

林正浩, 王讯, 李晓开, 等. 鸽骨骼肌卫星细胞的分离、培养及成肌特性[J]. 华南农业大学学报, 2019, 40(1): 53-58.
LIN Zhenghao, WANG Xun, LI Xiaokai, et al. Isolation, identification and biological characteristics of skeletal muscle satellite cells in pigeons[J]. Journal of South China Agricultural University, 2019, 40(1): 53-58.

鸽骨骼肌卫星细胞的分离、培养及成肌特性

林正浩, 王 讯, 李晓开, 罗 毅

(四川农业大学 动物科技学院 畜禽遗传资源发掘与创新利用

四川省重点实验室, 四川 成都 611130)

摘要:【目的】探讨白羽王鸽 *Columba livia* 骨骼肌卫星细胞的分离、培养和鉴定的方法, 建立完整的家鸽骨骼肌卫星细胞的培养体系。【方法】选择孵化 16 d 的鸽胚作为试验材料, 采用组织块贴壁法和胶原酶消化法分离胸肌的骨骼肌卫星细胞并绘制其生长曲线。待卫星细胞分化出肌管后, 采用免疫荧光法检测肌球蛋白重链 (MyHC) 的表达; 在细胞分化出肌管前、后分别提取总 RNA, 采用 RT-qPCR 方法检测 *Desmin*、*Pax7*、*MyoG* 和 *MyoD1* 基因在细胞分化出肌管前、后的相对表达量。【结果】组织块贴壁法和胶原酶法均能成功地分离出骨骼肌卫星细胞, 其生长曲线呈“S”型; 该细胞经含体积分数为 20%FBS 的 DMEM 高糖培养液培养 7 d 后视野中出现大量明显可见的肌管, 成肌特异性标志 MyHC 表达呈阳性。RT-qPCR 结果表明, *Desmin* 和 *MyoG* 基因分化后的相对表达量分别是分化前的 5.68 和 10.38 倍, 而 *Pax7* 和 *MyoD1* 基因分化前的相对表达量分别是分化后的 7.01 和 5.51 倍。【结论】建立了鸽骨骼肌卫星细胞的培养体系, 为今后进行家鸽肌肉发育的研究提供细胞模型。

关键词: 鸽; 骨骼肌; 卫星细胞; 肌管; 细胞增殖; 细胞分化

中图分类号: S836

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2019)01-0053-06

Isolation, identification and biological characteristics of skeletal muscle satellite cells in pigeons

LIN Zhenghao, WANG Xun, LI Xiaokai, LUO Yi

(College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University/

Farm Animal Genetic Resources Exploration and Innovation Key Laboratory of

Sichuan Province, Chengdu 611130, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the method of isolation, culture and identification of white king pigeon (*Columba livia*) skeletal muscle satellite cells, and establish a complete culture system of pigeon skeletal muscle satellite cells. 【Method】 We selected 16-day pigeon embryos as experimental materials. Skeletal muscle satellite cells were isolated from the pectoral muscle by the tissue explants adherent method and collagenase digestion method, and the growth curve was drawn. MyHC expression was detected by immunofluorescence assay after differentiation of the satellite cells into myotubes. We detected mRNA expression of *Desmin*, *Pax7*, *MyoG* and *MyoD1* genes before and after cell differentiation into myotubes using RT-qPCR. 【Result】 Skeletal muscle satellite cells were successfully isolated by the tissue explants adherent method and collagenase method, and cell growth appeared in S-shaped curve. After seven days of culture in high glucose DMEM containing 20% fetal bovine serum (FBS), a large number of visible myotubes were observed,

收稿日期: 2018-05-19 网络首发时间: 2018-12-28 14:38:00

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20181227.1104.012.html>

作者简介: 林正浩 (1995—), 男, 硕士研究生, E-mail: m18227585975@163.com; 通信作者: 王 讯 (1979—), 男, 副教授, 博士,

E-mail: xunwang@sicau.edu.cn

基金项目: 四川省科技厅应用基础计划 (2016JY0167); 四川省青年科技创新研究团队项目 (2015TD0012)

and the myogenic differentiation marker MyHC was expressed in differentiated cells. RT-qPCR results showed that the relative expressions of *Desmin* and *MyoG* genes in differentiated myotube cells were 5.68 and 10.38 times of those in skeletal muscle satellite cells before differentiation, while the relative expressions of *Pax7* and *MyoD1* genes in skeletal muscle satellite cells before differentiation were 7.01 and 5.51 times of those in differentiated myotube cells, respectively. 【Conclusion】 The culture method of pigeon skeletal muscle satellite cells has been established, which provides a cell model for future studies of muscle development in pigeons.

Key words: pigeon; skeletal muscle; satellite cell; myotube; cell proliferation; cell differentiation

鸽 *Columba livia* 作为人类较早驯化的鸟类之一,在世界各地被广泛饲养。近年来,随着我国养鸽业的发展,鸽在我国已经成为继鸡、鸭、鹅之后第 4 大家禽^[1]。截止到 2013 年底,我国年出栏乳鸽已经达到 5 亿多只,存栏种鸽约 4 000 万对^[2]。除肉用外,鸽还具有观赏、竞翔以及用于建立疾病模型^[3]、环境监测^[4]以及运动生理动物模型等用途^[5]。

骨骼肌卫星细胞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,对于出生后骨骼肌的生长、再生修复和维持具有重要意义。1961 年, Mauro^[6]首次发现并分离出骨骼肌卫星细胞。骨骼肌卫星细胞在成年动物体内一般为静息状态,而在动物发育过程中肌肉组织生长以及受到运动创伤时骨骼肌卫星细胞则呈现激活状态;此时,骨骼肌卫星细胞两极形成细胞质突起,有丝分裂活动增强,质核比率升高和细胞内细胞器增多^[7]。活化后,卫星细胞的分裂遵循干细胞的分裂模式,其中一类将作为细胞分裂源而保持原来的状态,而另一类则会进一步分化成为成熟的肌纤维。

目前已经有大量研究报道了人^[8]、鼠^[9]、牛^[10]、羊^[11]、鸡^[12]、鸭^[13]等物种的骨骼肌卫星细胞的分离和培养。而鸽骨骼肌卫星细胞的分离培养鲜见报道。与此同时,鸽肌肉发育机制的研究对于肉鸽及赛鸽的品种选育具有重要的指导意义。因此,本研究拟分离培养白羽王鸽骨骼肌卫星细胞,以期为今后研究鸽骨骼肌生长和发育调控机制提供细胞研究平台。

1 材料与方 法

1.1 材料和试剂

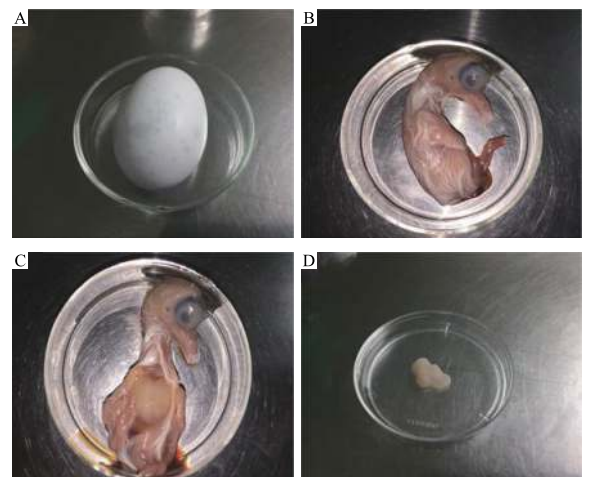
试验材料:16 日龄白羽王鸽鸽胚,由四川省成都市大邑长青鸽舍提供。

主要试剂:DMEM 高糖培养基购自 Hyclone 公司;胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS) 购自 Natocor 公司;青霉素、链霉素购自索莱宝公司;胶原蛋白酶 IV 型购自 Sigma 公司;CCK-8 试剂盒购自碧云天

生物技术研究所;RT-qPCR 试剂盒及试剂购自 TaKaRa 公司;MyHC 抗体 (小鼠单克隆抗体)、FITC 标记的山羊抗小鼠二抗购自 Abcam 公司;其他试剂均购自成都万科实业有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 组织块贴壁法分离骨骼肌卫星细胞 取孵化 16 d 的鸽蛋 (图 1A),用体积分数为 75% 的乙醇溶液消毒后放置于无菌台上,取出鸽胚 (图 1B),轻轻撕开胸部皮肤 (图 1C),用手术刀分离鸽胚双侧胸肌 (图 1D),剪至 1 mm³ 大小。倾斜细胞瓶,将组织块均匀贴入细胞瓶中,并吸出细胞瓶底部多余液体,慢慢翻转培养瓶,使有组织块的一面朝上,放入培养箱。8 h 后,再翻转培养瓶,小心加入 3 mL 含体积分数为 20% FBS 的 DMEM 高糖培养液,继续放入 37 °C、CO₂ 体积分数为 5% 的细胞培养箱培养。每 3 d 换液 1 次,每天在倒置显微镜下观察细胞的生长情况并拍照记录,连续观察 7 d。



A: 16 日龄鸽蛋; B: 鸽胚; C: 胸肌位置; D: 胸肌
A: 16-day pigeon egg; B: Pigeon embryo; C: Position of pectoral muscle; D: Pectoral muscle

图 1 从孵化 16 d 的鸽胚中取出胸肌

Fig. 1 Dissection of pectoral muscle from a pigeon embryo after incubation for 16 days

1.2.2 胶原蛋白酶消化法分离骨骼肌卫星细胞 将鸽胚胸肌分离后剪至苹果泥状,加入 1 mg·mL⁻¹

的 IV 型胶原蛋白酶 3 mL, 放入 37 °C、CO₂ 体积分数为 5% 的细胞培养箱中消化 45~60 min, 每隔 15 min 震荡 1 次, 防止组织块沉积在底部, 消化完成后使用 40 μm 网筛过滤 2 次, 将过滤液 1 500 r·min⁻¹ 离心 5 min, 弃上清液, 加入适量培养基, 吹打混匀后将细胞悬液接种于 25 cm² 培养瓶或 96 孔培养板, 放入 37 °C、CO₂ 体积分数为 5% 的细胞培养箱进行培养, 每 3 d 换液 1 次, 每天在倒置显微镜下观察细胞的生长情况并拍照记录, 连续观察 7 d。

1.2.3 免疫荧光鉴定 从培养箱中取出培养至第 7 天的鸽肌管细胞, 使用体积分数为 4% 的多聚甲醛固定 15 min, PBS 缓冲液冲洗后用体积分数为 0.5% 的 TritonX-100 处理 20 min, 山羊血清封闭 30 min 后以 1:500 的体积比加入一抗 MyHC (Abcam), 并于 4 °C 条件下孵育过夜; 次日用 PBS

缓冲液冲洗后以 1:500 的体积比加入 FITC 标记的山羊抗小鼠二抗 (Abcam), 暗室中孵育 1 h, PBS 缓冲液洗 3 次后, 置于倒置荧光显微镜 (Olympus IX51) 下拍照。

1.2.4 RT-qPCR 使用 Triozl 试剂提取消化法分离培养至第 3 天和第 7 天的细胞总 RNA, 并用 TaKaRa 逆转录试剂盒反转成 cDNA, 根据鸽 *Desmin*、*Pax7*、*MyoG*、*MyoD1*、*β-actin* 基因序列, 使用 NCBI-Primer 设计引物 (表 1), 并由四川擎科生物公司合成。采用 10 μL PCR 反应体系, 含 1 μL cDNA, 1 μL 上下游引物、5 μL SYBR premix Ex Taq II、3 μL DEPC 水。RT-qPCR 反应条件如下: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 进行 40 个循环, 反应结束后进行熔解曲线绘制。*Desmin*、*Pax7*、*MyoG* 和 *MyoD1* 基因的相对表达量使用 2^{-ΔΔCt} 方法进行计算。

表 1 RT-qPCR 引物设计
Table 1 Primers used for RT-qPCR

基因 Gene	引物序列 Primer sequence (5'→3')	NCBI 登录号 NCBI accession number	扩增片段长度/bp Product length
<i>Desmin</i>	F: AAAGACGCATCGAGTCCCTG R: GGCAGCGATGCTCTCATACT	XM_005498606.1	182
<i>Pax7</i>	F: CTCCCACGCTGGAGAAGAAA R: ATGCGTAGCACACGGCTAAT	XM_021295250.1	154
<i>MyoG</i>	F: AAATTTCTGGGCTCCCGTT R: GTCTTGCGCTTGCAAACCTT	XM_021291422.1	174
<i>MyoD1</i>	F: ACACGGAATCACCGAACGAT R: CTTGAGAGGCAATCGAGGCT	XM_021299952.1	70
<i>β-actin</i>	F: GTGGATCAGCAAGCAGGAGT R: TCATCACAAAGGTGTGGGTG	XM_005504502.2	101

1.2.5 骨骼肌卫星细胞生长曲线的绘制 使用胶原酶消化法分离的细胞按每孔 2×10³ 个接种于 96 孔板, 接种时的时间记为 0 d, 每天选取 5 个细胞孔和 3 个空白对照孔加入 20 μL CCK-8 后放置于培养箱培养, 1 h 后取出, 用酶标仪在 450 nm 的波长下测光密度值, 重复测量 3 次, 每隔 24 h 检测 1 次, 连续检测 7 d, 以细胞培养时间为横坐标, 光密度值为纵坐标绘制生长曲线。

1.2.6 统计学分析 所有的数据均以平均值±标准误差表示, 采用 SPSS 13.0 软件分析, 组间比较采用独立样本 *t* 检验。

2 结果与分析

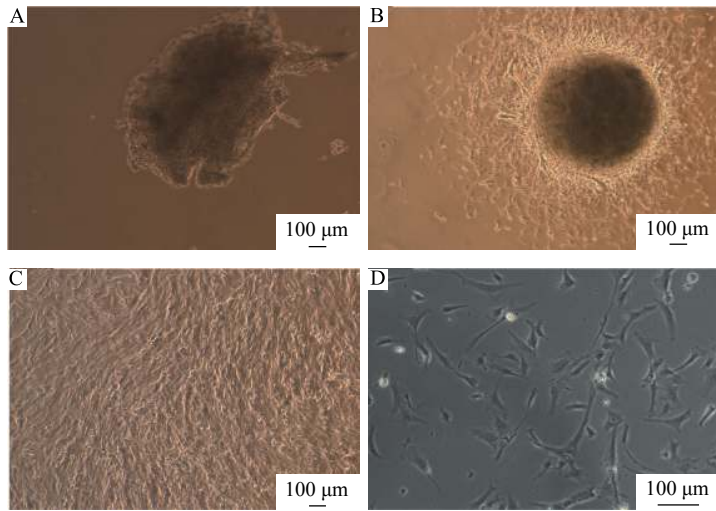
2.1 鸽骨骼肌卫星细胞的形态

分别采用组织块贴壁法和胶原酶消化法对鸽骨骼肌卫星细胞进行分离培养。组织块经 12 h 贴

壁即可贴附于细胞瓶底部 (图 2A), 1 d 后便有细胞从组织块中开始游出; 培养 3 d 后大量细胞呈放射状聚集在组织块周围 (图 2B), 细胞多为梭形或多角形。随着培养进程细胞密度不断增大, 至第 5 天时, 细胞密度达到 90% 以上 (图 2C)。采用胶原酶消化法获得的肌卫星细胞, 在贴壁前呈圆形, 贴壁后与组织块贴壁法获得的细胞形态相似, 也多为短梭形、梭形或多角形 (图 2D); 贴壁 1 d 后可观察到细胞增殖。

2.2 鸽骨骼肌卫星细胞的自分化及免疫荧光鉴定

采用含体积分数为 20%FBS 的 DMEM 高糖培养体系对鸽骨骼肌卫星细胞 (图 3A) 进行培养。在未采用血清饥饿分化诱导的情况下, 当细胞培养至第 7 天, 可观察到大量骨骼肌卫星细胞之间相互融合, 分化形成明显呈平行排列的肌管 (图 3B、3C); 免疫荧光检测结果显示, MyHC 在鸽肌管细胞中阳

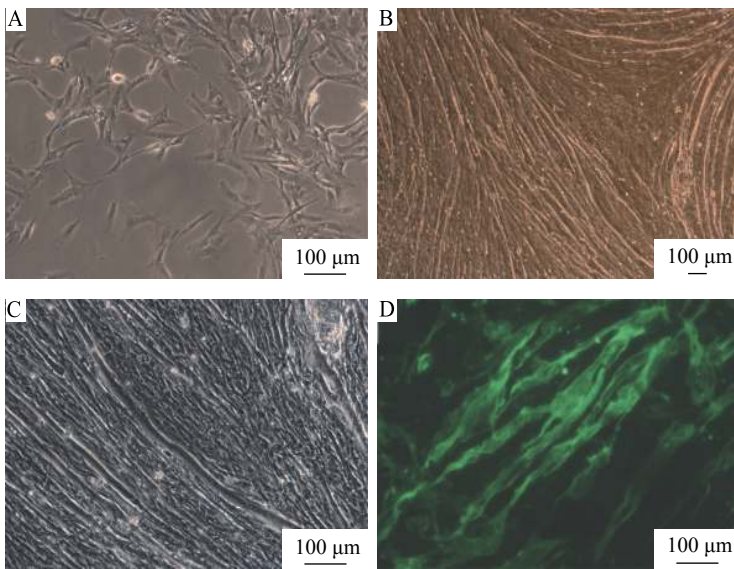


A: 组织块贴壁 1 d; B: 组织块贴壁 3 d 后细胞; C: 组织块贴壁 5 d 后细胞; D: 贴壁 1 d 后胶原酶消化法分离细胞

A: Tissue explants after adherence for one day; B: Cells of the tissue explants after adherence for three days; C: Cells of the tissue explants after adherence for five days; D: Cells isolated by collagenase digestion method after adherence for one day

图 2 培养的鸽骨骼肌卫星细胞形态

Fig. 2 Morphology of cultured pigeon skeletal muscle satellite cells



A: 分化前骨骼肌卫星细胞形态; B, C: 分化后肌管形态; D: MyHC 在肌管中阳性表达

A: Morphology of skeletal satellite cells before differentiation; B, C: Morphology of differentiated myotubes; D: Positive expression of MyHC in myotubes

图 3 分化前后细胞形态及免疫荧光鉴定

Fig. 3 Cell morphology before and after differentiation and immunofluorescent identification

性表达 (图 3D)。上述结果表明本试验从家鸽胸肌中分离出的原代细胞为鸽骨骼肌卫星细胞, 且该细胞在未使用马血清诱导的情况下, 使用正常生长培养基可自行分化出肌管。

2.3 鸽骨骼肌卫星细胞的生长曲线

鸽骨骼肌卫星细胞生长曲线如图 4 所示, 曲线呈“S”型。其中第 1~3 天为潜伏期, 细胞增殖缓慢, 第 3~5 天为对数增长期, 第 5 天细胞数达到最大, 第 6 天细胞发生接触抑制, 部分细胞脱离培养瓶底部, 细胞数减少。

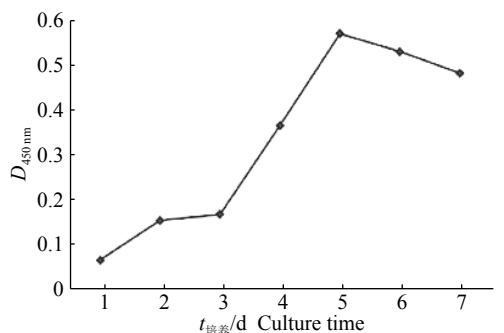


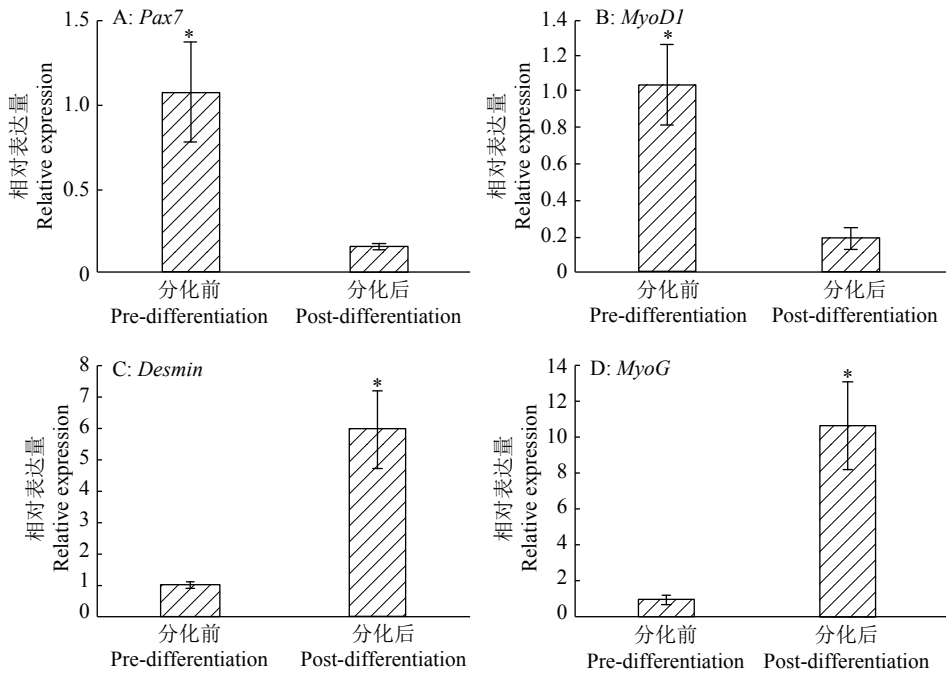
图 4 鸽骨骼肌卫星细胞生长曲线

Fig. 4 Growth curve of pigeon skeletal muscle satellite cells

2.4 肌管形成前后成肌相关基因的表达

除用形态学方法、免疫荧光法鉴定鸽骨骼肌卫星细胞分化形成肌管外, 本试验还通过检测成肌相关基因 (*Desmin*、*Pax7*、*MyoD1*、*MyoG*) 的表达情况进一步确认鸽骨骼肌卫星细胞的分化。RT-qPCR 结果如图 5 所示, 分离出的鸽骨骼肌卫星细胞培养至第 7 天 (分化后出现大量肌管), 细胞中

Pax7 和 *MyoD1* 基因的相对表达量在分化后显著降低 ($P<0.05$) (图 5A、5B), 其分化前的相对表达量是分化后的 7.01 和 5.51 倍; 而培养至第 7 天时 (分化后) 细胞中 *Desmin* 和 *MyoG* 基因的相对表达量则显著高于第 3 天 (分化前) ($P<0.05$) (图 5C、5D), 其分化后的相对表达量分别是分化前的 5.68 和 10.38 倍。



各图中“*”表示 2 组数据差异显著 ($P<0.05$, *t* 检验)

In each graph, “*” indicated significant difference between two data sets ($P<0.05$, *t*-test)

图 5 鸽骨骼肌卫星细胞分化前后的 RT-qPCR 基因定量结果

Fig. 5 RT-qPCR quantification results of genes in pigeon skeletal muscle satellite cells before and after differentiation

3 讨论与结论

原代细胞作为体外研究的重要细胞模型, 目前已被广泛运用于分子育种^[14]、病理^[15]、生理^[16]等多方面研究。骨骼肌卫星细胞在幼龄动物肌肉组织中占的比例很高, 但随着日龄的增加其比例不断减少^[17]。在以往禽类原代骨骼肌卫星细胞的分离研究中, 鸡一般取 15 日龄左右的鸡胚^[12]或者出壳后第 4 天的雏鸡^[18], 鸭以 13 日龄鸭胚^[13]作为试验材料。在本试验中, 选用 16 日龄的鸽胚作为材料, 其原因主要是 15 日龄以前的鸽胚胸肌组织量少, 而 17~18 日龄鸽胚胸肌中结缔组织增多, 容易引入杂细胞, 导致所分离的骨骼肌卫星细胞的比例降低。

大量的文献显示动物骨骼肌卫星细胞的诱导分化多采用血清饥饿或使用马血清的方法。代阳等^[9]使用含体积分数为 2% 马血清的培养基对小鼠骨骼肌卫星细胞进行诱导分化; 夏家红等^[19]则采用无血清培养基对大鼠骨骼肌卫星细胞诱导分化; 禽类肌

卫星细胞的分化常用含体积分数为 5% 马血清或胎牛血清的分化培养液进行诱导^[12, 20]。而本试验在使用含体积分数为 20% 胎牛血清的 DMEM 培养液正常培养鸽骨骼肌卫星细胞的过程中, 在没有使用血清饥饿或使用马血清的情况下, 意外地发现鸽骨骼肌卫星细胞可自行分化出肌管, 经免疫荧光法检测成肌特异性标志 MyHC 蛋白, 结果呈阳性, 进一步证实了鸽骨骼肌卫星细胞自分化现象。该现象在其他动物同类细胞的研究中鲜见报道, 有关鸽骨骼肌卫星细胞的自分化机制还有待于进一步研究。

结蛋白基因 (*Desmin*) 作为鉴定骨骼肌卫星细胞的标志基因之一, 其在 1976 年首次被发现^[21], 本试验结果显示, 分化后 *Desmin* 的相对表达量显著高于分化前细胞。陈永乐等^[22]的研究发现在 C2C12 细胞向成熟肌细胞分化过程中, *Desmin* 的表达逐渐增强, 该结果与本试验结果一致。此外, 肌分化因子 (*MyoD*) 为肌源性细胞特异性表达的一种转录因子, 是成肌细胞增殖的标志^[23]。 *MyoD* 作为主控基

因启动生肌分化程序时,通过调节肌细胞特异性增强子结合因子 2(Myocyte-specific enhancer-binding factor 2, Mef2) 的转录激活,同时激活 MAPK p38 途径,一系列的信号级联导致最终的肌球蛋白重链 (*Myh3*) 基因的激活^[23]。宋佳等^[24]对 C2C12 细胞的研究表明, *MyoD* 的表达在诱导分化后第 2 天开始上调,第 3 天达到最高峰,第 4 天开始下降。冯永强等^[25]对大鼠骨骼肌卫星细胞的研究也显示,当分化至第 2 天,其表达量达到峰值,随后逐渐下降。在本试验中,培养至第 3 天的细胞 *MyoD1* 基因的相对表达量明显高于第 7 天,与上述报道结果基本一致。肌细胞生成素 (*MyoG*) 基因作为肌细胞终端分化的关键基因^[26],是细胞分化的标志^[23],能控制成肌细胞的融合,使单核的成肌细胞转化为多核的肌纤维, *MyoG* 基因的表达受 *MyoD* 和 *Myf5* 基因的调控,且与 *MyoD* 基因共同激活终端分化基因。Ling 等^[27]的研究结果显示 *MyoG* 基因在原代山羊肌卫星细胞成肌分化后显著上调,与本试验结果一致。结合上述成肌相关基因在分化前后的表达特点、细胞自分化的形态学变化及免疫荧光鉴定结果,表明我们所分离培养的细胞为鸽骨骼肌卫星细胞。本试验建立了鸽原代骨骼肌卫星细胞的分离、培养体系,为后续开展鸽肌肉生长及发育机理的研究提供了细胞模型。

参考文献:

- [1] 韩占兵,张立恒,黄炎坤. 我国肉鸽养殖现状与前景效益分析[J]. 河南畜牧兽医(市场版), 2016, 37(6): 22-23.
- [2] 卜柱. 我国肉鸽产业发展现状及未来行情走势[J]. 中国禽业导刊, 2015(22): 24-27.
- [3] ANDERSON J L, TAYLOR RL JR, SMITH E C, et al. Differentially expressed genes in aortic smooth muscle cells from atherosclerosis-susceptible and atherosclerosis-resistant pigeons[J]. *Poult Sci*, 2012, 91(6): 1315-1325.
- [4] CUI J, HALBROOK R S, ZANG S, et al. Use of homing pigeons as biomonitors of atmospheric metal concentrations in Beijing and Guangzhou, China[J]. *Ecotoxicology*, 2016, 25(3): 439-446.
- [5] ROBERTSON A M, BIEWENER A A. Muscle function during takeoff and landing flight in the pigeon (*Columba livia*)[J]. *J Exp Biol*, 2012, 215(Pt23): 4104-4114.
- [6] MAURO A. Satellite cell of skeletal muscle fibers[J]. *J Biophys Biochem Cytol*, 1961, 9(2): 493-495.
- [7] ASAKURA A, KOMAKI M, RUDNICKI M. Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation[J]. *Differentiation*, 2001, 68(4/5): 245-253.
- [8] 吕捷,赵春礼,李玉成,等. 成人骨骼肌细胞原代培养[J]. *神经解剖学杂志*, 2001, 17(1): 75-76.
- [9] 代阳,王轶敏,刘新峰,等. 小鼠骨骼肌卫星细胞的分离培养和鉴定[J]. *天津农学院学报*, 2014(1): 1-4.
- [10] 边艳超,牧仁,李向臣,等. 鲁西黄牛胚胎骨骼肌卫星细胞分离培养及生物学特性[J]. *华中农业大学学报*, 2013, 32(2): 90-96.
- [11] 郑琪,睢梦华,朱龙,等. 安淮山羊骨骼肌卫星细胞的分离培养与鉴定[J]. *安徽农业大学学报*, 2017, 44(2): 198-202.
- [12] 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.
- [13] 单艳菊,束婧婷,宋迟,等. 鸭骨骼肌卫星细胞的分离培养与鉴定[J]. *江苏农业科学*, 2012, 40(12): 26-28.
- [14] 樊廷俊,徐晓辉,姜国建,等. 条纹星蝶连续性鳍细胞系的建立与鉴定[J]. *山东大学学报(理学版)*, 2010, 45(5): 22-27.
- [15] 周海波,蔡建庭,李茂岚,等. 白藜芦醇诱导人胃癌原代细胞裸鼠移植瘤凋亡的研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2005, 21(3): 528-532.
- [16] 庄鹏,江元森,马会慧,等. 长期培养的大鼠原代肝细胞功能和形态学观察[J]. *中国病理生理杂志*, 2005, 21(5): 1001-1005.
- [17] 李方华,弓慧敏,冯士彬,等. 骨骼肌卫星细胞的研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2010, 37(10): 25-28.
- [18] 陈岩,王琨,朱大海. 鸡骨骼肌卫星细胞的分离培养、鉴定及生物学特性研究[J]. *遗传*, 2006, 28(3): 257-260.
- [19] 夏家红,谢艾妮,徐磊,等. 大鼠骨骼肌卫星细胞体外培养的实验研究[J]. *中华实验外科杂志*, 2005, 22(2): 214-215.
- [20] TAKAYA T, NIHASHI Y, KOJIMA S, et al. Autonomous xenogenic cell fusion of murine and chick skeletal muscle myoblasts[J]. *Anim Sci J*, 2017, 88(11): 1880-1885.
- [21] LAZARIDES E, HUBBARD B D. Immunological characterization of the subunit of the 100 A filaments from muscle cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1976, 73(12): 4344-4348.
- [22] 陈永乐,周光前,邓宇斌,等. C2C12 成肌细胞体外诱导分化为肌管的实验[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2008, 29(1): 10-15.
- [23] 王静,宋新磊,崔焕先,等. 骨骼肌卫星细胞的特性及其增殖与分化的调控[J]. *中国细胞生物学学报*, 2007, 29(4): 497-502.
- [24] 宋佳,曾纛,郑民纛,等. 肌肉特异性微小 RNA 和成肌调节因子在 C2C12 细胞成肌分化过程中的表达[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(32): 5999-6005.
- [25] 冯永强,李峥,褚万立,等. 大鼠骨骼肌卫星细胞的原代培养鉴定和体外分化特点[J]. *中华医学杂志*, 2016, 96(12): 971-974.
- [26] 邱华玲,于建兴,陈宏权. *MyoG* 基因结构与功能研究进展[J]. *生物信息学*, 2007, 5(4): 190-192.
- [27] LING Y H, SUI M H, ZHENG Q, et al. miR-27b regulates myogenic proliferation and differentiation by targeting *Pax3* in goat[J]. *Sci Rep*, 2018, 8: 3909. doi: 10.1038/s41598-018-22262-4.