

网络出版时间:2012-05-22 16:25

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20120522.1625.004.html>

秦川牛胎儿骨骼肌卫星细胞的分离培养

何玉龙^{1,2a,2b}, 吴月红^{1,2a,2b}, 权富生¹, 刘 琴¹, 张 涌¹

(1 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100;

2 宁夏大学 a 西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室, b 生命科学学院, 宁夏 银川 750021)

[摘 要] **【目的】**探索胎牛骨骼肌卫星细胞分离、培养、鉴定及基因转染的方法。**【方法】**分别采用 I 型胶原酶消化、I 型胶原酶与胰蛋白酶二步消化及链霉菌蛋白酶消化法对胎牛骨骼肌卫星细胞进行培养, 比较了 3 种不同分离方法所得细胞数及其存活率的差异; 利用差速贴壁法和 Percoll 密度梯度离心相结合的方法纯化骨骼肌卫星细胞, 对纯化后的细胞进行 *myostatin* 基因 RT-PCR 以及结蛋白(Desmin)免疫细胞化学染色鉴定, 最后通过电转染法对纯化的骨骼肌卫星细胞进行 *EGFP* 基因转染研究。**【结果】**3 种消化培养方法中, 以链霉菌蛋白酶消化法分离得到的胎牛骨骼肌卫星细胞数显著高于其它 2 种方法 ($P < 0.05$), 但细胞存活率较低 ($P < 0.05$); 而采用 I 型胶原酶与胰蛋白酶二步消化法可以得到相对较高的细胞数及存活率。利用差速贴壁和 Percoll 密度梯度离心相结合的方法可以得到纯化的骨骼肌卫星细胞; 电转染法适用于骨骼肌卫星细胞的基因转染。**【结论】**建立了胎牛骨骼肌卫星细胞分离、培养、纯化、鉴定及基因转染的方法, 为通过转基因方法改良秦川牛产肉性能研究奠定了基础。

[关键词] 秦川牛; 骨骼肌卫星细胞; 培养; *EGFP* 基因

[中图分类号] Q813.1⁺1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2012)06-0001-06

Isolation and transfection of skeletal muscle satellite cells from Qinchuan fetal bovine

HE Yu-long^{1,2a,2b}, WU Yue-hong^{1,2a,2b}, QUAN Fu-sheng¹,
LIU Qin¹, ZHANG Yong¹

(1 College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 a Key Lab of Ministry of Education for Protection and Utilization of Special Biological Resources in Western China,

b School of Life Science, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021, China)

Abstract: **【Objective】**The study was done to establish a stable method for isolation, purification and gene transfection of Qinchuan fetal bovine skeletal muscle satellite cells. **【Method】**Fetal cattle muscle satellite cells were isolated from Semimembranosus muscle by digesting with collagenase I, collagenase I combined with trypsin (two-step methods) or pronase. The differences in cells number and survival rate were compared. The cells were purified by Percoll density gradient centrifugation combined with different adherent methods. The cells were characterized by RT-PCR for myostatin gene and immunocytochemistry for Desmin. Then *EGFP* gene was introduced by electric transfection method. **【Result】**The results showed that the cells number isolated by pronase was higher than that by other methods ($P < 0.05$), but the survival rate of cells was lower ($P < 0.05$). The cells number and survival rate were higher by two-step meth-

* [收稿日期] 2011-12-06

[基金项目] 转基因生物新品种培育科技重大专项(2008ZX080072004)

[作者简介] 何玉龙(1979—), 男, 内蒙古集宁人, 讲师, 博士, 主要从事动物发育生物学及动物克隆与转基因研究。

E-mail: heyulong2003@163.com

[通信作者] 张 涌(1956—), 男, 内蒙古和林格尔人, 教授, 博士生导师, 主要从事动物克隆及转基因研究。

E-mail: zhy_56@126.com

ods. Purified skeletal muscle satellite cells were obtained by Percoll density gradient centrifugation combined with different adherent methods. Furthermore, the cells were successfully transfected by electric transfection method. 【Conclusion】 We established the methods for isolation, culture, purification, characterization and gene transfection for Qinchuan fetal bovine skeletal muscle satellite cells and laid the foundation for the study of improving Qinchuan bovine meat production performance by transgenic methods.

Key words: Qinchuan bovine; skeletal muscle satellite cell; culture; *EGFP* gene

骨骼肌组织中的成肌细胞以肌卫星细胞形式存在,是位于肌细胞膜和基膜之间的具有增殖分化潜力的肌源性细胞。卫星细胞在动物出生后的肌肉生长发育与再生过程中发挥着十分重要的作用^[1-3]。自 1961 年 Mauro^[4]在蛙的肌肉中首先发现肌卫星细胞以来,包括人类在内的多种动物的肌卫星细胞已被成功分离并进行体外培养^[3,5-11]。目前已有关于其它品种牛骨骼肌卫星细胞分离培养的报道^[12-14],但尚未见秦川牛骨骼肌卫星细胞的相关研究。据此,本研究对秦川牛胎儿骨骼肌卫星细胞的体外培养、鉴定、纯化及基因转染等进行了探索,以期为进一步利用秦川牛骨骼肌卫星细胞进行转基因动物研究提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 秦川牛胎儿(3 月龄左右),采自西安某屠宰场。

1.1.2 主要试剂 DMEM 培养基、胎牛血清 FBS, Gibco 公司; I 型胶原酶、多聚赖氨酸, Sigma 公司; 胰蛋白酶, Serva 公司; 链霉蛋白酶, Roche 公司; Percoll 细胞分离液, Pharmacy 公司; 青霉素/链霉素双抗, 国产; 多聚甲醛、Desmin 单克隆抗体、SABC 试剂盒和 DAB 试剂盒, 武汉博士德生物工程有限公司; RNAprep 培养细胞总 RNA 提取试剂盒、DNA Marker D2000, 天根公司; 反转录试剂盒, Fermentas 公司; 质粒中量提取及纯化试剂盒, Promega 公司。

1.2 原代细胞的分离与培养

在秦川牛屠宰后立即无菌采集胎儿,放置于 37 ℃ 无菌生理盐水(加双抗)中,尽快带回实验室。将胎牛用预热的生理盐水充分清洗,再用 PBS(加双抗)清洗 1~2 次,并在无菌条件下分离半膜肌,经 PBS 液清洗 3~4 次,去除筋膜、脂肪组织、血管和骨骼等,分别采用以下 3 种方法分离培养骨骼肌卫星细胞,每种方法的骨骼肌用量均为 10 g。

1.2.1 I 型胶原酶消化法 将骨骼肌剪成 1 mm³

左右的组织块,移入含有无血清 DMEM 的培养液中,静置 5 min 后,去除培养液,重新加入无血清 DMEM 培养液,然后加入终质量浓度 1 g/L 的 I 型胶原酶,混匀后,37 ℃ 培养 24 h。消化完成后,用吸管吹打,1 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,在沉淀中加入适量含体积分数 10% FBS 的生长培养基,反复吹打混悬,将细胞悬液和未消化完全的沉淀,用孔径 0.037 mm 的细胞筛过滤,收集滤液,细胞计数后培养。

1.2.2 I 型胶原酶与胰蛋白酶二步消化法 参考危小焰等^[15]与史仍飞等^[16]的方法,向剪碎的骨骼肌组织块中加入终质量浓度 1 g/L 的 I 型胶原酶消化液,于 37 ℃ 搅拌消化 60 min; 1 000 r/min 离心 5~7 min,去掉上清液;在上述沉淀中再加入适量的 2.5 g/L 胰蛋白酶消化液,混匀,37 ℃ 消化 30 min,每 5~10 min 用吸管吹打 1 次,加胎牛血清培养液终止消化,1 000 r/min 离心 10 min,去掉上清液,在沉淀中加入生长培养基,反复吹打或振荡 40 s,1 000 r/min 离心 5 min,收集沉淀,悬浮,重复 2 次。将所有收集的细胞悬液和没有消化完全的沉淀,用孔径 0.037 mm 的细胞筛过滤,收集滤液,细胞计数后培养。

1.2.3 链霉蛋白酶消化法 参考 Kamanga-Sollo 等^[12]的方法,向 50 mL 离心管中加入 25 mL 链霉蛋白酶(Pronase 质量浓度 1 mg/mL),放入剪碎的骨骼肌组织,混匀,37 ℃ 水浴孵育 50~60 min,1 500 r/min 离心 6 min,去除上清液。每管加入 30 mL 无菌 PBS 后用孔径 0.037 mm 的细胞筛过滤,收集滤液,细胞计数后培养。

将上述分离的细胞均接种在经多聚赖氨酸包被的培养皿或培养板中,于 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 条件下,用含体积分数 10% FBS 的 DMEM(含青链霉素双抗)培养液培养,在倒置显微镜下观察细胞形态与生长情况。利用细胞计数的方法,计数各种方法消化后的细胞数与培养 12 h 后的悬浮细胞(未贴壁细胞)数,计算细胞存活率(S):

$$S = (A - B) / A \times 100\%。$$

式中: S 为细胞存活率, A 为消化后的细胞数, B 为培养12 h后的悬浮细胞(未贴壁细胞)数。所有试验均重复3次,用 t 检验进行差异显著性分析。

1.3 骨骼肌卫星细胞的纯化

1.3.1 差速贴壁纯化 待分离的细胞生长至70%~80%融合时,用2.5 g/L胰蛋白酶(含有0.4 g/L EDTA)消化5~10 min,含血清培养液终止消化,1 000 r/min离心5~10 min,弃上清,用含体积分数10%胎牛血清的DMEM培养液重新悬浮细胞,接种于6 cm的培养皿中继续培养。利用差速贴壁法纯化细胞,即培养40 min后将未贴壁的细胞与培养液一起吸取到另1个培养皿中继续培养,2 d后换液。

1.3.2 Percoll密度梯度离心纯化 参考Mau等^[8]与张玉石等^[17]的方法,制备25%、40%和90%的Percoll密度梯度分离液。消化经差速贴壁纯化后的细胞,将细胞悬液置于Percoll密度梯度分离液中,4℃、1 800× g 离心45 min后,吸取40%与90%密度梯度分离液之间的细胞进行培养,2~3 d后在倒置显微镜下观察细胞形态与生长情况。

1.4 骨骼肌卫星细胞的鉴定

1.4.1 *myostatin*基因的RT-PCR鉴定 取经纯化传代后的目的细胞,接种于培养皿中,加入培养基培养。待细胞生长至60%~70%融合时,用RNAprep培养细胞总RNA提取试剂盒提取细胞总RNA,并用cDNA第1链反转录试剂盒将mRNA反转录成cDNA,备用。

参考牛的*myostatin*基因序列(GenBank登录号:AY160688),利用Premier 5.0软件设计引物P1、P2,其中P1序列为:5'-GACGGCTCCTTG-GAAGACGAT-3',P2序列为:5'-TCATGAACAC-CCACAGCGATCTA-3'。引物由上海生工生物工程有限公司合成,扩增长度为822 bp。以牛成纤维细胞作为对照,常规PCR方法扩增秦川牛胎儿骨骼肌卫星细胞的*myostatin*基因。PCR扩增产物经10 g/L琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.4.2 结蛋白(Desmin)免疫细胞化学染色鉴定 将骨骼肌卫星细胞消化后,接种在预先放置有盖玻片(经灭菌处理)的6孔板中培养,待70%~80%融合时,用40 g/L多聚甲醛固定。固定后的细胞参照SABC(小鼠IgG)-POD kit试剂盒说明书,进行结蛋白免疫细胞化学染色,一抗为结蛋白单克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司),用DAB显色试剂盒(棕黄色)显色。试验同时设牛成纤维细胞对照组。

1.5 pEGFP-N1质粒的提取及骨骼肌卫星细胞的转染

含有绿色荧光蛋白EGFP基因的载体pEGFP-N1购于Clontech公司,按照质粒提取及纯化试剂盒说明书,提取pEGFP-N1质粒,琼脂糖凝胶电泳及分光光度计检测浓度,-20℃保存备用。

将秦川牛胎儿骨骼肌卫星细胞在100 mm培养皿中培养,待生长至60%~70%融合时,用2.5 g/L胰蛋白酶消化悬浮细胞;吸取细胞悬液(细胞数量约 2×10^6 mL⁻¹),1 000 r/min离心5 min,用无血清培养液或Optim-MEM重悬,离心,弃上清。用体积分数75%电转液(电转液配方为KCl 120 mmol/L, CaCl₂·2H₂O 0.15 mmol/L, K₂HPO₄ 10 mmol/L, MgCl₂·6H₂O 5 mmol/L, pH7.6)加体积分数25% Optim-MEM悬浮细胞,加入10 μg纯化后的pEGFP-N1质粒,混匀,4℃放置10 min,转移至电转杯(规格:0.4 cm),在1 275 V/cm和2 ms条件下电穿孔2次。电击完毕,于37℃放置10 min,接种在6孔板中,添加含体积分数10% FBS的DMEM培养液培养,48 h后用荧光显微镜观察绿色荧光蛋白的表达情况。

2 结果与分析

2.1 骨骼肌卫星细胞的形态观察

由图1可知,分离培养的骨骼肌卫星细胞形态为梭形或纺锤形,并呈长轴平行排列,具有明显的方向性,胞核圆形,核仁明显;随培养时间的延长,相邻的细胞会融合成肌管,继而形成串联,继续培养则可融合形成较大的肌管。

2.2 不同方法分离的骨骼肌卫星细胞数目及其存活率

按常规细胞计数的方法,计数3种不同方法消化后的骨骼肌卫星细胞数与培养12 h后的悬浮细胞(未贴壁细胞)数,并计算细胞存活率,结果见表1。由表1可知,虽链霉菌蛋白酶消化法所得到的细胞数目显著高于其它2种方法($P < 0.05$),但细胞存活率却显著较低($P < 0.05$),而胶原酶和胰蛋白酶二步消化法所获得的细胞数目和细胞存活率均较高。

2.3 骨骼肌卫星细胞的鉴定

2.3.1 RT-PCR鉴定 PCR产物经10 g/L琼脂糖凝胶电泳检测,结果(图2)显示,目的细胞扩增产物长度为822 bp的*myostatin*基因,与理论长度大小一致,而对照成纤维细胞无扩增产物,表明目的细胞中表达*myostatin*基因。

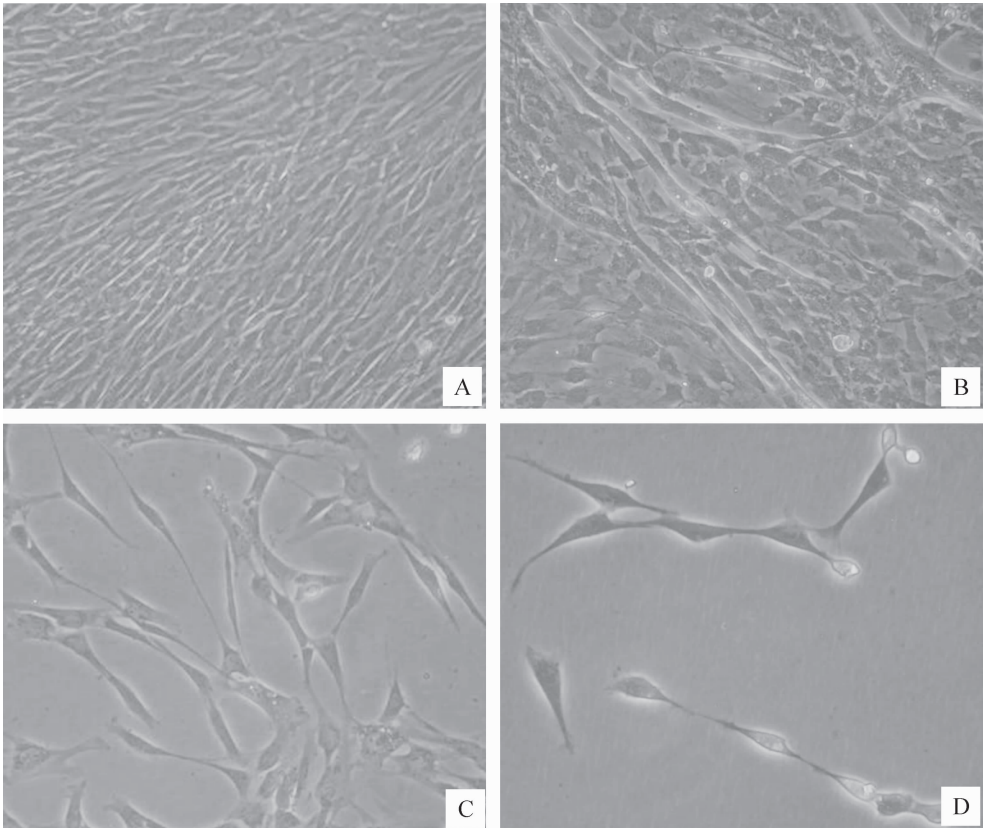


图 1 秦川牛胎儿骨骼肌卫星细胞的形态观察

A. 纯化前骨骼肌卫星细胞; B. 纯化前培养 7 d 融合成的肌管;C. 差速贴壁纯化后的骨骼肌卫星细胞;
D. Percoll 密度梯度离心纯化后形成的串珠状骨骼肌卫星细胞

Fig. 1 Morphology of Qinchuan fetal bovine satellite cells

A. Satellite cells before purification;B. Cells fuse and form myotube in day 7 before purification;C. Satellite cells were purified by different adherent method;D. Cells form into beads isolated by Percoll density gradient centrifugation purification

表 1 3 种不同消化方法分离所得秦川牛胎儿骨骼肌卫星细胞数和存活率的比较

Table 1 Comparison of cell number and cell survival rate of Qinchuan fetal bovine satellite cells isolated by different methods

分离方法 Different methods	细胞数/($\times 10^6$ mL ⁻¹) Cell number	细胞存活率/% Rate of cell survival
胶原酶法 Collagenase method	0.001 7 $\pm$ 0.000 23 a	92.67 $\pm$ 3.79 a
二步消化法 Two-step methods	0.543 0 $\pm$ 0.135 7 b	89.33 $\pm$ 2.52 a
链霉菌蛋白酶法 Protease method	8.180 0 $\pm$ 0.795 0 c	62.67 $\pm$ 3.06 b

注:同列数据后标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。
Note: Different lowercase letters marked in the same column data indicate significant differences ($P<0.05$).

2.3.2 结蛋白免疫细胞化学染色鉴定 结蛋白免疫细胞化学染色结果(图 3)显示,纯化后的目的细胞细胞核呈蓝色,且为单核细胞,而细胞质呈棕色,细胞形态多为长梭形,具有明显的方向性;对照成纤维细胞细胞质不着色或淡染,且细胞核形态与目的

细胞有明显差异。该结果表明,目的细胞为骨骼肌卫星细胞。

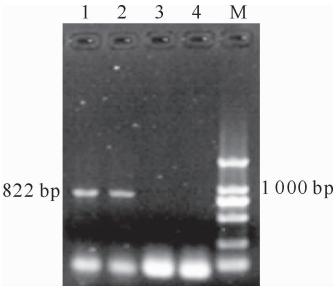


图 2 秦川牛胎儿骨骼肌卫星细胞 *myostatin* 基因的 RT-PCR 鉴定

1,2. 骨骼肌卫星细胞;3,4. 牛成纤维细胞;
M. DNA Marker D2000

Fig. 2 Electrophoresis of myostatin gene from Qinchuan fetal bovine skeletal muscle satellite cells was identified by RT-PCR method
1,2. Skeletal muscle satellite cells;3,4. Bovine fibroblasts;M. DNA Marker D2000

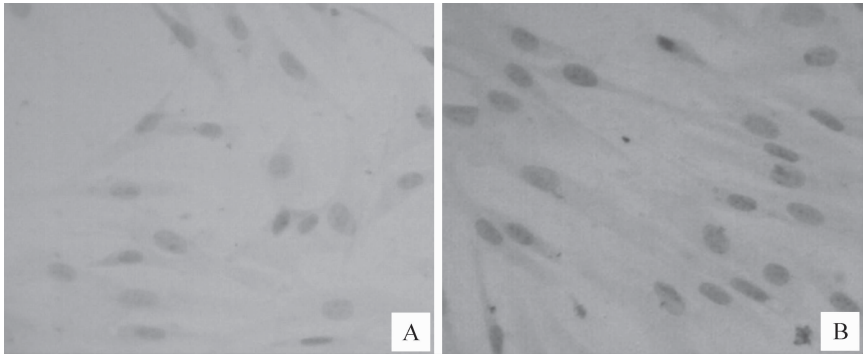


图 3 秦川牛胎儿骨骼肌卫星细胞结蛋白免疫细胞化学鉴定(100×)

A. 牛成纤维细胞对照;B. 骨骼肌卫星细胞

Fig. 3 Desmin of Qinchuan fetal bovine skeletal muscle satellite cells was identified by Immunocytochemistry method (100×)

A. Fibroblasts were used as negative control;B. Skeletal muscle satellite cells were positive

2.4 骨骼肌卫星细胞的基因转染

对纯化后的骨骼肌卫星细胞,经电转染法转染 pEGFP-N1 质粒 48 h 后,在荧光显微镜下可以观察到有绿色荧光蛋白表达(图 4),说明电转染的方法适用于胎牛骨骼肌卫星细胞的基因转染。

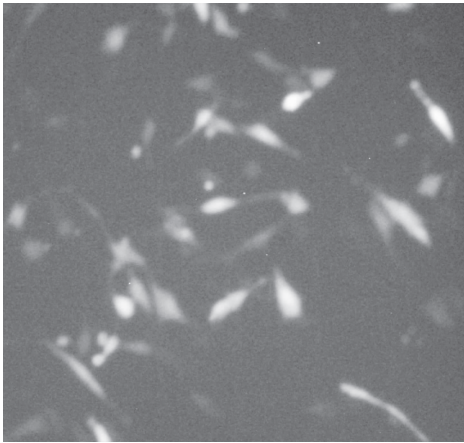


图 4 秦川牛胎儿骨骼肌卫星细胞转染 pEGFP-N1 质粒 48 h 后 EGFP 基因的表达

Fig. 4 EGFP gene expression of Qinchuan fetal bovine skeletal muscle satellite cells which were transfected by pEGFP-N1 plasmid after 48 h later

3 讨 论

目前,分离骨骼肌卫星细胞的方法主要有组织块法、酶消化分离法,其中酶消化分离法主要有胶原酶法、胰蛋白酶法、链霉菌蛋白酶法、Protease type XIV 酶法、中性蛋白酶法以及 2 或 3 种酶并用法等。本试验采用胶原酶消化法、胶原酶与胰蛋白酶二步消化法和链霉菌蛋白酶消化法 3 种方法分离秦川牛胎儿骨骼肌卫星细胞,并比较了这 3 种方法所获细胞数

及细胞存活率的差异。结果发现,链霉菌蛋白酶消化后得到的细胞数显著高于其它 2 种方法($P<0.05$),但细胞存活率最低,仅为 62.67%;单独利用胶原酶消化法得到的细胞最少但其存活率可达到 92.67% 以上;而使用胶原酶和胰蛋白酶二步消化法得到的细胞数和存活率均介于上述 2 种方法之间。由于胶原酶作用缓和,对细胞生长影响不大,所以单独用胶原酶消化得到的细胞数少,但细胞存活率高。胶原酶能够很好地分离肌纤维,起到分离肌束的作用,而胰蛋白酶或链霉菌蛋白酶可以使骨骼肌卫星细胞从基底膜与肌膜之间释放出来^[18],因此先用胶原酶消化后,再用胰蛋白酶短时间消化可以有效地提高分离的细胞数,且对细胞的损伤也较小,可以得到存活率较高的细胞。罗桂芬等^[19]和文旭辉^[20]研究表明,链霉菌蛋白酶消化所获得的肌卫星细胞数显著高于胰蛋白酶和胶原酶消化法,同本试验结果一致。但文旭辉^[20]研究还发现,3 种酶消化法所得细胞的存活率无显著差异。而本试验结果显示,链霉菌蛋白酶消化法所得细胞的存活率显著低于胶原酶消化或胶原酶和胰蛋白酶二步消化法($P<0.05$),分析其原因可能是由于不同研究中所使用的链霉菌蛋白酶浓度不同造成的。

骨骼肌卫星细胞培养的关键是细胞的纯化问题,即去除非肌原性的细胞,如成纤维细胞等。目前采用的纯化方法主要有差速贴壁法、密度梯度离心法、流式细胞仪分选法等,其中密度梯度离心法和流式细胞仪分选法的纯化效果较好,细胞纯度可达 99%^[21]。但由于受仪器设备的限制,本试验采用差速贴壁法与 Percoll 密度梯度离心相结合的方法进行卫星细胞的纯化,结果证实也可得到纯度较高的

骨骼肌卫星细胞,这为进一步通过转基因方法改良秦川牛的产肉性能研究提供了一种有效的途径。

[参考文献]

- [1] Sherwood R I, Christensen J L, Conboy I M, et al. Isolation of adult mouse myogenic progenitors: Functional heterogeneity of cells within and engrafting skeletal muscle [J]. *Cell*, 2004, 119 (4): 543-554.
- [2] Collins C A, Olsen I, Zammit P S, et al. Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche [J]. *Cell*, 2005, 122(2): 289-301.
- [3] Montarras D, Morgan J, Collins C, et al. Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration [J]. *Science*, 2005, 309(5743): 2064-2067.
- [4] Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers [J]. *J Biophys Biochem Cytol*, 1961, 9(2): 493-495.
- [5] Burton N M, Vierck J, Krabbenhoft L, et al. Methods for animal satellite cell culture under a variety of conditions [J]. *Methods Cell Sci*, 2000, 22(1): 51-61.
- [6] Mesires N T, Doumit M E. Satellite cell proliferation and differentiation during postnatal growth of porcine skeletal muscle [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002, 282(4): 899-906.
- [7] Rehfeldt C, Walther K, Albrecht E, et al. Intrinsic properties of muscle satellite cells are changed in response to long-term selection of mice for different growth traits [J]. *Cell Tissue Res*, 2002, 310(3): 339-348.
- [8] Mau M, Oksbjerg N, Rehfeldt C. Establishment and conditions for growth and differentiation of a myoblast cell line derived from the semimembranosus muscle of newborn piglets [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2008, 44(1/2): 1-5.
- [9] 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.
Li F H, Hou L L, Ma Y H, et al. Isolation, culture, identification and muscle differentiation of skeletal muscle satellite cells in Beijing fatty chicken [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43(22): 4725-4731. (in Chinese)
- [10] 徐 青, 徐 敏, 张加吉, 等. 壁虎骨骼肌卫星细胞的原代培养与鉴定 [J]. *交通医学*, 2011, 25(2): 110-117.
Xu Q, Xu M, Zhang J J, et al. Primary cultivation and identification of satellite cells of *Gekko japonicus* skeletal muscles [J]. *Med J of Communications*, 2011, 25(2): 110-117. (in Chinese)
- [11] 焦泽华, 魏著英, 白春玲, 等. 大鼠肌肉卫星细胞的分离、鉴定与诱导分化 [J]. *农业生物技术学报*, 2011, 19(2): 302-307.
Jiao Z H, Wei Z Y, Bai C L, et al. Isolation, identification and differentiation of rat muscle satellite cell [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2011, 19(2): 302-307. (in Chinese)
- [12] Kamanga-Sollo E, White M E, Chung K Y, et al. Potential role of G-protein-coupled receptor 30 (GPR30) in estradiol-17 beta-stimulated IGF-I mRNA expression in bovine satellite cell cultures [J]. *Domestic Animal Endocrinology*, 2008, 35(3): 254-262.
- [13] Kamanga-Sollo E, White M E, Hathaway M R, et al. Roles of IGF-I and the estrogen, androgen and IGF-I receptors in estradiol-17 beta and trenbolone acetate-stimulated proliferation of cultured bovine satellite cells [J]. *Domestic Animal Endocrinology*, 2008, 35(1): 88-97.
- [14] Kamanga-Sollo E, White M E, Hathaway M R, et al. Effect of estradiol-17 beta on protein synthesis and degradation rates in fused bovine satellite cell cultures [J]. *Domest Anim Endocrinol*, 2010, 39(1): 54-62.
- [15] 危小焰, 史仍飞, 张 平. 幼龄大鼠骨骼肌卫星细胞原代培养的实验研究 [J]. *中国运动医学杂志*, 2007, 26(3): 318-320.
Wei X Y, Shi R F, Zhang P. Primary culture of skeletal satellite cells of infant rat [J]. *Chin J Sports Med*, 2007, 26(3): 318-320. (in Chinese)
- [16] 史仍飞, 危小焰, 卞玉华. 机械牵拉刺激对大鼠骨骼肌卫星细胞增殖的影响 [J]. *体育科学*, 2007, 27(5): 74-76.
Shi R F, Wei X Y, Bian Y H. Mechanical strain inducing proliferation of rat skeletal muscle satellite cells *in vitro* [J]. *China Sport Science*, 2007, 27(5): 74-76. (in Chinese)
- [17] 张玉石, 李汉忠, 张锐强, 等. 应用 Percoll 分离纯化组织工程用肌卫星细胞 [J]. *中国医学科学院学报*, 2006, 28(2): 182-185.
Zhang Y S, Li H Z, Zhang R Q, et al. Separation and purification of skeletal muscle satellite cells for tissue engineering applications by percoll [J]. *Acta Academiae Medicinae Sinicae*, 2006, 28(2): 182-185. (in Chinese)
- [18] Burton N M, Vierck J, Krabbenhoft L, et al. Methods for animal satellite cell culture under a variety of conditions [J]. *Methods Cell Sci*, 2000, 22(1): 51-61.
- [19] 罗桂芬, 文旭辉, 杨公社. 猪肌卫星细胞的分离培养及鉴定 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2006, 22(6): 823-825.
Luo G F, Wen X H, Yang G S. Isolation and identification of porcine muscle satellite cells [J]. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2006, 22(6): 823-825. (in Chinese)
- [20] 文旭辉. 猪 PGC-1 α 、线粒体相关基因组织表达及 Leptin 对 PGC-1 α 、UCPs mRNA 表达的影响 [D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2007.
Wen X H. Tissue distribution of PGC-1 α , mitochondrial-related gene in pig and effects of Leptin on the expression of PGC-1 α and UCPs mRNA [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University, 2007. (in Chinese)
- [21] Webster C, Pavlath G K, Parks D R, et al. Isolation of human myoblasts with the fluorescence-activated cell sorter [J]. *Exp Cell Res*, 1988, 174(1): 252-265.