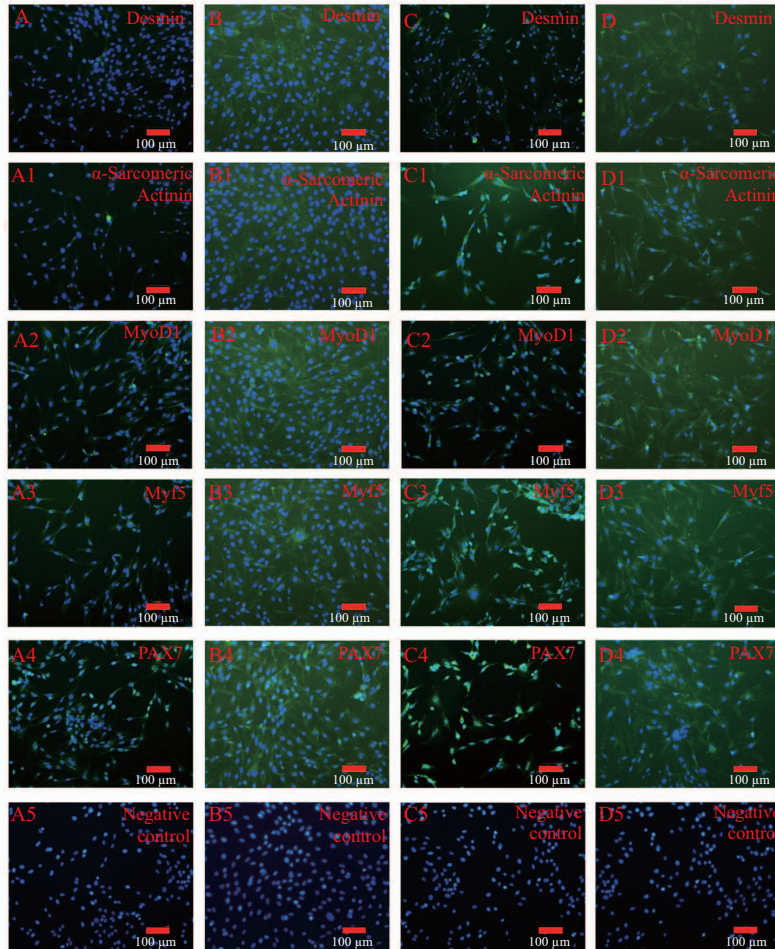
图4 不同日龄大鼠MDSCs mRNA相对水平

Fig.4 Relative mRNA level of MDSCs in rats of different ages

明细胞形成明显的骨化结。其中, 在相同细胞接种密度下, 15、21日龄大鼠MDSCs成骨诱导后形成的骨结节数目较5、10日龄大鼠MDSCs诱导后形成的

骨结节多(图7A~图7D)( $P < 0.01$ )(图8)。免疫组化结果表明, 骨钙蛋白分别在5、10、15、21日龄大鼠MDSCs成骨分化细胞中有表达(图7A1~图7D1和图



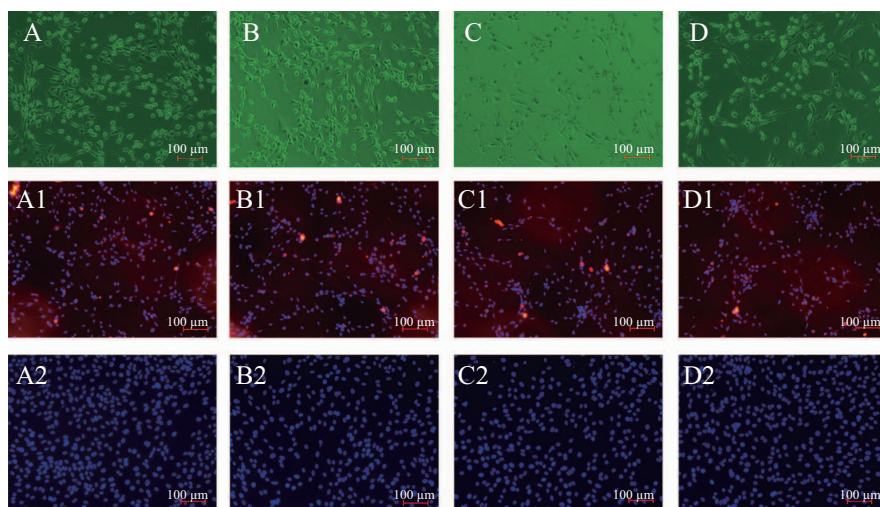


A~A5: 5日龄大鼠MDSCs; B~B5: 10日龄大鼠MDSCs; C~C5: 15日龄大鼠MDSCs; D~D5: 21日龄大鼠MDSCs.

A-A5: MDSCs in rats aged 5 days; B-B5: MDSCs in rats aged 10 days; C-C5: MDSCs in rats aged 15 days; D-D5: MDSCs in rats aged 21 days.

图5 免疫组织化学法鉴定不同日龄大鼠MDSCs

Fig.5 Identification of MDSCs in rats of different age rats by immunohistochemical method

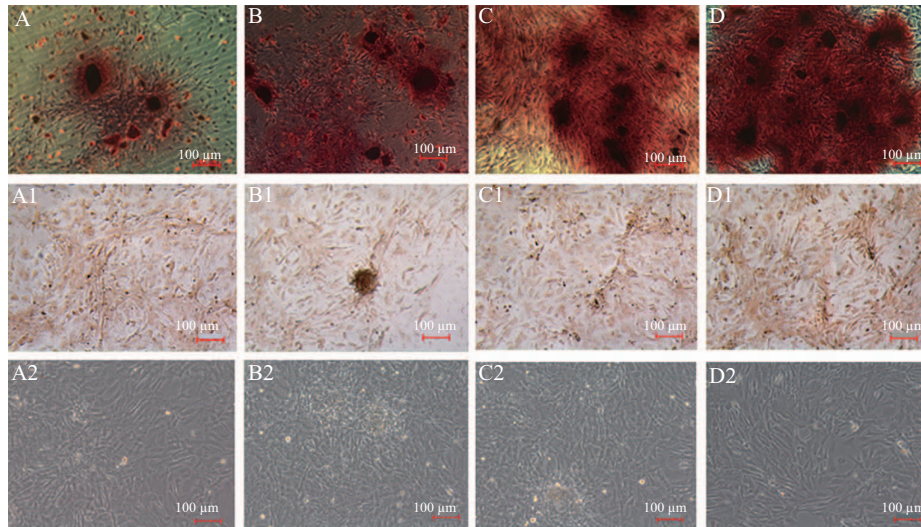


A~D: 分别为5、10、15、21日龄大鼠MDSCs成神经细胞诱导后有明显的轴突和树突状结构形成; A1~D1: NSE免疫组化染色阳性; A2~D2: 阴性对照。

A-D: formation of obvious axonal and dendritic structures of MDSCs in rats aged 5, 10, 15, 21 days; A1-D1: NSE immunohistochemical staining was positive. A2-D2: negative control.

图6 不同日龄大鼠MDSCs向神经细胞分化

Fig.6 Nerve cells induction of MDSCs in rats of different ages



A~D: 分别为5、10、15、21日龄大鼠MDSCs成骨诱导后经茜素红染色有明显的骨结节形成; A1~D1: 分别为成骨诱导后骨钙蛋白免疫细胞荧光染色呈阳性(DAB染色, 呈黄色); A2~D2: 分别为阴性对照。

A-D: obvious formation of bone nodules, as indicated by Alizarin red staining, after osteogenic induction of MDSCs in rats aged 5, 10, 15, 21 days; A1-D1: positive expression of osteocalcin (DAB staining; yellow) after osteogenic induction; A2-D2: negative control.

图7 不同日龄大鼠MDSCs成骨诱导分化

Fig.7 Osteogenic induction of MDSCs in rats of different ages

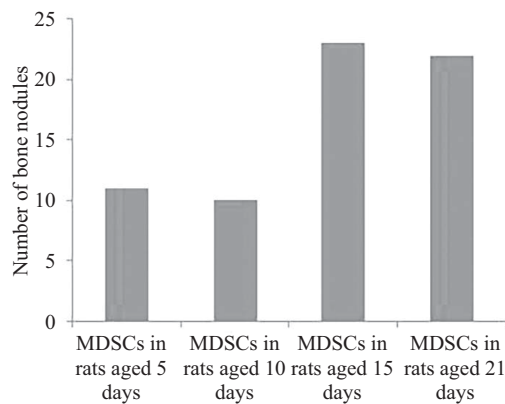


图8 不同日龄大鼠MDSCs成骨诱导后形成骨结节数目统计

Fig.8 The number of bone nodules after MDSCs osteogenesis in rats of different ages

4); 而对照组细胞不表达此蛋白(图7A2~图7D2)。

## 2.6 成肌诱导

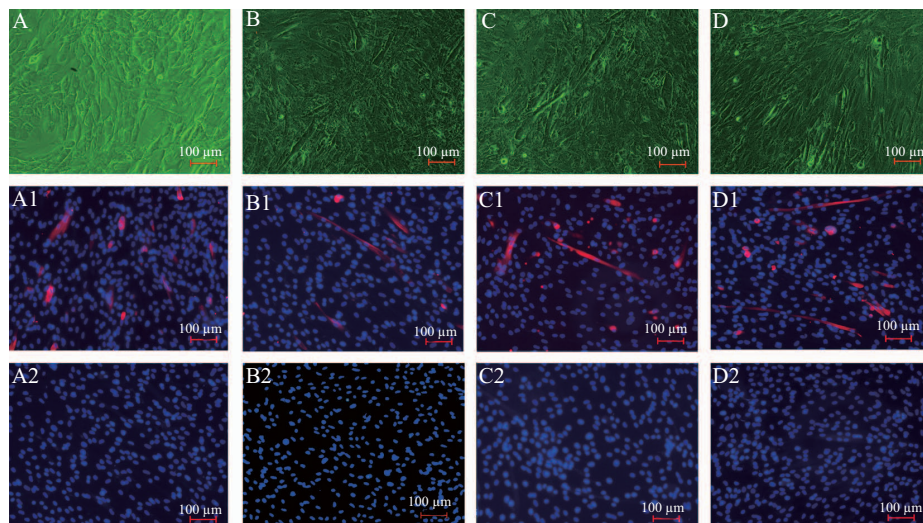
加入成肌诱导培养液72 h后, 15、21日龄大鼠MDSCs首先发生细胞融合并逐渐规律性地沿同一方向平行排列, 接着形成多核的短、粗状肌管细胞。随着时间的延长, 细胞密度增大, 细胞之间的融合更为广泛, 形成肌管细胞数量更多, 肌管细胞长度明显增加(图9C和图9D)。5、10日龄大鼠MDSCs成肌诱导5 d后观察到细胞融合现象并且有明显的肌管细胞形成(图9A和图9B)。经DAPI染色清晰可见同一肌管中存在多个细胞核, 快肌肌球蛋白免疫组化染色为阳性(图9A1~图9D1和图4); 对照组为阴性(图

9A2~图9D2)。

## 3 讨论

目前, 主要的组织工程种子细胞有以下几种: 胚胎干细胞、骨髓间充质干细胞、脐血间充质干细胞和脂肪间充质干细胞等。胚胎干细胞虽然可以定向诱导分化为各种组织细胞, 但是存在伦理问题, 限制了其实际应用<sup>[12]</sup>。一般认为, 骨髓间充质干细胞是组织工程理想的种子细胞之一, 但即使在骨髓组织中间充质干细胞含量也很低, 并且骨髓穿刺给患者造成较大的创伤和痛苦<sup>[13]</sup>, 因此不利于临床大规模的培养与应用。另一类研究较早、较多的





A~D: 分别为5、10、15、21日龄大鼠MDSCs成肌诱导后有明显的肌管形成; A1~D1: 快肌肌球蛋白细胞免疫组化阳性(Cy3染色, 呈红色); A2~D2: 阴性对照。

A-D: formation of myotubes after myogenic induction of MDSCs in rats aged 5, 10, 15, 21 days; A1-D1: positive expression of fast muscle myosin (Cy3 staining; red); A2-D2: negative control.

图9 不同日龄大鼠MDSCs成肌诱导分化

Fig.9 Myogenic differentiation of MDSCs in rats of different ages

干细胞是脐血间充质干细胞。实践证明, 脐血间充质干细胞来源有限且分离困难, 保存费用高, 临床应用潜力较小。脂肪来源的间充质干细胞是近几年干细胞领域的研究热点, 其来源丰富、分离方法简单, 但是脂肪组织中干细胞含量少, 分离得到的脂肪间充质干细胞传代有限同样成为其广泛应用的限制之一。然而, 骨骼肌组织中分离得到的骨骼肌卫星细胞较同等重量脂肪组织中分离得到脂肪间充质干细胞数量多、倍增时间短、扩增能力强且同样具有优秀的多潜能性<sup>[7,14-15]</sup>。由于人体肌肉组织量较多、取材容易, 少量的组织即可分离出大量的细胞, 同时, MDSCs自体移植可以避免许多伦理问题, 因此, MDSCs成为组织工程更加理想的选择。

本研究在获取原代细胞时, 选择出生后21日内的SD大鼠, 较以往的研究中选择出生后10日内大鼠, 一定程度上拓展了MDSCs的取材范围并保证细胞具有良好的增殖和分化活力。在酶的选择上也做了改进, 混合酶中的I型胶原酶将肌组织分解成薄片, 胰蛋白酶将细胞消化为单个悬浮细胞, 通过对实验条件的反复摸索, 降低了消化酶的浓度, 既节省了酶的用量又提高了细胞成活率<sup>[16]</sup>, 并减少了所用乳鼠的数量, 简化了实验操作过程。经过与前期实验的比较, 我们发现, 此法获取的MDSCs在用Preplate差速贴壁技术传至第50代时, 在增殖能力和细胞活性方面均具有明显优势。

在对MDSCs进行鉴定时, 我们选择Desmin作为标志物。Desmin为中间丝蛋白的一种, 是成肌分化的早期标志, 虽然有15%的假阳性率, 但仍常作为肌源性细胞的标志。通过本方法获取的MDSCs, Desmin阳性结果表明, 所得到的细胞系具有肌源性。PAX7是在卫星细胞中表达的标志性基因, PAX7和MRFs家族成员相互作用共同参与肌细胞的生成和分化过程。静止卫星细胞表达转录因子PAX7, 激活后的MDSCs则同时表达PAX7和MyoD<sup>[17]</sup>。在激活的卫星细胞中, PAX7正调控下游基因Myf5、MyoD、myogenin和MRF4(myogenic regulatory factor 4), 它们介导骨骼肌特化基因的增量调节并诱导卫星细胞的分化。

微环境中的各种细胞因子、细胞间、细胞与基质间的相互作用以及细胞特性决定了成体干细胞某些基因的开启和关闭, 从而导致其分化成不同的细胞。我们在成神经细胞诱导组中加入 $\beta$ -巯基乙醇、DMSO以及BHA等体外模拟神经细胞微环境诱导MDSCs分化, 与正常神经细胞形态相同<sup>[15]</sup>。NSE作为神经元标志物得到广泛使用, 是由成熟神经元和神经元起源细胞持续表达的胞质蛋白。在发育过程中, NSE的水平非常低, 但在神经元形态和功能成熟过程中增加。本研究中经诱导产生的神经细胞能够表达NSE, 表明这些细胞在功能上与正常神经细胞具有一定的相似之处。该结果证明, MDSCs可跨胚



层诱导分化为神经细胞。

骨骼肌卫星细胞具有多种组织工程应用的潜能,例如骨骼肌、心肌、骨、软骨和外周神经的修复与重建。1991年,Harvey等<sup>[18]</sup>使用骨骼肌卫星细胞移植治疗进行性肌营养不良症(*duchenne muscular dystrophy*, DMD)。尽管总体效果欠佳,仍为肌肉卫星细胞在肌病治疗中的应用展示了一个美好的前景<sup>[19]</sup>。

### 参考文献 (References)

- 1 Keogh J, Henwood T, Climstein M. Exercise to reduce effects of sarcopenia. *Aust Nurs J* 2012; 19(9): 39-40.
- 2 Sanders KJ, Kneppers AE, van de Bool C, Langen RC, Schols AM. Cachexia in chronic obstructive pulmonary disease: New insights and therapeutic perspective. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2016; 7(1): 5-22.
- 3 von Haehling S, Anker SD. Moving on up: the Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2015; 6(3): 193-6.
- 4 Qu Z, Huard J. Matching host muscle and donor myoblasts for myosin heavy chain improves myoblast transfer therapy. *Gene Ther* 2000; 7(5): 428-37.
- 5 Blaauw B, Reggiani C. The role of satellite cells in muscle hypertrophy. *J Muscle Res Cell Motil* 2014; 35(1): 3-10.
- 6 Fry CS, Lee JD, Mula J, Kirby TJ, Jackson JR, Liu F, *et al.* Inducible depletion of satellite cells in adult, sedentary mice impairs muscle regenerative capacity without affecting sarcopenia. *Nat Med* 2015; 21(1): 76-80.
- 7 Ren Y, Wu H, Ma Y, Yuan J, Liang H, Liu D. Potential of adipose-derived mesenchymal stem cells and skeletal muscle-derived satellite cells for somatic cell nuclear transfer mediated transgenesis in Arbas Cashmere goats. *PLoS One* 2014; 9(4): e93583.
- 8 Gharaibeh B, Lu A, Tebbets J, Zheng B, Feduska J, Crisan M, *et al.* Isolation of a slowly adhering cell fraction containing stem cells from murine skeletal muscle by the preplate technique. *Nat Protoc* 2008; 3(9): 1501-9.
- 9 Ren Y, Wu H, Wang H, Wang X, Liang H, Liu D. The effect of Arbas Cashmere goat bone marrow stromal cells on production of transgenic cloned embryos. *Theriogenology* 2014; 81(9): 1257-67.
- 10 Ren Y, Wu H, Zhou X, Wen J, Jin M, Cang M, *et al.* Isolation, expansion, and differentiation of goat adipose-derived stem cells. *Res Vet Sci* 2012; 93(1): 404-11.
- 11 Wu H, Ren Y, Li S, Wang W, Yuan J, Guo X, *et al.* *In vitro* culture and induced differentiation of sheep skeletal muscle satellite cells. *Cell Biol Int* 2012; 36(6): 579-87.
- 12 Wobus AM, Boheler KR. Embryonic stem cells: Prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev* 2005; 85(2): 635-78.
- 13 Ziadlou R, Shalhoseini M, Safari F, Sayahpour FA, Nemati S, Eslaminejad MB. Comparative analysis of neural differentiation potential in human mesenchymal stem cells derived from chorion and adult bone marrow. *Cell Tissue Res* 2015; 362(2): 367-77.
- 14 Chen JY, Mou XZ, Du XC, Xiang C. Comparative analysis of biological characteristics of adult mesenchymal stem cells with different tissue origins. *Asian Pac J Trop Med* 2015; 8(9): 739-46.
- 15 Rahbarghazi R, Nassiri SM, Khazraini P, Kajbafzadeh AM, Ahmadi SH, Mohammadi E, *et al.* Juxtacrine and paracrine interactions of rat marrow-derived mesenchymal stem cells, muscle-derived satellite cells, and neonatal cardiomyocytes with endothelial cells in angiogenesis dynamics. *Stem Cells Dev* 2013; 22(6): 855-65.
- 16 Ratajczak MZ, Majka M, Kucia M, Drukala J, Pietrzowski Z, Peiper S, *et al.* Expression of functional CXCR4 by muscle satellite cells and secretion of SDF-1 by muscle-derived fibroblasts is associated with the presence of both muscle progenitors in bone marrow and hematopoietic stem/progenitor cells in muscles. *Stem Cells* 2003; 21(3): 363-71.
- 17 Tong HL, Yin HY, Zhang WW, Hu Q, Li SF, Yan YQ, *et al.* Transcriptional profiling of bovine muscle-derived satellite cells during differentiation *in vitro* by high throughput RNA sequencing. *Cell Mol Biol Lett* 2015; 20(3): 351-73.
- 18 Harvey RP. Widespread expression of MyoD genes in *Xenopus* embryos is amplified in presumptive muscle as a delayed response to mesoderm induction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(20): 9198-202.
- 19 Kornegay JN, Li J, Bogan JR, Bogan DJ, Chen C, Zheng H, *et al.* Widespread muscle expression of an AAV9 human mini-dystrophin vector after intravenous injection in neonatal dystrophin-deficient dogs. *Mol Ther* 2010; 18(8): 1501-8.