

鲁西黄牛胚胎骨骼肌卫星细胞分离培养及生物学特性

边艳超^{1,2} 牧仁^{1,2} 李向臣² 李云章¹ 关伟军²

1. 内蒙古农业大学兽医学院, 呼和浩特 010018;

2. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193

摘要 为研究鲁西黄牛胚胎骨骼肌卫星细胞生物学特性, 取 30~50 日龄鲁西黄牛胚胎四肢骨骼肌, 分离培养鲁西黄牛胚胎骨骼肌卫星细胞。结果显示, 试验成功地分离了鲁西黄牛胚胎骨骼肌卫星细胞, 原代培养并传代至 16 代, 免疫细胞化学染色检测卫星细胞表面特异性标志 *Desmin*、*MyoD* 呈阳性表达, RT-PCR 检测 *Desmin*、*c-Met*、*Myf5*、*pax7* 呈阳性表达; 绘制生长曲线, 结果说明细胞具有较强增殖能力; 应用流式细胞仪对细胞进行周期分析, 结果显示 S 期细胞所占比例为 8.94%; 骨骼肌卫星细胞向成肌细胞诱导 10 d 后, 免疫细胞化学染色检测成肌特异性标志骨骼肌肌球蛋白呈阳性表达; 骨骼肌卫星细胞向脂肪细胞诱导 7 d 后, 油红 O 染色呈阳性, RT-PCR 检测脂肪细胞特异性标志 *ppar γ* 、*LPL* 呈阳性表达。结果表明试验成功建立了鲁西黄牛胚胎骨骼肌卫星细胞的体外扩增培养体系, 且该骨骼肌卫星细胞有发育形成肌管和脂肪细胞的多项分化潜能。

关键词 鲁西黄牛胚胎; 骨骼肌卫星细胞; 体外扩增; 培养体系; 增殖能力; 分化

中图分类号 S 823 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)02-0090-07

骨骼肌卫星细胞 (skeletal muscle satellite cells), 称肌肉干细胞 (muscle stem cells), 最早由 Mauro 等^[1] 在蛙骨骼肌中发现。多年的研究表明, 骨骼肌卫星细胞是位于肌细胞膜和基膜之间的一种经特化的、具有增殖和多项分化能力的生肌干细胞, 是组织工程理想的种子细胞。对成年的哺乳动物而言, 卫星细胞是肌肉损伤修复或再生的中介^[2]。骨骼肌卫星细胞一般处于静息状态, 当骨骼肌受到负重、外伤等外界刺激后, 卫星细胞被迅速激活, 便具有了增殖分化、融合成肌管、再形成肌细胞的能力^[3-4]。在不同培养条件下, 骨骼肌卫星细胞能分化为脂肪细胞、成骨细胞、软骨细胞、神经细胞等不同胚层的细胞, 这种可塑性吸引了众多研究者的目光。骨骼肌卫星细胞在骨骼肌早期生长发育以及再生中发挥重要作用, 因此在骨组织创伤修复和组织工程等临床应用中具有广泛的应用前景^[5]。

目前, 学者们已成功分离出人、鼠、猪、鸡等骨骼肌卫星细胞^[6-10], 但对牛的骨骼肌卫星细胞的分

离培养及分化潜能的研究尚未见报道, 本试验采用联合酶消化法和差速贴壁法成功分离得到鲁西黄牛的骨骼肌卫星细胞, 并证实该细胞具有发育形成肌管和脂肪细胞的多项分化潜能。

1 材料与方法

1.1 试验材料

30~50 d 的鲁西黄牛胚胎。

1.2 主要试剂

DMEM/F12、FBS 购自美国 GIBCO 公司, I 型胶原酶、胰蛋白酶、地塞米松、胰岛素购自美国 Sigma 公司, *Desmin* (鼠抗牛, 1:100) 抗体、*MyoD* (鼠抗牛, 1:100) 抗体、fast skeletal myosin (鼠抗牛, 1:100) 抗体购自美国 Abcam 公司, RT-PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司。

1.3 牛骨骼肌卫星细胞分离培养

将 30~50 d 的鲁西黄牛胚胎常规消毒后, 取其四肢, 用 PBS 洗涤 3 次, 剔除四肢上的皮肤、血管、

收稿日期: 2012-11-04

基金项目: 转基因生物新品种培育科技重大专项 (2011ZX08009-003-006、2011ZX08012-002-06)、基本科研业务项目 (2012z1072) 和国家家养动物种质资源平台项目 (2012)

边艳超, 博士研究生。研究方向: 畜禽干细胞及家畜外科学。E-mail: bianyanchao86@126.com

通讯作者: 李云章, 教授。研究方向: 临床兽医学。E-mail: liyunzhang1956@163.com

关伟军, 教授。研究方向: 畜禽干细胞及动物遗传资源与育种。E-mail: wjguan86@iascaas.net.cn

结缔组织等,用眼科剪将肌肉剪成 1 mm³ 大小的组织块,先加入适量 0.1% 的 I 型胶原酶于 37 ℃ 消化 30 min,再加入等量的 0.25% 胰蛋白酶于 37 ℃ 消化 1 h,然后加入基础培养基(DMEM/F12+15% FBS)终止消化,依次过滤 75 μm、38 μm 细胞筛,滤液以 1 200 r/min 离心 8 min,弃上清,用完全培养基(DMEM/F12+15% FBS+100 IU/mL 青霉素+100 μg/mL 链霉素)将细胞沉淀重悬,于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 2 h 后,将细胞悬液移至另一个培养皿中继续培养,48 h 后更换培养液,去除未贴壁的细胞。观察细胞的生长状态,每隔 2~3 d 更换培养液^[11-13]。

1.4 牛骨骼肌卫星细胞传代培养及冻存复苏

当细胞生长汇合至 70%~80% 时,进行传代培养。弃去旧培养液,用 PBS 反复漂洗细胞 3 次,加入 0.25% 胰蛋白酶(含 0.02% EDTA)进行消化。观察细胞形态,当发现大量细胞回缩变圆时,加入完全培养基,轻轻吹打细胞,以 1:2 或 1:3 的比例进行传代培养。

常规消化法收集细胞,用细胞冻存液(50% FBS+10% DMSO+40% DMEM)重悬细胞,将悬液移置冻存管中,-80 ℃ 冰箱过夜,次日投入液氮中长期保存。细胞复苏时将冻存管从液氮中取出,投入 42 ℃ 水浴锅中使其迅速融化,移置含有新培养液的培养板中,于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中继续培养,24 h 后更换培养液。

1.5 牛骨骼肌卫星细胞生长曲线绘制

取生长良好的第 4 代牛骨骼肌卫星细胞,常规法消化,以 1.0×10⁴ 个/mL 的剂量接种于 24 孔培养板。每天取 3 孔细胞消化并计数,持续 8 d。以培养时间为横坐标、细胞数为纵坐标,绘制生长曲线。

1.6 牛骨骼肌细胞周期检测

取第 5 代对数生长期的牛骨骼肌卫星细胞,用 0.25% 胰蛋白酶消化并吹打成单个细胞,1 200 r/min 离心 8 min,弃上清,用 PBS 将细胞重悬,1 000 r/min 离心 4 min,重复 2 次,以去除细胞碎片,向细胞中加入 4 ℃ 预冷的 70% 乙醇,于 4 ℃ 冰箱中固定 18 h 以上。取固定好的细胞,1 200 r/min 离心 8 min,弃去乙醇,加入 PBS 重悬,1 200 r/min 离心 4 min,弃去 PBS,加入 PI 染液,于 4 ℃ 避光孵育 20 min,流式细胞仪(BECKMAN COULTER, cytomics FC500 MPL)检测。

1.7 牛骨骼肌卫星细胞免疫荧光及 RT-PCR 鉴定

取第 5 代牛骨骼肌卫星细胞,待细胞生长至 70%,经固定、通透、封闭处理后加入一抗 Desmin(Abcam)、MyoD(Abcam),4 ℃ 孵育过夜,PBS 洗涤 3 次后,加入山羊抗小鼠 FITC 标记的二抗(中山金桥),室温避光孵育 1 h,PBS 洗涤,加入 DAPI 染液,室温避光孵育 20 min,PBS 冲洗后,激光共聚焦显微镜(Nikon,D-ECLIPSE C1)拍照。

取生长至 80% 的 P5 代细胞,TaKaRa Taq RT-PCR(DR001A)试剂盒检测卫星细胞表面特异性标志 *Desmin*、*c-Met*、*Myf5*、*pax7* 和 *β-actin* 的表达强度。引物见表 1。

表 1 RT-PCR 鉴定引物序列
Table 1 Primer sequences used in RT-PCR

基因 Gene	引物序列 Primer sequence	退火温度/℃ Temp.	循环数 Cycle	片段大小/bp Fragment size
<i>Desmin</i>	S:5'CGCTTCGCCAACTACATCG 3'	59	30	267
	A:5'GTCCTCCGCTTCTTCTTCAG 3'			
<i>cMet</i>	S:5'GAGCACCCGCTAAACC 3'	51	30	174
	A:5'TTCCTCCAATCGACA 3'			
<i>Myf5</i>	S:5'TGCCCAAGGTGGAGAT 3'	51	30	365
	A:5'TTGAGAATCGTGCTG 3'			
<i>Pax7</i>	S:5'GCGAGAAGAAAGCCAAGCA 3'	58	30	267
	A:5'GGCGGTTACTGAACAGACC 3'			
<i>βactin</i>	S:5'TGCGGCATTACGAAACTAC 3'	57	30	483
	A:5'TGTCACCTTCACCGTTCCAGT 3'			
<i>pparγ</i>	S:5'GGGAGATGCTCTTATTGAC 3'	51	30	440
	A:5'CATAGTGAACCCGTGACG 3'			
<i>LPL</i>	S:5'TCCTGGAGTGACCGAATC 3'	52	30	127
	A:5'CAAGGCACCCAGAGTT 3'			
<i>GAPDH</i>	S:5'ATGCTGGTGCTGAGTATGTG 3'	54	30	293
	A:5'CTTCTGGTGGCAGTGAT 3'			

1.8 牛骨骼肌卫星细胞向成肌细胞诱导分化及鉴定

取第 5 代牛骨骼肌卫星细胞,当细胞生长约 70% 时,将培养液更换为成肌诱导液(DMEM/F12+5% HBS),每隔 2~3 d 更换 1 次培养液,每天在倒置显微镜下观察细胞的形态变化,并用免疫细胞化学染色法鉴定成肌分化特异性标志骨骼肌肌球蛋白(fast skeletal myosin)的表达强度。

1.9 牛骨骼肌卫星细胞向脂肪细胞诱导分化及鉴定

取第 5 代牛骨骼肌卫星细胞,当细胞生长 70% 时,将培养液更换为脂肪诱导液(DMEM/F12+10% FBS+1 μmol/L 地塞米松+10 mg/L 胰岛素+0.5 mmol/L IBMX),每隔 2~3 d 更换 1 次培养液,每天在倒置显微镜下观察细胞的形态变化,油红 O 染

色检测脂滴的形成,并用 RT-PCR 检测脂肪细胞特异性标志 *pparγ*、*LPL* 的表达强度。引物见表 1。

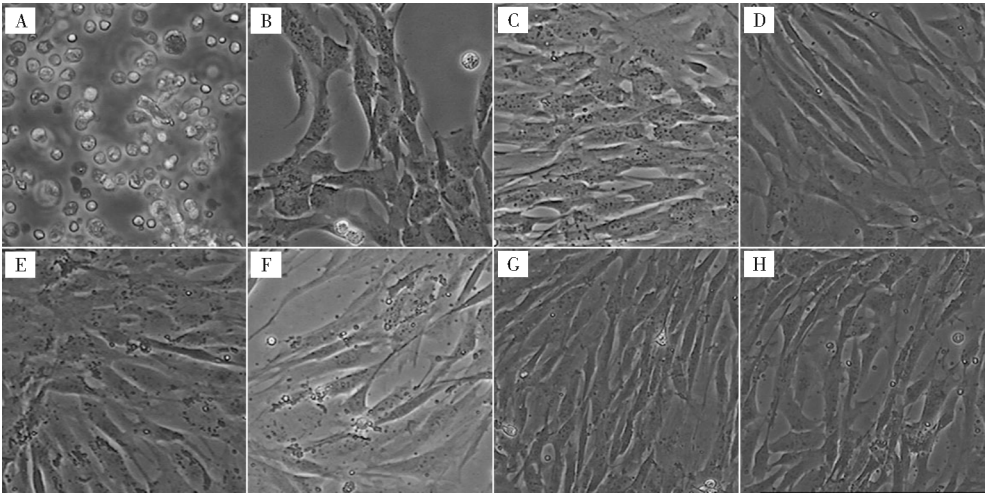
2 结果与分析

2.1 牛骨骼肌卫星细胞形态学观察及冻存复苏结果

倒置显微镜下观察细胞形态,刚分离获得的骨骼肌卫星细胞呈圆形,且折光性强(图 1-A);24 h 后细胞开始贴壁,48 h 后大部分细胞贴壁,为梭形或纺锤形,细胞饱满且折光性强(图 1-B);随着细胞增殖能力的增强,细胞密度逐渐增加,当细胞生长至

80%时(图 1-C),进行传代培养;传代后的细胞也为梭形或纺锤形,胞体饱满,折光性强(图 1-D,E);随着细胞代次的增加,细胞生长缓慢,P12 代细胞开始出现衰老现象,当传代至 P16 代时,胞质空泡明显,细胞立体感消失,最后核固缩(图 1-F),细胞从培养板上脱落。

牛骨骼肌卫星细胞冻存前(图 1-G)与复苏后(图 1-H)在形态上无明显差异,且生长状态良好,表明本试验所用的冻存体系对细胞的损伤不明显,适合牛骨骼肌卫星细胞的冻存,可以为保存鲁西黄牛这一珍贵的遗传资源提供新方法。



A:刚分离获得的骨骼肌卫星细胞形态 Morphology of freshly isolated skeletal muscle satellite cells;B:48 h 后贴壁细胞形态 The morphology of adhere cells after 48 h;C:生长至 70%~80% P0 代细胞形态 Morphology of P0 cells were grown to 70%-80%; D:P5 代细胞形态 Morphology of the cells of P5;E:P10 代细胞形态 Morphology of the cells of P10;F:P16 代细胞形态 Morphology of the cells of P16;G:冻存前细胞形态 Morphology of the cells before freezing;H:复苏后细胞形态 Morphology of the cells after recovery.

图 1 牛骨骼肌卫星细胞形态(100×)

Fig.1 Morphology of bovine skeletal muscle satellite cells(100×)

2.2 牛骨骼肌卫星细胞生长曲线绘制

如图 2 所示,牛骨骼肌卫星细胞的生长曲线呈“S”形,经过 3 d 的潜伏期后,细胞进入对数生长期,

迅速增殖,6~8 d 细胞的生长速度明显减慢,处于细胞生长的平台期,且细胞生长受到抑制,开始衰老凋亡。

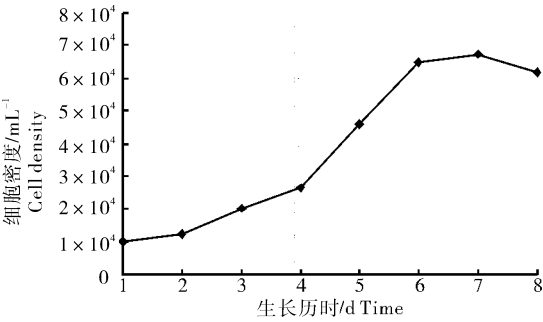


图 2 牛骨骼肌卫星细胞生长曲线

Fig.2 Cell growth curves of bovine skeletal muscle satellite cells

2.3 牛骨骼肌卫星细胞周期检测结果

采用流式细胞仪分析第 5 代牛骨骼肌卫星细胞周期(DNA 含量), $G_{0/1}$ 期细胞占细胞总数的 56.55%,S 期细胞占细胞总数的 8.94%, G_2 期细胞占细胞总数的 34.51%。检测结果说明,绝大多数细胞处于静止期 $G_{0/1}$,分裂期的细胞所占比例恰好与静止期细胞所占比例相反,说明本试验所培养的卫星细胞具有很强的增殖能力。

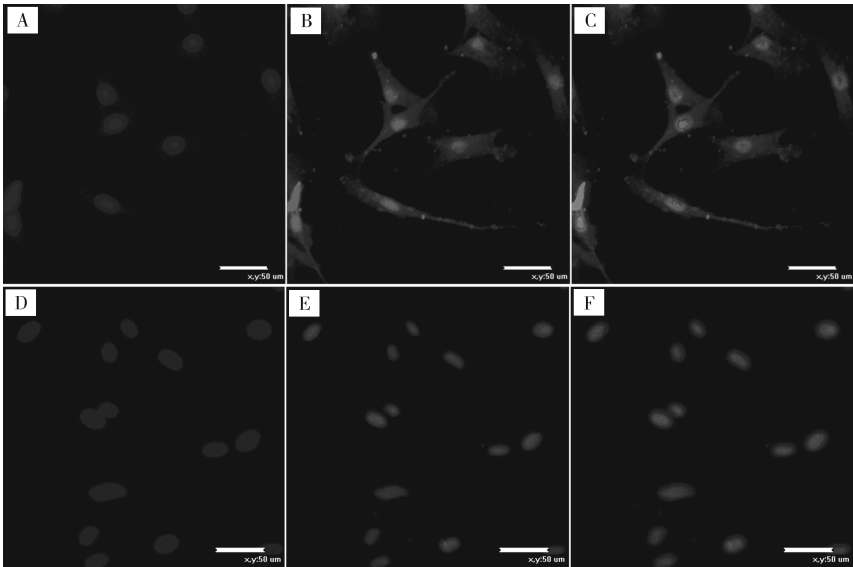
2.4 牛骨骼肌卫星细胞鉴定结果

应用免疫荧光法检测骨骼肌卫星细胞特异性标记 *Desmin*、*MyoD* 的表达,结果显示,本试验培养的

细胞表达 *Desmin*、*MyoD*(图 3),符合骨骼肌卫星细胞的生物学特性。

RT-PCR 检测牛骨骼肌卫星细胞表面特异性

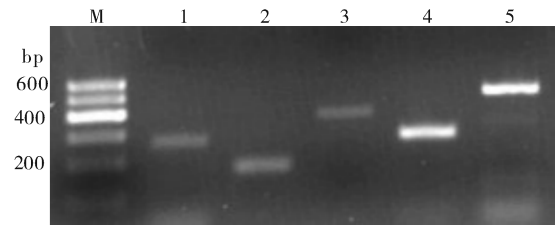
标志 *Desmin*、*c-Met*、*Myf5*、*pax7* 均成阳性表达(图 4)。表明试验所获得的细胞为骨骼肌卫星细胞。



A,D:应用 DAPI 对细胞核进行染色 Using DAPI to stain the nuclei of skeletal muscle satellite cells; B;*Desmin* 在细胞质中呈阳性表达 Keletal muscle satellite cells expressed *Desmin* cytoplasm; C:A 与 B 叠加 The merge of A and B; E;*MyoD* 在细胞核中呈阳性表达 Keletal muscle satellite cells expressed *MyoD* nucleus; F:D 与 E 叠加 The merge of D and E.

图 3 牛骨骼肌卫星细胞免疫荧光鉴定(标尺=50 μm)

Fig. 3 Immunofluorescence identification of bovine skeletal muscle satellite cells(bar=50 μm)



M:Marker I(600 bp); 1:*Desmin* (267 bp); 2:*c-Met* (174 bp); 3:*Myf5* (365 bp); 4:*pax7* (267 bp); 5:*β-actin* (483 bp).

图 4 牛骨骼肌卫星细胞 RT-PCR 鉴定
Fig. 4 RT-PCR identification of bovine skeletal muscle satellite cells

2.5 牛骨骼肌卫星细胞向成肌细胞诱导分化

成肌诱导 48 h 后,骨骼肌卫星细胞开始出现融合现象,随着诱导时间的延长,融合的细胞逐渐增多,并呈规律性平行排列,经过 10 d 成肌诱导后,大部分细胞融合,形成平行排列的多核肌管。经免疫细胞化学染色法检测成肌分化特异性标志 *fast skeletal myosin* 呈阳性表达(图 5)。

2.6 牛骨骼肌卫星细胞向脂肪细胞诱导分化

细胞加入脂肪诱导液后,细胞形态发生变化,胞内可见小的脂滴,随着诱导时间的延长,小脂滴逐渐

长大,相互融合形成大而圆的脂滴,诱导 7 d 后,油红 O 染色呈阳性,RT-PCR 检测脂肪细胞特异性表面标志 *pparγ*、*LPL* 均成阳性表达(图 6)。

3 讨 论

鲁西黄牛是中国著名的“五大名牛”之一,有“五花三层肉”之美誉,是世界上著名的肉用品种牛之一。近年来由于在生产过程中对其肉用性能的遗传潜力及遗传资源保护的不重视和杂交失度,纯种的鲁西黄牛数量急剧下降。若不采取有效的保护措施,这一宝贵的遗传资源将面临绝种的危险,目前已列入国家级畜禽遗传资源重点保护品种名录。本试验从遗传资源保护的角度出发,分离培养了鲁西黄牛骨骼肌卫星细胞,能为我国遗传资源保护工作提供研究基础,也为骨组织创伤修复和组织工程等临床应用提供相应的理论依据。

骨骼肌卫星细胞参与了骨骼肌的生长和修复,是无可争议的成体干细胞^[14]。目前分离纯化骨骼肌卫星细胞的方法很多,如组织块贴壁法、酶消化法、密度梯度离心法、流式细胞仪分选法和免疫磁珠

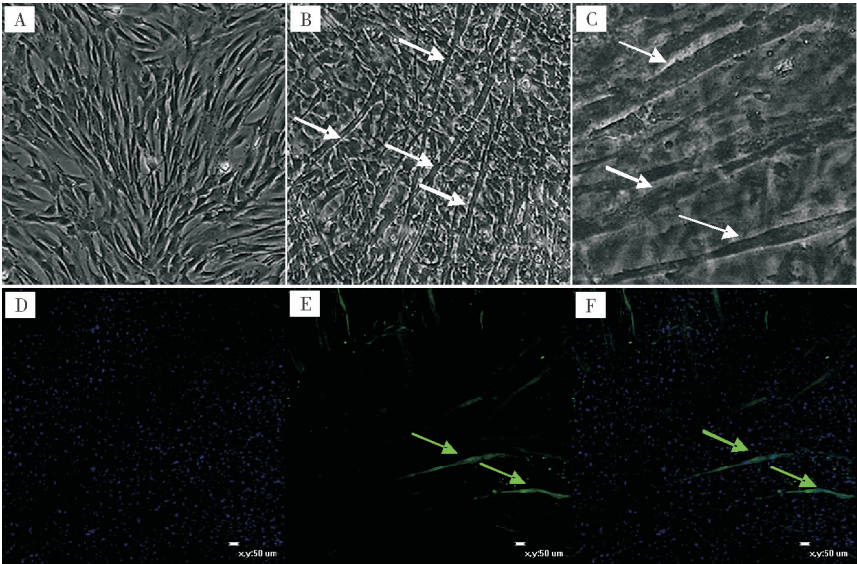


图 5 牛骨骼肌卫星细胞成肌诱导分化

Fig. 5 Myogenic differentiation of the bovine skeletal muscle satellite cells

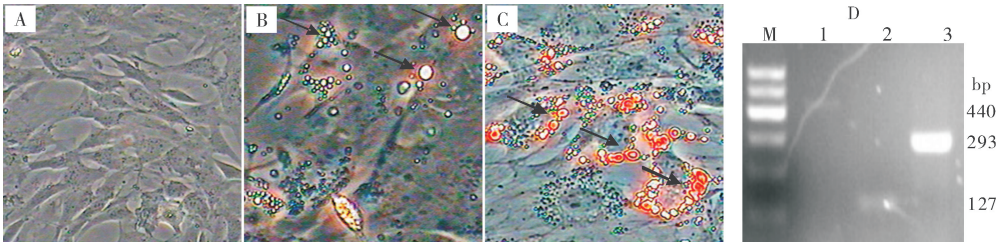


图 6 牛骨骼肌卫星细胞向脂肪细胞诱导分化

Fig. 6 Adipogenic differentiation of the bovine skeletal muscle satellite cells

分选法等^[15-16]。单独使用以上方法分离获得的骨骼肌卫星细胞均未达到预期的效果。本试验采用联合 I 型胶原酶和胰蛋白酶消化法分离骨骼肌卫星细胞,并严格控制消化时间,既不会因消化时间过长而损伤骨骼肌卫星细胞,又不会因消化时间过短而得不到足量的骨骼肌卫星细胞;再采用差速贴壁法纯化骨骼肌卫星细胞,贴壁 2 h 获得的细胞主要是成纤维细胞,因此将贴壁的细胞去除,保留细胞悬液,此时的细胞悬液中含有肌源性干细胞、血细胞等杂细胞,而大多数骨骼肌卫星细胞在接下来的 48 h 内

已贴壁,再采用换液的方法纯化卫星细胞。总之,本试验采用联合酶消化法和差速贴壁法获得了大量牛骨骼肌卫星细胞,且该方法操作简单、经济实惠、对细胞的损害小,值得推广。

牛骨骼肌卫星细胞的生长曲线呈标准的“S”形,增殖过程分别经历了潜伏期、对数生长期和平台期。处于对数生长期的细胞增殖迅速、生长良好,说明在体外培养条件下,牛骨骼肌卫星细胞具有较强的自我更新能力。细胞周期检测结果显示,56.55% 的细胞处于静止期($G_{0/1}$),其余的细胞处于分裂期

(S+G₂)。大部分细胞处于静止期说明细胞具有很强的增殖储备能力,不参与细胞的分裂,而是执行一些其他的生物学功能,如细胞分化等。

静息期的骨骼肌卫星细胞表达 *pax7*、*M-cadherin*、*CD34* 和低水平的 *Myf5*^[17-18],其中 *pax7* 是鉴定静息期卫星细胞较为重要的分子标志之一^[19]。静息期的卫星细胞一旦被激活,*MyoD* 的表达迅速上调,*MASTR* 和 *MRTF-A* 协同作用来调节 *MyoD* 的表达,肌肉的质量及肌肉的再生^[20],随后共表达 *pax7*、*M-cadherin* 和 *Myf5*,细胞进入分裂期,开始表达 *PCNA*、*Myogenin*,当表达骨骼肌结构基因 *actin* 和 *MyHC*^[21] 时,标志着生肌分化进入最后时期,这些特异性分子标志可作为鉴定增殖期卫星细胞的标志。骨骼肌卫星细胞同样表达中间丝蛋白 *Desmin*,可作为鉴定卫星细胞的分子标志^[22-23]。为了验证所得的细胞是肌卫星细胞,本试验进行了 *Desmin*、*MyoD* 免疫细胞化学染色,染色结果显示,所得细胞呈 *Desmin* 胞质阳性表达,*MyoD* 胞核阳性表达;RT-PCR 检测结果显示 *Desmin*、*c-Met*、*Myf5*、*pax7* 均成阳性表达,表明所得细胞为肌卫星细胞。

培养基提供细胞生长所必要的营养成分,对细胞的增殖与分化产生重要影响,不同的分化培养基,能使卫星细胞向不同的方向分化,尤其是培养基中的血清浓度,高浓度血清能促进卫星细胞的增值,抑制其分化;低血清浓度则促进卫星细胞分化^[24-25]。本试验中采用含 20%(V/V) 血清的培养基使牛骨骼肌卫星细胞很好地增殖,而在分化试验中,采用含 5%(V/V) 血清的培养基能成功地将卫星细胞诱导分化为多核肌管。在免疫荧光鉴定中,成肌分化特异性标志 *fast skeletal myosin* 呈阳性表达。本试验还成功地将牛骨骼肌卫星细胞诱导为脂肪细胞,充分说明了卫星细胞的多项分化能力。

本试验成功地建立了适合牛骨骼肌卫星细胞体外扩增的培养体系,并应用免疫荧光法和 RT-PCR 对其进行鉴定;通过细胞周期检测及生长曲线的绘制,发现卫星细胞具有很强的增殖能力,适合在体外扩增培养;对细胞分化能力的研究结果显示,牛骨骼肌卫星细胞成功地向成肌细胞和脂肪细胞分化,证明了该细胞具有多项分化潜能,为畜禽遗传资源的保存提供新的方法;同时也为今后各类干细胞的研究提供相应的理论依据。

参 考 文 献

- [1] MAURO A. Satellite cell of skeletal muscle fibers [J]. The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology, 1961, 9: 493-495.
- [2] SEALE P, RUDNICKI M A. A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells [J]. Developmental Biology, 2000, 2: 115-124.
- [3] PARKER M H, SEALE P, RUDNICKI M A. Looking back to the embryo: defining transcriptional network in adult myogenesis [J]. Nature Reviews Genetics, 2003(4): 497-507.
- [4] MCKINNELL I W, ISHIBASHI J, GRAND F L, et al. Pax7 activates myogenic genes by recruitment of a histone methyltransferase complex [J]. Nature Cell Biology, 2008, 10: 77-84.
- [5] GOYENVALLE A, SETO J T, DAVIES K E, et al. Therapeutic approaches to muscular dystrophy [J]. Human Molecular Genetics, 2011, 20: R69-R78.
- [6] BOLDRIN L, MUNTONI F, MORGAN J E. Are human and mouse satellite cells really the same? [J]. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 2010, 58(11): 941-955.
- [7] PERRUCHOT M H, ECOLAN P, SORENSEN I L, et al. In vitro characterization of proliferation and differentiation of pig satellite cells [J]. Differentiation, 2012, 84(4): 322-329.
- [8] MESIRES N T, DOUMIT M E. Satellite cell proliferation and differentiation during postnatal growth of porcine skeletal muscle [J]. Cell Physiology, 2002, 282(4): c899-c906.
- [9] BAI C Y, HOU L L, LI F H, et al. Isolation and biological characteristics of Beijing fatty chicken skeletal muscle satellite cells [J]. Cell Communication and Adhesion, 2012, 19(5/6): 69-77.
- [10] 刘侠, 陈岩. 蛋鸡骨骼肌卫星细胞的特性比较分析 [J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(12): 2460-2462.
- [11] RANDO T A, BLAU H M. Primary mouse myoblast purification, characterization, and transplantation for cell-mediated gene therapy [J]. The Journal of Cell Biology, 1994, 125(6): 1275-1287.
- [12] VELLEMAN S G, LIU X S, NESTOR K E, et al. Heterogeneity in growth and differentiation characteristics in male and female satellite cell isolated from turkey lines with different growth rates [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 2000, 125: 503-509.
- [13] 李方华, 侯玲玲, 马月辉, 等. 北京油鸡骨骼肌卫星细胞的分离、培养、鉴定及成肌诱导分化的研究 [J]. 中国农业科学, 2010, 43(22): 4725-4731.
- [14] DEASY B M, GHARAIBEH B M, POLLETT J B, et al. Long-term self-renewal of postnatal muscle-derived stem cells [J]. Molecular Biology of the Cell, 2005, 16: 3323-3333.
- [15] DEASY B M, SCHUGAR R C, HUARD J. Sex differences in muscle-derived stem cells and skeletal muscle [J]. Eukaryotic

Gene Expression,2008,18(2):173-188.

[16] HUARD J,CAO B,QU-PETERSEN Z. Muscle-derived stem cells:potential for muscle regeneration [J]. Birth Defects Research,2003,69:230-237.

[17] SEAL P,SABOURIN L A,GIRGIS A,et al. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cell [J]. Cell,2000,102(6):777-786.

[18] ZAMMIT P S,PARTRIDGE T A,YABLONKA Z. The skeletal muscle satellite cell:the stem cell that came in from the cold [J]. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 2006, 54 (11):1177-1191.

[19] RELAIX F,MONTARRAS D,ZAFFRAN S,et al. Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping function in adult muscle progenitor cells [J]. The Journal of Cell Biology,2006,172(1): 91-102.

[20] MOKALLED M H,JOHNSON A N,GREEMERS E E,et al. MASTR directs MyoD-dependent satellite cell differentiation during skeletal muscle regeneration [J]. Genes Development, 2012,26:190-202.

[21] ZAMMIT P S,GOLDING J P,NAGATA Y,et al. Muscle satellite cells adopt divergent fates;a mechanism for self-renewal [J]. The Journal of Cell Biology,2004,166(3):347-357.

[22] GARRY D J,YANG Q,BASSEL R,et al. Persistent expression of MNF identifies myogenic stem cells in postnatal muscles [J]. Developmental Biology,1997,188(2):280-294.

[23] CORNELISON D D,FILLA M S,STANLEY H M,et al. Syndecan-3 and syndecan-4 specifically mark skeletal muscle satellite cells and are implicated in satellite cell maintenance and muscle regeneration [J]. Developmental Biology, 2001, 239 (1):79-94.

[24] 吕萍,马景涛. 骨骼肌卫星细胞的分离及培养[J]. 河北医科大学学报,2006,27(4):305-307.

[25] 郑素月,樊宝良,张庆桥. 蛋鸡骨骼肌卫星细胞分离培养及鉴定 [J]. 中国畜牧兽医,2011,38(2):80-83.

Isolation and biological characteristics of skeletal muscle satellite cells of Luxi cattle embryo

BIAN Yan-chao^{1,2} MU Ren^{1,2} LI Xiang-chen² LI Yun-zhang¹ GUAN Wei-jun²

1. College of Animal Veterinary, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China;
2. Institute of Beijing Animal Science and Veterinary, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

Abstract To better understand the biological characteristics of Luxi cattle embryo skeletal muscle satellite cells, those cells from the skeletal muscles of the limbs of 30-50 days old Luxi cattle embryo were isolated and cultured. The results showed that two surface antigen markers, *Desmin* and *Myod*, were positively expressed in the harvested cells by immunofluorescence. *Desmin*, *Myf5*, *c-Met* and *pax7* were found to be positively expressed by RT-PCR. Growth curve indicated that the cells were capable of proliferating strongly. In addition, the cell cycle analysis showed that the cells in S phase accounted for 8.94% of the total. After 10 days for myoblasts induce, the maker specific for fast skeletal myosin of myotubules was positively detected by immunofluorescence. After 7 days for adipogenic induce, lipid droplets were detected to be positive using Red Oil O dye; the adipocyte specific genes, *ppar-γ* and *LPL*, were identified to be positively expressed by RT-PCR. The Luxi cattle embryo skeletal muscle satellite cells were cultured successfully via vitro culture system, and could be induced to differentiate into multinucleated myotubes and adipocyte, respectively. This provided a new method for preserving animal genetic resources and for study stem cells theoretically in the future.

Key words Luxi cattle embryo; skeletal muscle satellite cells; amplified *in vitro*; culture system; multiplication capacity; differentiation

(责任编辑:边书京)