

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

李方华^{1,2}, 侯玲玲³, 马月辉², 庞全海¹, 关伟军²

(¹山西农业大学动物科技学院, 山西太谷 030801; ²中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193; ³北京交通大学生命科学与生物工程研究院, 北京 100044)

摘要: 【目的】探讨体外培养条件下北京油鸡骨骼肌卫星细胞分离、培养及鉴定的方法, 建立适于北京油鸡骨骼肌卫星细胞体外扩增的培养体系, 为今后进一步研究北京油鸡骨骼肌卫星细胞提供技术平台。【方法】以 15 日龄的鸡胚胸肌为材料, 采用联合酶消化法分离骨骼肌卫星细胞, 差速贴壁法纯化细胞, 使用 Pax7、Desmin、Myod 等骨骼肌卫星细胞的特异性标志对所得细胞进行免疫荧光鉴定, 随后进行成肌诱导分化, 并比较了 3 种培养体系对骨骼肌卫星细胞增殖的影响。【结果】细胞免疫荧光鉴定结果呈阳性, 证实所培养的细胞为北京油鸡骨骼肌卫星细胞; 成肌诱导后, 细胞相互融合形成多核的肌管, 成肌特异性标志 MHC 表达呈阳性; 对不同扩增培养体系比较, 结果表明, 培养体系 DMEM/F12+15%FBS+2.5ng·mL⁻¹bFG 最有利于北京油鸡骨骼肌卫星细胞的增殖。【结论】该试验成功地分离并鉴定了北京油鸡骨骼肌卫星细胞, 建立了适于北京油鸡骨骼肌卫星细胞体外扩增的培养体系, 同时成功地进行了成肌诱导分化, 为今后研究北京油鸡骨骼肌生长和发育的机理提供了技术平台。

关键词: 北京油鸡; 骨骼肌卫星细胞; 鉴定; 诱导分化

Isolation, Culture, Identification and Muscle Differentiation of Skeletal Muscle Satellite Cells in Beijing Fatty Chicken

LI Fang-hua^{1,2}, HOU Ling-ling³, MA Yue-hui², PANG Quan-hai¹, GUAN Wei-jun²

(¹College of Animal Science and Technology, Shanxi Agriculture University, Taigu 030801, Shanxi; ²Institute of Beijing Animal Science and Veterinary, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193; ³Institute of Biological Science and Technology, College of Science, Beijing Jiaotong University, Beijing 100044)

Abstract: 【Objective】 This research was aimed to explore a protocol of isolation, culture and identification of skeletal satellite cells, and to establish an optimal *in vitro* amplification system for Beijing Fatty chicken skeletal muscle satellite cells, thereby laying a technical foundation for future pertinent researches. 【Method】 Pectoral muscles were isolated from 15-day-old chicken embryos, disassociated with collagenase and trypsin and purified via differential adhesion. Satellite cells were detected for the expression of Pax7, Myod and Desmin and induced to muscle. Proliferative capacities in three different culture systems were compared as well. 【Result】 The cultured cells expressed Pax7 and MyoD in nucleus and desmin in cytoplasm, demonstrating that they were indeed Beijing Fatty chicken skeletal muscle satellite cells. Satellite cells underwent muscle differentiation and formed multinucleated myotubes. Muscle differentiation markers MHC in cytoplasm were detected in these cells. And it represented an optimal system for Beijing Fatty chicken skeletal muscle satellite cells to be cultured in media containing DMEM/F12+15%FBS+2.5ng·mL⁻¹ basic fibroblast growth factor (bFGF). 【Conclusion】 The present study successfully isolated and identified the skeletal muscle satellite cells in Beijing Fatty chicken and established their optimal *in vitro* culture system. Satellite cells were

收稿日期: 2010-03-14; 接受日期: 2010-06-28

基金项目: 国家科技支撑项目 (2006BAD13B08、2008BADB2B01)、国家“863”计划项目 (2006AA10Z198、2007AA10Z170)、转基因生物新品种培育科技重大专项 (2008ZX08009-003)

作者简介: 李方华, 硕士。Tel: 137168-5410; E-mail: 254711802@qq.com。通信作者庞全海, 教授, 博士。E-mail: pangquanhai@126.com。并列通信作者关伟军, 教授, 博士。Tel: 010-62815992; E-mail: wjguan86@iascaas.net.cn

also successfully induced to differentiate into muscle, and, accordingly, provided a theoretical and technical basis for studying the mechanism of skeletal muscle growth and development in future.

Key words: Beijing Fatty chicken; skeletal muscle satellite cells; identification; induction differentiation

0 引言

【研究意义】骨骼肌卫星细胞 (skeletal muscle satellite cell) 是位于肌细胞膜和基膜之间的具有增殖和分化潜力的生肌干细胞, 这些细胞对于出生后骨骼肌的生长和再生具有重要的意义。北京油鸡是北京地区特有的肉蛋兼用型地方品种, 距今已有 300 余年, 该品种油鸡具有特殊的外貌(即凤头、毛腿和胡子嘴)、肉质细嫩、肉味鲜美、蛋品质优良、生活力强和遗传性稳定等特性。本试验以北京油鸡骨骼肌卫星细胞为研究对象, 通过建立适于北京油鸡骨骼肌卫星细胞体外扩增的培养体系和体外诱导体系, 为今后系统的研究北京油鸡骨骼肌生长和发育机制奠定基础, 同时探讨以干细胞形式对其进行遗传资源保存的可能性。

【前人研究进展】1961 年, Mauro^[1]首次从青蛙的骨骼肌纤维中发现并分离获得青蛙的骨骼肌卫星细胞。近年来, 利用骨骼肌卫星细胞进行骨骼肌的形成和发育机制的研究已成为热点。在成体的骨骼肌中, 卫星细胞主要以静止的、未分化的单核小圆球形分布于成熟的肌纤维外周。当骨骼肌受到负重和外伤等外界刺激后, 卫星细胞被迅速激活, 激活后的卫星细胞表达生肌调节因子 Myf5、MyoD、Myogenin 和 MRF4, 经历一系列复杂的生肌过程, 最后使骨骼肌的结构和功能重新得到恢复^[2-3]。转录因子 Pax3 和 Pax7 是对骨骼肌卫星细胞的功能产生影响的两个非常重要的蛋白质, 同时它们也是骨骼肌卫星细胞的特异性标记。Pax3 和 Pax7 通过其蛋白结构中的组蛋白甲基转移酶复合物, 一方面扩大被激活的卫星细胞的区域, 另一方面诱导生肌抑制因子 Id2 和 Id3 的表达, 从而使卫星细胞处于未分化的状态^[4-6]。而两者在细胞中的表达却不同, Pax7 在所有的骨骼肌卫星细胞中都表达^[7-8], 而 Pax3 只在部分骨骼肌卫星细胞中表达^[7], 造成这种情况的原因仍需要进一步研究。生肌调节因子 MyoD 同样非常重要, 骨骼肌卫星细胞被激活时, 几乎所有的骨骼肌卫星细胞 (98%—100%), 根据肌肉的类型而有所不同)都表达 MyoD^[9]。【本研究切入点】近年来, 干细胞研究成为研究的热点, 家畜、家禽干细胞的研究主要集中于牛、羊等, 有关鸡骨骼肌卫星细胞的研究较少。【拟解决的关键问题】本文以北京油鸡

骨骼肌卫星细胞为研究对象, 对骨骼肌卫星细胞进行了分离、培养、鉴定和向成肌细胞诱导分化的研究, 同时探讨建立适于北京油鸡骨骼肌卫星细胞体外扩增的培养体系, 为今后研究北京油鸡骨骼肌生长和发育的机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验动物

北京油鸡由中国农业科学院家禽育种中心提供。

1.2 主要试剂

I 型胶原酶、胰蛋白酶、DMSO、L-多聚赖氨酸均购自美国 Sigma 公司。DMEM 培养基、DMEM/F12 培养基、McCoy'5A 培养基、胎牛血清 FBS (Fetal Bovine Serum)、鸡血清 CS (Chicken serum) 和马血清 HS (Horse serum) 均为美国 Invitrogen 公司产品。碱性成纤维细胞生长因子 bFGF (basic fibroblast growth factor) 为英国 Peprotech 公司产品。

1.3 骨骼肌卫星细胞的分离、培养

参照 Rando 等^[10]的方法, 15 日龄的鸡胚常规消毒后, 取其胸部肌肉, 用含双抗的 PBS (pH 为 7.4) 洗涤 3 次, 剔除血管、脂肪、结缔组织, 用眼科剪刀剪至肉糜状, 先加入 0.1% 的胶原酶 I 37℃ 消化 30 min, 再加入 0.25% 胰酶 37℃ 消化 1 h, 然后加入含 20% FBS 的 DMEM 培养基终止消化, 依次过 100 目和 300 目的细胞筛, 滤液 1 000 r/min 离心 8 min, 弃上清, 用含 15% FBS 的 DMEM/F12 培养液重悬细胞, 将细胞悬液加入培养瓶中, 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 2h 后, 吸取细胞悬液至 24 孔板中, 于 37℃、5% CO₂ 培养箱中继续培养^[11]。

1.4 骨骼肌卫星细胞的传代、冻存与复苏

当细胞长至 80% 时, 弃去培养液, PBS 清洗 3 次, 加入 0.125% 胰酶 (含 0.01% EDTA) 吹打消化细胞, 显微镜下观察细胞开始变圆时, 用含有血清的培养基终止消化, 吹打细胞使其完全脱落, 以 1 : 2 的比例进行传代。细胞冻存与复苏参照 Jenkins^[12]的做法, 取传至第 5 代的细胞, 胰酶消化法收集细胞, 离心弃上清, 用细胞冻存液 (50% 的 FBS+10% DMSO+40% DMEM) 重悬细胞, -80℃ 冰箱过夜, 次日投入液氮罐中长期保存。细胞复苏时将冻存管从液氮中取出, 迅速投入 42

℃水浴锅中,不停摇动冻存管使受热融化,离心弃上清,加入细胞培养液重悬细胞,移至 24 孔培养板 37.5℃、5%CO₂ 的培养箱中继续培养。

1.5 骨骼肌卫星细胞生长曲线的测定

取第 3 代的骨骼肌卫星细胞,0.125%的胰酶消化后,以 1×10^5 个/孔接种于 24 孔培养板。每天取 3 孔消化后,进行细胞计数,持续 8 d。根据计数结果绘制细胞生长曲线。

1.6 骨骼肌卫星细胞的鉴定

参照 Abcam 免疫荧光的步骤,取第 3 代的细胞,经爬片、固定、通透、封闭处理后加入 1% BSA 稀释的一抗 Pax7(鼠抗鸡,1:50, Santa Cruz Technology)、MyoD(鼠抗鸡,1:60, Abcam)、Desmin(鼠抗鸡,1:20, Abcam) 4℃孵育过夜, PBS 冲洗细胞 3 次,每次 5 min; 加入 FITC 标记的羊抗鼠二抗(1:100, 中山金桥)暗室中室温孵育 1 h, PBS 洗 3 次; 最后加入 $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 DAPI 或 PI 孵育细胞 1 min, PBS 冲洗,激光共聚焦显微镜(Nikon TE-2000-E Japan)下拍照。

1.7 骨骼肌卫星细胞的成肌诱导分化

取传至第 3 代的卫星细胞,当细胞生长至 80%时,将培养液更换为成肌诱导液 DMEM+5%HS,连续培养至第 10 天,观察细胞的形态,免疫荧光鉴定成肌分化的特异性标志 MHC(鼠抗鸡,1:80, DSHB)的表达^[13]。

1.8 三种培养体系对骨骼肌卫星细胞生长和增殖的影响

为了建立适于北京油鸡骨骼肌卫星细胞体外扩增培养体系,对刚刚分离获得的细胞以 5×10^4 个/孔的细胞密度接种于 24 孔板,每空 1.0 mL,分成 3 个组,每组 24 孔,分别采用以下的培养体系进行培养: DMEM/F12+15%FBS+2.5 ng·mL⁻¹ bFGF、DMEM+15%FBS+2.5 ng·mL⁻¹ bFGF、McCoy'5A+15%CS+2.5 ng·mL⁻¹ bFGF。每天每组取 3 个孔细胞胰酶消化细胞计数,绘制细胞生长曲线,分析不同培养体系对北京油鸡骨骼肌卫星细胞生长和增殖的影响。

2 结果

2.1 骨骼肌卫星细胞的形态

倒置显微镜下观察到刚刚分离的骨骼肌卫星细胞为圆形,折光性强(图 1-A 箭头所指),24 h 后开始贴壁,贴壁后绝大多数细胞为梭形或纺锤形,且有两极、体积小、胞核折光性强(图 1-B)。贴壁后的细

胞增殖过程中,随细胞密度的增加,细胞呈有规律地平行排列(图 1-C)。传代细胞 1 h 后开始贴壁,24 h 后贴壁完全(图 1-D、E、F)。采用台盼蓝染色测定冻存前和复苏后的北京油鸡骨骼肌卫星细胞的活率,细胞冻存前和复苏后活率分别为 98%和 97.7%。复苏后的细胞一般 24 h 开始贴壁,冻存前后细胞生长速度、形态无明显差异,表明细胞生长状况良好,培养条件适宜;另外,冷冻对其存活率影响不显著,说明冻存对细胞损伤不明显,可以以此方法保存北京油鸡这种优良的动物遗传资源。冻存前后的细胞形态如图 1-H、图 1-I。

2.2 骨骼肌卫星细胞的生长曲线

细胞生长曲线呈“S”型(图 2),细胞有一段约 3 d 的潜伏期或缓慢生长期,为细胞的适应阶段。此后细胞进入指数生长期,第 7 天细胞数达到最大;然后细胞生长进入平台期,此时由于细胞密度增大,细胞生长受接触抑制的影响,细胞开始衰老凋亡。

2.3 骨骼肌卫星细胞的鉴定

细胞经爬片处理后,采用北京油鸡骨骼肌卫星细胞的特异标记 Pax7、Desmin、MyoD 进行免疫荧光鉴定,共聚焦纤维镜拍照。结果, Pax7、Desmin、MyoD 均呈阳性表达, Desmin 在细胞质中表达, Pax7 和 MyoD 在细胞核内表达,证实所培养的细胞为北京油鸡骨骼肌卫星细胞(图 3)。

2.4 骨骼肌卫星细胞的成肌诱导分化

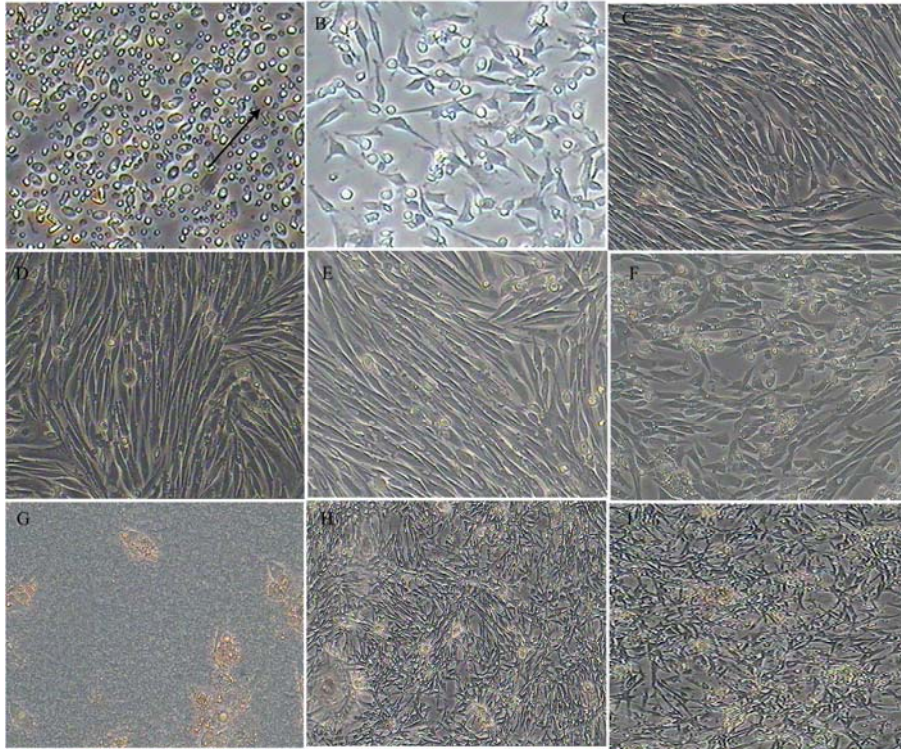
培养至第 10 天,骨骼肌卫星细胞之间相互融合,形成多细胞核的肌管(图 4-A)。免疫荧光鉴定结果为 MHC 在细胞质中呈阳性表达(图 4-B)。

2.5 不同培养体系对北京油鸡骨骼肌卫星细胞生长和增殖的影响

根据每组每天测得的结果,绘制细胞生长曲线(图 5)。各培养体系对细胞贴壁能力的影响不大,都经历了大约 72 h 的潜伏期, DMEM/F12+15%FBS+2.5 ng·mL⁻¹ bFGF 和 McCoy'5A+15%CS+2.5 ng·mL⁻¹ bFGF 的培养体系均有利于鸡骨骼肌卫星细胞的生长,两者差别不明显,均好于 DMEM+15%FBS+2.5 ng·mL⁻¹ bFGF 组。

3 讨论

在骨骼肌卫星细胞的分离方法上,北京油鸡与其它动物相比大致相同,都是采用机械加酶消化法分离骨骼肌,使骨骼肌卫星细胞在肌细胞膜和基膜之间释放出来。不同之处主要在取材部位上,猪、牛、羊等



A: 刚分离的卫星细胞图片, 细胞为圆形, 折光性强; B: 贴壁后的卫星细胞为梭形或纺锤形; C: 随细胞密度的增加, 细胞呈有规律地平行排列; D: 第 2 代卫星细胞形态; E: 第 4 代卫星细胞形态; F: 第 6 代卫星细胞形态; G: 细菌污染图片; H: 冻存前细胞形态; I: 复苏后细胞形态。A-G (100×), H, I (40×)

A: Satellite cells before adhere were round, refract sexual strong; B: Adherent cells were spindle-shaped or fusoid; C: With the increase of the cell density, cells become regularly arranged in parallel; D: The second-generation skeletal muscle satellite cells; E: The fourth-generation skeletal muscle satellite cells; F: The sixth-generation skeletal muscle satellite cells; G: Cells were contaminated by bacterial; H: Chicken skeletal muscle satellite cells before freezing; I: Chicken skeletal muscle satellite cells after recovery. A-G (100×); H, I (40×)

图 1 培养的北京油鸡骨骼肌卫星细胞的形态

Fig. 1 Morphology of cultured skeletal muscle satellite cells

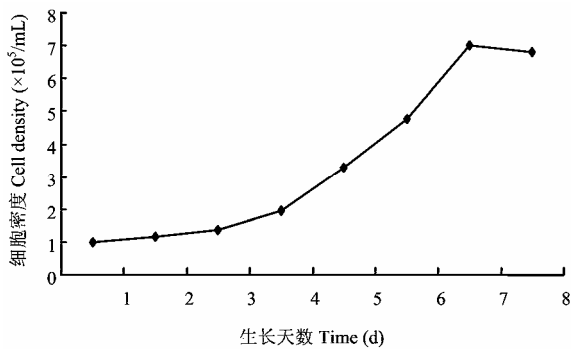


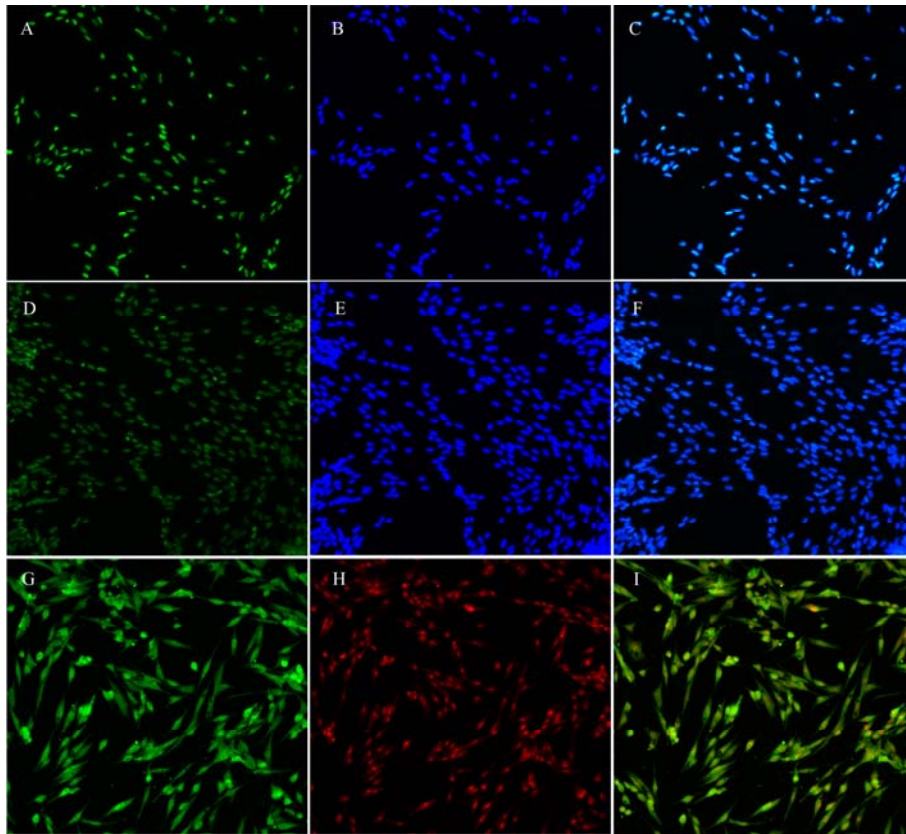
图 2 北京油鸡骨骼肌卫星细胞的生长曲线

Fig. 2 Cell growth curve of skeletal muscle satellite cells

一般取新生动物的四肢骨骼肌, 分离获得骨骼肌卫星细胞。而对北京油鸡等家禽而言, 则可取发育到一定

日龄的胚胎, 分离胸部肌肉获得骨骼肌卫星细胞。这样做的目的在于: (1) 在无菌操作上具有优势, 可以减少取材时污染的可能性; (2) 与腿部肌肉相比, 家禽的胸肌较为发达, 而且胸肌中含有的血管较少, 可以减少血细胞的污染^[14]。

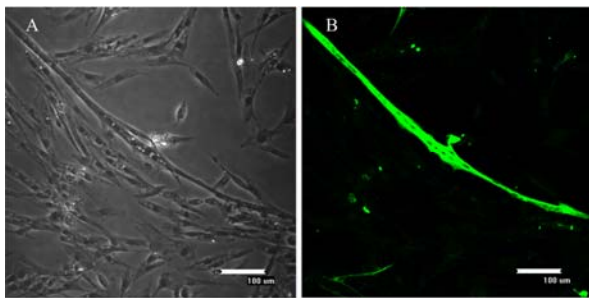
采用联合酶消化法时控制胰酶消化的时间很关键, 消化时间过长会损伤卫星细胞, 消化时间过短又会降低细胞的产出率, 而且不同年龄、不同动物肌细胞基膜的成分和比例不同, 胰酶消化的最佳时间也不同, 本试验经过摸索, 最后确定 37℃消化 1h 为最佳消化时间。相比其它动物骨骼肌卫星细胞, 北京油鸡骨骼肌卫星细胞对胰酶的抵抗力较弱, 传代后细胞的活力较差, 所以本试验降低了胰酶和 EDTA 的浓度, 使用 0.125%胰酶 (含 0.01%EDTA) 对细胞进行传代, 同时减少消化时间, 使传代后细胞的活力有了较大提



A: Pax7 在细胞核中呈阳性表达; B: 应用 DAPI 对细胞核进行染色; C: A 与 B 叠加图片; D: MyoD 在细胞核中呈阳性表达; E: 应用 DAPI 对细胞核进行染色; F: D 与 E 叠加图片; G: Desmin 在细胞质中呈阳性表达; H: 应用 PI 对细胞核进行染色; I: G 与 H 叠加图片。A-I (100×)
 A: Skeletal muscle satellite cells expressed Pax7 in nucleus; B: Using DAPI to stain the nuclei of skeletal muscle satellite cells; C: The merge of A and B; D: Skeletal muscle satellite cells expressed MyoD in nucleus; E: Using DAPI to stain the nuclei of skeletal muscle satellite cells; F: The merge of D and E; G: Skeletal muscle satellite cells expressed Desmin in cytoplasm; H: Using PI to stain the nuclei of chicken skeletal muscle satellite cells; I: The merge of G and H. A-I (100×)

图 3 北京油鸡骨骼肌卫星细胞的鉴定

Fig. 3 Identification of skeletal muscle satellite cells in Beijing Fatty chicken



A: 第 10 天, 细胞之间发生相互的融合, 形成多细胞核的肌管; B: MHC 在细胞质中呈阳性表达。A、B (200×)
 A: Skeletal muscle satellite cells initiated terminal differentiation to form multinucleated myotubes; B: MHC expressed in differentiating cells. A, B (200×)

图 4 北京油鸡骨骼肌卫星细胞的成肌诱导分化

Fig. 4 Skeletal muscle satellite cells differentiate into myogenic cells

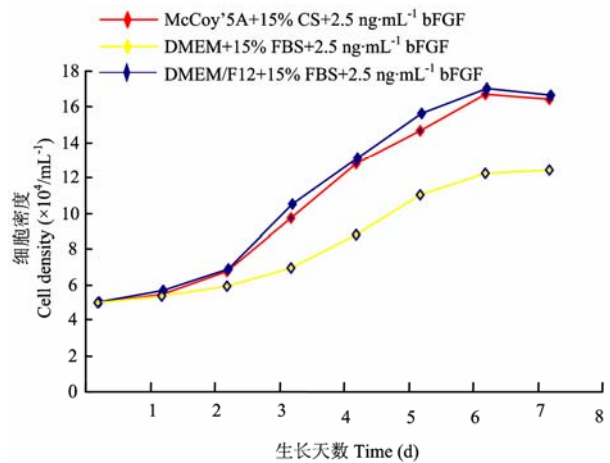


图 5 不同培养体系下北京油鸡骨骼肌卫星细胞的生长曲线

Fig. 5 Cell growth curve of skeletal muscle satellite cells cultured in different culture systems

高。刚分离的细胞中主要的杂细胞包括红细胞和成纤维细胞,红细胞不贴壁可随换液而去除。由于成纤维细胞的贴壁能力强于骨骼肌卫星细胞,两个小时内就能完全贴壁,但此期间骨骼肌卫星细胞仍不贴壁,固本试验采用了差速贴壁法去除混杂的成纤维细胞,得到了较纯的骨骼肌卫星细胞,经鉴定纯度在 90% 以上^[15]。

用于鉴定静息期骨骼肌卫星细胞的特异性标志包括 MNF^[16]、c-Met、Pax7^[17-18]、M-cadherin^[17],增殖期的特异性标志则包括 Myf5、MyoD^[19]和 Desmin^[20]。本试验选用了静息期的特异性标志 Pax7 和增殖期的特异性标志 MyoD 和 Desmin 这 3 个特异性的细胞标志对所培养的细胞进行鉴定,结果 Pax7、Desmin、MyoD 均呈阳性表达,证实所培养的细胞的确为北京油鸡骨骼肌卫星细胞。

骨骼肌卫星细胞的分化过程为:首先分化为成肌细胞,随后成肌细胞逐渐平行排列,相互融合在一起,形成细胞核在中央、肌丝在周边的肌管;随着分化过程的深入,肌丝不断生长并形成肌原纤维,细胞核则逐渐靠向周边,从而形成肌纤维。本试验以 DMEM+5%HS 作为成肌诱导液,培养至第 10 天,细胞间发生相互融合,形成大量的肌管,而肌管形成是骨骼肌卫星细胞分化的标志。作为鉴定骨骼肌卫星细胞分化重要标志^[13],MHC 的表达也证实骨骼肌卫星细胞向肌细胞的分化。

不同动物的骨骼肌卫星细胞所需的培养体系不同,DMEM+15%HS 适于大鼠、羊、牛的骨骼肌卫星细胞的培养^[21],Ham's F-10+20%FBS+2.5ng·mL⁻¹ bFGF 适于小鼠^[10]骨骼肌卫星的培养,McCoy'5A+15%CS+2.5 ng·mL⁻¹ bFGF 的培养体系适于鸡骨骼肌卫星细胞的培养^[21]。本试验设计了 3 组培养体系对分离的骨骼肌卫星细胞进行培养,结果 DMEM/F12+15%FBS+2.5 ng·mL⁻¹ bFGF 组和 McCoy'5A+15%CS+2.5 ng·mL⁻¹ bFGF 组差别不明显,由于 McCoy'5A 培养基价格比较昂贵,所以最后选用 DMEM/F12+15%FBS+2.5ng·mL⁻¹ bFGF 作为北京油鸡骨骼肌卫星细胞的培养体系。

目前畜禽遗传资源常规保存方式主要有活体保存、精液和胚胎保存、基因组文库、cDNA 文库保存等。但由于受生命科学理论、方法和技术等发展瓶颈的制约,仍存在一些弊端。随着体细胞克隆技术的发展和成熟,动物体细胞作为保存动物遗传资源的一种补充,日渐受到人们的重视^[22]。本试验探讨了以骨骼

肌卫星细胞形式对北京油鸡这一重要的遗传资源保存的可行性,结果冻存前后细胞生长状况良好,证明了干细胞作为遗传资源保存的可行性,为今后基因组学和后基因组学及胚胎工程等生命科学研究提供宝贵试验材料。

4 结 论

本试验成功地分离了北京油鸡骨骼肌卫星细胞并对其进行了鉴定,对细胞进行了成肌诱导分化的研究,探索了以骨骼肌卫星细胞形式进行遗传资源保存,同时建立了适于北京油鸡骨骼肌卫星细胞体外扩增的培养体系,为今后对北京油鸡骨骼肌生长和发育机理进行系统的研究提供了技术平台。

References

- [1] Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 1961, 9: 493-495.
- [2] Zammit P S. All muscle satellite cells are equal, but are some more equal than others? *Journal of Cell Science*, 2008, 121: 2975-2982.
- [3] Parker M H, Seale P, Rudnicki M A. Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis. *Nature Reviews Genetics*, 2003, 4: 497-507.
- [4] McKinnell I W, Ishibashi J, Grand F L, Punch V G J, Addicks G C, Greenblatt J F, Dilworth F J, Rudnicki M A. Pax7 activates myogenic genes by recruitment of a histone methyltransferase complex. *Nature Cell Biology*, 2008, 10(1): 77-84.
- [5] Collins C A, Gnocchi V F, White R B, Boldrin L, Perez-Ruiz A, Relaix F, Morgan J E, Zammit P S. Integrated functions of Pax3 and Pax7 in the regulation of proliferation, cell size and myogenic differentiation. *Public Library of Science One*, 2009, 4(2): e4475.
- [6] Kumar D, Shadrach J L, Wagers A J, Lassar A B. Id3 is a direct transcriptional target of Pax7 in quiescent satellite cells. *Molecular Biology of the Cell*, 2009, 20: 3170-3177.
- [7] Relaix F, Montarras D, Zaffran S, Gayraud-Morel B, Rocancourt D, Tajbakhsh S, Mansouri A, Cumano A, Buckingham M. Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. *The Journal of Cell Biology*, 2006, 172(1): 91-102.
- [8] Kuang S H, Chargé S B, Seale P, Huh M, Rudnicki M A. Distinct roles for Pax7 and Pax3 in adult regenerative *The Journal of Cell Biology*, 2006, 172(1): 103-113.
- [9] Kanisicak O, Mendez J J, Yamamoto S, Yamamoto M, Goldhamer D J. Progenitors of skeletal muscle satellite cells express the muscle determination gene, MyoD. *Developmental Biology*, 2009, 332:

- 131-141.
- [10] Rando T A, Blau H M. Primary mouse myoblast purification, characterization, and transplantation for cell-mediated gene therapy. *The Journal of Cell Biology*, 1994, 125(6): 1275-1287.
- [11] Velleman S G, Liu X S, Nestor K E, McFarland D C. Heterogeneity in growth and differentiation characteristics in male and female satellite cells isolated from turkey lines with different growth rates. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2000, 125: 503-509.
- [12] Jenkins N. *Animal Cell Biotechnology: Methods and Protocols*. New Jersey: Humana Press, 1999: 132-138.
- [13] Asakuran A, Komaki M, Rudnicki M A. Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic and adipogenic differentiation. *Differentiation*, 2001, 68: 245-253.
- [14] Zeng C, Pesall J E, Gilkerson K K, McFarland D C. The effect of hepatocyte growth factor on turkey satellite cell proliferation and differentiation. *Poultry Science*, 2002, 81: 1191-1198.
- [15] Johnson D D, Wilcox R, Wenger B. Precocious *in vitro* development of satellite cells from dystrophic chicken muscle. *In Vitro*, 1983, 19(9): 723-729.
- [16] Garry D J, Meeson A, Elterman J, Zhao Y H, Yang P, Bassel-Duby R, Williams R S. Myogenic stem cell function is impaired in mice lacking the forkhead/winged helix protein MNF. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, 97(10): 5416-5421.
- [17] Seale P, Sabourin L A, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P, Rudnicki M A. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell*, 2000, 102: 777-786.
- [18] Shefer G, van de Mark D P, Richardson J B, Yablonka-Reuveni Z. Satellite-cell pool size does matter: defining the myogenic potency of aging skeletal muscle. *Development Biology*, 2006, 294: 50-66.
- [19] Irintchev A, Zeschnigk M, Starzinski-Powitz A, Wernig A. Expression pattern of M-cadherin in normal, denervated, and regenerating mouse muscles. *Developmental Dynamics*, 1994, 199: 326-337.
- [20] Kablar B, Krastel K, Ying C Y, Tapscott S J, Goldhamer D J, Rudnicki M A. Myogenic determination occur independently in somites and limb buds. *Developmental Biology*, 1999, 206: 219-231.
- [21] Mcfarland D C. Cell culture as a tool for the study of poultry skeletal muscle development. *The Journal of Nutrition*, 1992, 122: 818-829.
- [22] 吴常信. 动物遗传资源的理论与技术—21 世纪动物农业可持续发展的种质基础. 云南农业大学学报, 1999, 21: 7-10.
- Wu C X. Theory and technology of preservation in domestic animal genetic resources--sustainably developmental genetic resources of 21 century animal husbandry. *Journal of Yunnan University*, 1999, 21: 7-10. (in Chinese)

(责任编辑 周晓艳)