



鸡骨骼肌卫星细胞的分离培养与鉴定

戴巍^{1,2,3}, 宋瑞龙^{1,2,3}, 张远浩^{1,2,3}, 邹辉^{1,2,3},
顾建红^{1,2,3}, 袁燕^{1,2,3}, 卞建春^{1,2,3}, 刘学忠^{1,2,3*}

(1. 扬州大学兽医学院, 扬州 225009; 2. 江苏高校动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 扬州 225009; 3. 扬州大学 教育部农业与农产品安全国际合作联合实验室, 扬州 225009)

摘要: 旨在建立鸡骨骼肌卫星细胞(muscle satellite cell, MSC)体外分离、培养、纯化、诱导分化及鉴定的方法。选取 12 胚龄 SPF 鸡胚, 综合松散肌肉纤维和游离纤维基质层细胞等原理, 对分离细胞使用的酶以及后续的细胞纯化、诱导分化方法进行优化; 并从形态学、细胞分化能力、生长曲线、免疫荧光、RT-PCR 等方面对 MSC 进行鉴定, 从而提出一种鸡骨骼肌卫星细胞的混合酶消化分离培养方法。结果表明, 刚分离纯化后的细胞折光性强, 24 h 贴壁展开后呈纺锤状; 待诱导分化后能形成排列整齐的多核肌管; CCK-8 测定细胞生长曲线呈典型的“S”型; 优化后, 细胞存活率为(90.82±1.294)%, 细胞纯度为(90.44±1.264)%; 免疫荧光检测标志性基因 Pax7、Desmin 表达阳性; RT-PCR 检测标志性基因 *Pax7*、*MyHC*、*MyoD1* 呈阳性; 并且分化前标志性基因 *Pax7* 表达量是分化后的 1.705 倍, 分化后期标志性基因 *MyHC* 表达量是分化前的 13.073 倍。该试验建立了一种快速简便的鸡骨骼肌卫星细胞的体外培养方法, 为研究鸡骨骼肌细胞生物学机制、肉鸡品种优化、细胞移植修复提供良好的细胞模型。

关键词: 骨骼肌卫星细胞; 分离; 培养; 诱导分化; 鉴定

中图分类号: S831.1

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2021)03-0676-07

Isolation, Culture and Identification of Muscle Satellite Cells of Chicken

DAI Wei^{1,2,3}, SONG Ruilong^{1,2,3}, ZHANG Yuanhao^{1,2,3}, ZOU Hui^{1,2,3},
GU Jianhong^{1,2,3}, YUAN Yan^{1,2,3}, BIAN Jianchun^{1,2,3}, LIU Xuezhong^{1,2,3*}

(1. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;
2. Jiangsu Co-innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou 225009, China; 3. Joint International Research Laboratory of Agriculture and Agri-Product Safety of the Ministry of Education of China, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: The purpose of the study was to establish methods for isolation, culture, purification, differentiation and identification of chicken skeletal muscle satellite cells (MSC) *in vitro*. Selecting SPF chicken embryos of 12 embryonic age, integrating the principles of loose muscle fiber and free fiber matrix layer cells, the enzymes used to separate cells, cell purification and differentiation induction methods were optimized, and the MSC was identified from the aspects of morphology, cell differentiation ability, growth curve, immunofluorescence detection, RT-PCR identification, etc. Therefore, a method of digesting, separating and culturing chicken skeletal

收稿日期: 2020-08-06

基金项目: 江苏省农业科技自主创新资金项目(CX(18)3022); 江苏省高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)

作者简介: 戴巍(1995-), 女, 福建漳州人, 硕士, 主要从事动物营养代谢病与中毒病研究, E-mail: 405069066@qq.com; 宋瑞龙(1984-), 男, 山东潍坊人, 实验师, 博士, 主要从事动物营养代谢病与中毒病研究, E-mail: srlbio@163.com。戴巍和宋瑞龙为同等贡献作者

* 通信作者: 刘学忠, 主要从事动物营养代谢病与中毒病研究, Tel: 0514-87979042, E-mail: liuxuezhong68@163.com

muscle satellite cells with mixed enzymes was proposed. The results showed that the separated and purified cells had strong refractive index and adhered to the wall after 24 hours, showing a spindle shape; after induced differentiation, it could form neatly arranged multinucleated myotubes; the cell growth curve measured by using CCK-8 method showed a typical "S" shape; after the optimization, the cell survival rate was $(90.82 \pm 1.294)\%$, the cell purity was $(90.44 \pm 1.264)\%$; immunofluorescence detection of the marker genes Pax7 and Desmin were positive; RT-PCR detection of the marker genes Pax7, MyHC, MyoD1 were positive; and the expression of the marker gene Pax7 before differentiation was 1.705 times that after differentiation, and the expression of the marker gene MyHC after differentiation was 13.073 times that before differentiation. This study established a quick and simple method for culturing chicken skeletal muscle satellite cells *in vitro*, which provides a good cell model for studying the biological mechanism of chicken skeletal muscle cells, optimization of broiler breeds, and cell transplantation repair.

Key words: muscle satellite cell; isolation; culture; induced differentiation; identification

* **Corresponding author:** LIU Xuezhong, E-mail: liuxuezhong68@163.com

骨骼肌卫星细胞(muscle satellite cell, MSC)又称为肌源性干细胞,位于肌纤维肌膜和周围细胞外基质之间,即基底膜(ECM)处^[1]。细胞呈扁平纺锤形或梭形,在正常条件下,肌肉卫星细胞处于静止的待激活状态,当受到外界各类刺激后被激活,修复损伤。因此,肌肉卫星细胞对骨骼肌再生和生长起着至关重要的作用。

骨骼肌卫星细胞起源尚不完全清楚,目前有两种假说:第一种为体节来源假说,即卫星细胞起源于胚层内体节来源的细胞中,这种假说被证实于鹌鹑胚胎试验^[2];第二种为非生肌来源假说,De Angelis等^[3]将分离胚胎背部主动脉得到的细胞移植到小鼠中,可参与肌肉再生。但成熟骨骼肌卫星细胞可以同时表达出两种标记物,且骨骼肌卫星细胞存在异质性,表明两种起源可能都是存在的^[4]。

骨骼肌卫星细胞移植作为一种治疗多种再生性疾病(肌营养不良、心力衰竭等)的手段,目前已被广泛研究^[5]。因此,高纯度骨骼肌卫星细胞作为移植细胞及基因治疗工程细胞在临床上具有良好的应用前景。然而,由于其干细胞的特性,MSC含量仅占总肌细胞的2%~5%,且目前,MSC分离纯化往往需要使用细胞分选仪,操作复杂且代价较高^[6],实验室分离方法一般为组织贴壁法和单双酶解法,但其耗时长、细胞存活率低、保存性差。因此,建立一个快速、简便、高效的骨骼肌卫星细胞体外培养的方法尤为重要。鉴于此,本试验在传统分离方法的基础上对提取细胞使用的酶、纯化细胞的方法以及后续的细胞分化方法进行优化,以期建立一种高效的骨

骼肌卫星细胞的分离培养方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

12 胚龄 SPF 鸡胚来自济南鑫盛达生物工程有限公司。

1.2 主要试剂和仪器

DMEM-F12 高糖培养基(Gbico);胎牛血清(Gbico);青链霉素混合液($10\ 000\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 青霉素、 $10\ 000\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素,索莱宝);磷酸盐缓冲液PBS(自配);自制混合酶溶液(胰蛋白酶、I型胶原酶;专利号:201911226803.8);0.25%胰蛋白酶(新赛美);CCK-8试剂(上海同仁);4%多聚甲醛(新赛美);Pax7抗体、Desmin抗体(ABclonal);兔抗鼠488标记二抗、DIPI(碧云天);TRIzol试剂(天根);反转录试剂、ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix(Vazyme)。其他试剂均为国产优质分析纯。所有PCR引物均由华大基因有限公司合成。

5810RR型冷冻离心机(Eppendorf);WYJ-857BR型医用净化工作台(苏州金燕净化设备厂);二氧化碳培养箱(Thermo);Sunrise-basic型酶标仪(Tecan);7500型实时荧光定量PCR仪(Applied Biosystems)。

1.3 鸡骨骼肌卫星细胞分离与培养

取12胚龄SPF鸡蛋,取出鸡胚;酒精棉擦拭腿部。取髌关节以下腿部,弃筋膜、脂肪、骨骼等非肌肉组织,并用PBS缓冲液冲洗;用眼科剪剪至肉糜状,将其转移至离心管中,吹打混匀,静置5 min,弃

上清;加入组织块两倍体积的自制混合酶溶液(专利号:201911226803.8),置 37 °C 恒温摇床中消化 30 min;待消化完毕后加入同等体积生长培养基(含 15% FBS,1%青链霉素混合液的 F12-DMEM 培养基)终止消化。消化液依次过 100 目和 400 目细胞过滤筛。细胞悬液 $1\ 500\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min;弃上清,生长培养基重悬细胞接种于细胞培养皿内,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱内。

1.4 鸡骨骼肌卫星细胞纯化及传代培养

细胞沉淀用生长培养基重悬并移入培养板中,置 37 °C 培养箱 1 h;取未贴壁细胞悬液移入新的培养板中进行第二次贴壁,以此去除成纤维细胞;24~36 h 后换液,从而完成对传统差速贴壁法的优化。

由于 MSC 密度达到 70% 后会出现融合,因此在密度达到 60% 左右便可以进行传代。弃培养基并用 PBS 洗两遍,加入 1 mL 的 0.25% 胰蛋白酶;培养基终止消化;收集细胞悬液, $1\ 500\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min;重悬后接种于细胞培养瓶内,置 37 °C、5% CO₂ 培养箱内。

将细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化,滴管吹落细胞, $1\ 500\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,收集细胞沉淀,冻存液重悬后置液氮中保存。

1.5 鸡骨骼肌卫星细胞诱导分化

取培养至第二代的细胞,待其分裂生长至 70% 且开始融合后,弃培养基,PBS 缓冲液洗涤,用诱导分化培养基(含 4% FBS 的 DMEM-F12 培养基),诱导分化 2~3 d,镜下观察 MSC 分化情况。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因 Gene	序列(5'→3') Sequence	登录号 Accession No.	扩增产物大小/bp Product size
<i>βactin</i>	F:CAGCCATCTTTCTTGGGTAT R:CTGTGATCTCCTTCTGCATCC	NC_006101	137
<i>Pax7</i>	F:TGTTAGCAATGGCCTCTCTCC R:GGATGCTCATCACCTGATTGTTC	NC_006108	103
<i>MyHC</i>	F:CTCCTCACGCTTTGGTAA R:TGATAGTCGTATGGGTTGGT	NC_006101	149
<i>MyoD1</i>	F:GCTACTACACGGAATCACCAAAT R:CTGGGCTCCACTGTCACTCA	NC_006092	148

1.9 统计分析

结果以“平均数±标准差(Mean±SD)”表示,

1.6 鸡骨骼肌卫星细胞生长曲线的绘制

取第三代细胞接种于 96 孔板,每孔 5×10^3 个细胞;分为 7 组,每组 5 个重复。接种时间记为第 0 天,之后连续 7 d 在固定的时间提前 1 h 加入 $10\ \mu\text{L}$ CCK-8,用酶标仪测定 450 nm 处吸光值;以时间为横坐标,吸光值为纵坐标,绘制生长曲线。

1.7 鸡骨骼肌卫星细胞免疫荧光鉴定

取第三代细胞接种于 24 孔板上,每孔 2×10^4 个细胞。将细胞用 PBS 洗涤;4% 多聚甲醛固定 20 min,0.2%~0.5% Triton X-100 透膜处理 15 min;处理完毕后用 PBS 洗涤;滴加 5% BSA 封闭 1~2 h;弃封闭液,分别加入 Pax7、Desmin 一抗,4 °C 过夜孵育;回收一抗,PBS 洗涤;加入相应的兔抗鼠 488 标记二抗,37 °C 孵育 1 h;PBS 洗涤;加入 DIPI 染核 15 min;PBS 洗涤;封片,荧光显微镜下观察。

1.8 鸡骨骼肌卫星细胞 RT-PCR 鉴定

取第四代细胞接种于细胞培养皿中,采用 Trizol 法进行总 RNA 的提取,试剂盒反转录为 cDNA;以 cDNA 为模板,加入 Pax7、MyHC、MyoD1 基因上、下游引物进行 RT-PCR,引物序列见表 1;20 μL 体系:10 μL SYBR MIX,上、下游引物各 0.4 μL ,2 μL cDNA,无酶水补齐至 20 μL 。反应条件:95 °C 预变性 30 s;95 °C 变性 10 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,循环 40 次。产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,紫外成像系统采集图像。

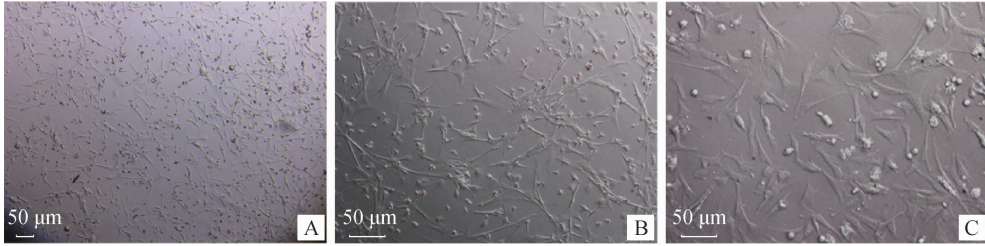
组间差异性采用 SPSS 17.0 软件中两样本均数 *t* 检验的方法进行分析比较, $P < 0.05$ 表示差异显著,

$P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果

2.1 鸡骨骼肌卫星细胞形态观察

用优化后的差速贴壁法纯化细胞,经过 24 h 后细胞贴壁,图 1A 中细胞生长旺盛、排列整齐、杂质

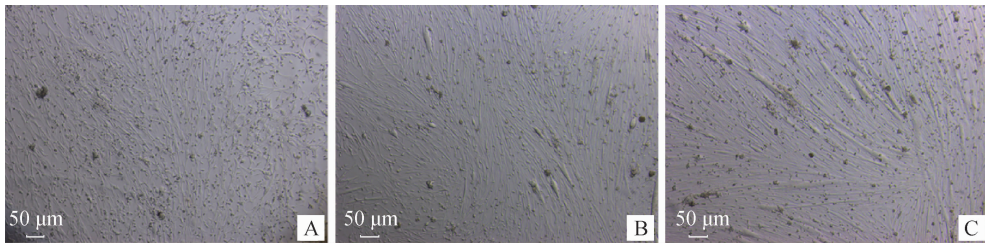


A. 4 倍镜下细胞形态;B. 10 倍镜下细胞形态;C. 20 倍镜下细胞形态

A. Cell morphology under $\times 4$ microscope; B. Cell morphology under $\times 10$ microscope; C. Cell morphology under $\times 20$ microscope

图 1 显微镜下细胞形态

Fig. 1 Cell morphology under microscope



A. 诱导分化 12 h;B. 诱导分化 24 h;C. 诱导分化 48 h

A. Induced differentiation for 12 h; B. Induced differentiation for 24 h; C. Induced differentiation for 48 h

图 2 诱导分化后显微镜下细胞形态(40 \times)

Fig. 2 Cell morphology under microscope after induced differentiation(40 \times)

2.2 鸡骨骼肌卫星细胞的生长曲线及存活率

由图 3 可见,第三代的 MSC 生长曲线呈“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 5~6 天细胞生长进入平台期,第 6 天以后,细胞数量减少。说明鸡骨骼肌卫星细胞在体外培养的环境下能够存活、增殖,且生长状况良好。

将所得鸡骨骼肌卫星细胞经台盼蓝染色并计算,由表 2 可见,(90.82 \pm 1.294)% 的细胞不着色,提示优化改良后的方法所得的细胞存活率较高。

2.3 鸡骨骼肌卫星细胞免疫荧光鉴定

采用免疫荧光对 MSC 特异性标志基因 Pax7、Desmin 的表达进行鉴定,倒置荧光显微镜观察拍照。由图 4 可见,Pax7 抗体与细胞中蛋白结合良好(图 4B),蛋白处于细胞核中,符合卫星细胞特性(图

较少;图 1B 中细胞接触生长相互连接;图 1C 中细胞在分化前呈梭形。

细胞生长到 70% 趋于融合时,诱导分化。由图 2 可见,诱导分化 12 h 时细胞汇集成簇(图 2A);24 h 时形成肌管(图 2B);48 h 时肌管粗大、排列整齐(图 2C)。

4C)。由图 5 可见,Desmin 抗体与细胞中蛋白结合良好(图 5B),蛋白处于细胞质中,符合卫星细胞特性(图 5C)。

随机选取 5 个视野对照核染位置及明场,计算阳性率,得出其纯度可达(90.44 \pm 1.264)%。

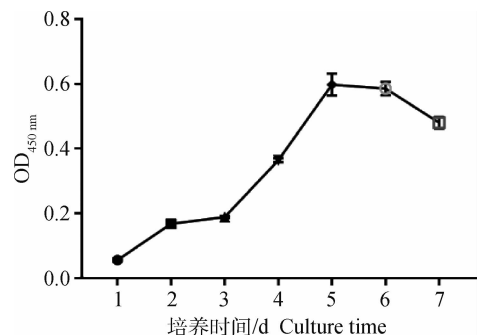


图 3 鸡骨骼肌卫星细胞生长曲线

Fig. 3 Growth curve of chicken skeletal muscle satellite cells

表 2 细胞活率

Table 2 Cell viability

染色细胞/个 Stained cells	未染色细胞/个 Unstained cells	细胞总数/个 Total amount of cells	细胞活率/% Cell viability
8	94	102	92.15
12	90	102	88.23
10	93	103	92.07

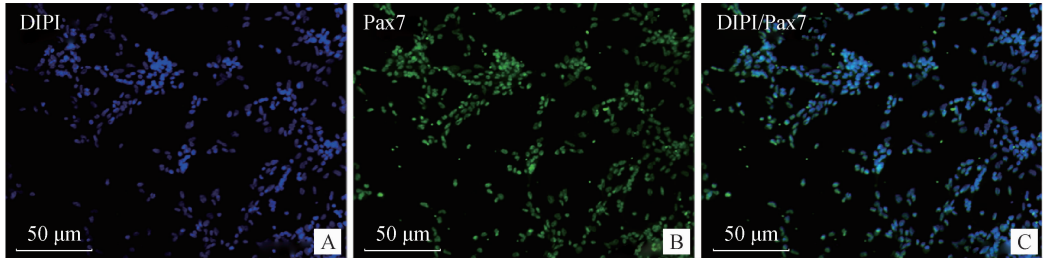


图 4 Pax7 免疫荧光染色鉴定 (20×)

Fig. 4 Pax7 immunofluorescence staining identification (20×)

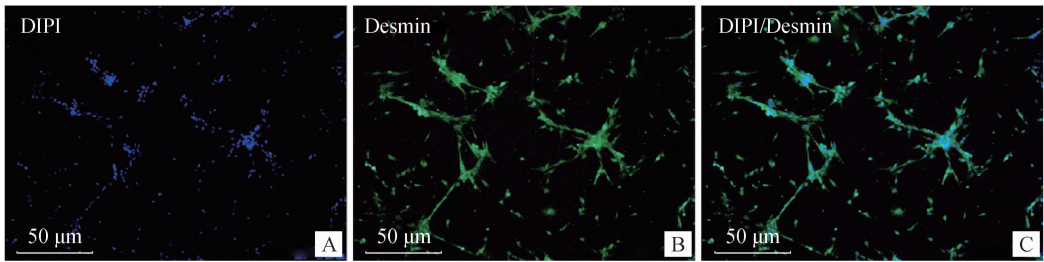


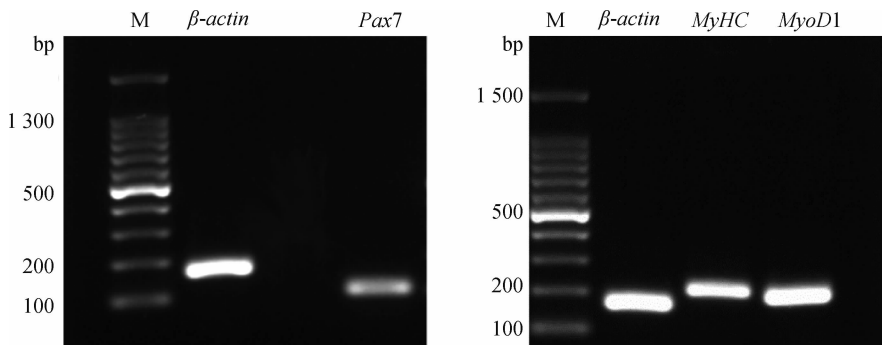
图 5 Desmin 免疫荧光染色鉴定 (20×)

Fig. 5 Desmin immunofluorescence staining identification (20×)

2.4 鸡骨骼肌卫星细胞 RT-PCR 鉴定

采用 RT-PCR 以及凝胶电泳检测纯化后 MSC 静止期、分化期、增殖期的标志性基因 *Pax7*、*MyHC*、*MyoD1* 的表达量。结果如图 6 显示, *Pax7*、*MyHC*、

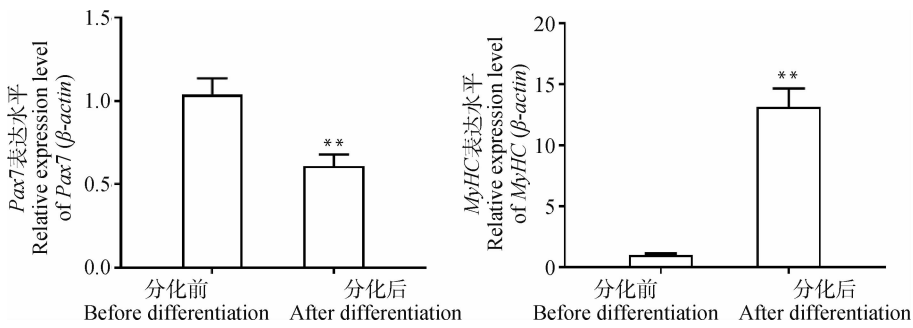
MyoD1 表达阳性; 由图 7 可见, 分化后静止期标志性基因 *Pax7* 表达量极显著下降 ($P < 0.01$), 比分化前降低了 1.705 倍; 分化后标志性基因 *MyHC* 表达量极显著上升 ($P < 0.01$), 是分化前的 13.073 倍。



M. DNA 相对分子质量标准

M. DNA marker

图 6 *Pax7*、*MyHC*、*MyoD1* 凝胶电泳鉴定Fig. 6 Gel electrophoresis to identify *Pax7*, *MyHC*, *MyoD1*



*. $P < 0.05$; * *. $P < 0.01$

图7 分化前后 Pax7、MyHC 基因转录水平

Fig.7 Pax7 and MyHC gene transcription levels before and after differentiation

3 讨论

骨骼肌卫星细胞作为一种肌源质干细胞,在机体正常情况下处于静止状态,当受到一定的刺激时,可瞬时活化进入细胞周期完成修复,对维持机体稳态有非常重要的作用。长期以来,MSC 都被认为是只能分化为肌管的单潜能干细胞;但近些年的研究结果表明,MSC 也具备多潜能分化能力^[7-8]。Ruiz-ojeda 等^[9]发现,在细胞培养时添加胰岛素、地塞米松和罗格列酮等诱导因子后,细胞形态会发生变化并产生大量脂滴;而添加 β -甘油磷酸钠、抗坏血酸和地塞米松则可以促进钙质形成,从而诱导 MSC 向成骨分化^[10]。这些研究表明,MSC 具有可塑性强、多潜能等优点,可广泛应用于损伤修复以及基础研究中。而高效、便捷的分离方法便成为了后续研究的基础,因此,近年来分离纯化的方法在不断改进。

常用分离的方法一般为组织贴壁法^[11-12]、两步消化法^[13]和单酶解法^[14]。最传统的为组织贴壁法,但其需要的时间很长,已逐渐被淘汰;两步消化法常用胶原酶或分散酶与胰蛋白酶联合消化,但其耗时长,过程中易污染;单酶解法常只用胶原酶消化,容易消化不完全。且目前,成功分离的 MSC 以人、鼠、猪为主,在禽类中尚没有很好的分离方法。本试验采用自主研发的混合酶,综合了胶原酶松散肌肉纤维及胰蛋白酶游离细胞的原理,通过比例筛选,择出消化效果最优、成本最低的配方,最终一步消化完成 MSC 分离,从而缩短分离时间,最大限度地解决了现有技术中细胞活率低、数量少、可保存性差的缺陷和不足。但是,酶消化法分离细胞不可避免地会导致成纤维细胞混杂其中,因此,为了提高 MSC 的纯度,必须进行纯化。其中,最高效的方法

是采用高通量细胞分选仪器进行精密的分选纯化^[6],但需要昂贵的仪器,且分选前还要进行繁琐的细胞标记处理,因此并不适用于家禽 MSC 的纯化;梯度离心法由于其操作复杂且 MSC 本身数量较少,会使细胞在纯化过程进一步流失;而传统差速贴壁法则根据 MSC 首次贴壁需要 12~24 h 这一特性,一般需要进行两次 2 h 和一次 24 h 的两次更换培养皿^[15]。该方法耗时较长,因此,本试验根据成纤维细胞在 0.5~1 h 就能贴壁这一特性,在传统差速贴壁法的基础上进行优化,也就是每隔 1 h 将上清转移到新培养皿中,连续重复 2~3 次,这一改进大大减少了纯化细胞的时间和工作量,且纯化效果良好。本试验根据 MSC 生长到 70% 开始融合,并且在外界刺激条件下会定向分化为肌管这一特性,模拟非适宜的生长环境,通过多次 FBS 浓度的筛选,开创性地采用低血清浓度分化法,也就是当 MSC 生长到 70% 左右时采用含 4% FBS 的培养基诱导分化 MSC,取代了传统的含 2% 的马血清与 1%~2% 鸡胚提取物制成的分化培养基,在保证细胞活率的情况下,更加简便快捷,提高了在普通实验室操作的可行性。

目前,对 MSC 的鉴定公认度最高的是免疫荧光标记法,而 Pax7 是骨骼肌卫星细胞静止期的特异性标志蛋白,可以作为鉴定细胞的标志物^[16];Desmin 是构成细胞骨架的成分之一,为肌纤维所特有,是骨骼肌卫星细胞的基本标记^[17]。因此,本试验采用 Pax7、Desmin 双染,从而初步鉴定分离的细胞为具有分化潜能的骨骼肌卫星细胞。同时,采用 RT-PCR 的方法检测静止期、增殖期及分化期特异性基因 Pax7、MyoD1、MyHC 的表达量,进一步证明本研究分离培养的细胞是具有多潜能分化生物学

特性的骨骼肌卫星细胞。

4 结 论

本试验采用自制混合酶初步建立了鸡骨骼肌卫星细胞的分离方法,并对细胞纯化和诱导方法进行了优化。同时,在形态学和基因表达水平上对细胞进行了鉴定。为鸡骨骼肌生长发育、肉质改良、药理毒理试验、细胞移植及基因治疗工程在临床应用提供了研究基础。

参考文献 (References):

- [1] DUMONT N A, WANG Y X, RUDNICKI M A. Intrinsic and extrinsic mechanisms regulating satellite cell function [J]. *Development*, 2015, 142 (9): 1572-1581.
- [2] MAURO A. Satellite cell of skeletal muscle fibers [J]. *J Biophys Biochem Cytol*, 1961, 9(2): 493-495.
- [3] DE ANGELIS L, BERGHELLA L, COLETTA M, et al. Skeletal myogenic progenitors originating from embryonic dorsal aorta coexpress endothelial and myogenic markers and contribute to postnatal muscle growth and regeneration [J]. *J Cell Biol*, 1999, 147 (4): 869-877.
- [4] 汪 茜, 蒲传强. 肌肉卫星细胞的研究进展 [J]. *武警医学*, 2007, 18(5): 381-383.
WANG Q, PU C Q. Advances in research of muscular satellite cells [J]. *Medical Journal of the Chinese People's Armed Police Forces*, 2007, 18(5): 381-383. (in Chinese)
- [5] YE L, HAIDER H K, TAN R S, et al. Transplantation of nanoparticle transfected skeletal myoblasts overexpressing vascular endothelial growth factor-165 for cardiac repair [J]. *Circulation*, 2007, 116(11): 113-120.
- [6] MOTOHASHI N, ASAKURA Y, ASAKURA A. Isolation, culture, and transplantation of muscle satellite cells [J]. *J Vis Exp*, 2014(86): 50846.
- [7] CASTIGLIONI A, HETTMER S, LYNES M D, et al. Isolation of progenitors that exhibit myogenic/osteogenic bipotency *in vitro* by fluorescence-activated cell sorting from human fetal muscle [J]. *Stem Cell Rep*, 2014, 2(1): 92-106.
- [8] ASAKURA A, RUDNICKI M A, KOMAKI M. Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation [J]. *Differentiation*, 2001, 68 (4-5): 245-253.
- [9] RUIZ-OJEDA F J, RUPÉREZ A I, GOMEZ-LLORENTE C, et al. Cell models and their application for studying adipogenic differentiation in relation to obesity: a review [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(7): 1040.
- [10] MANIATOPOULOS C, SODEK J, MELCHER A H. Bone formation *in vitro* by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats [J]. *Cell Tissue Res*, 1988, 254(2): 317-330.
- [11] 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 Z H, WANG X, LI X K, 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. (in Chinese)
- [12] BRUN C E, WANG Y X, RUDNICKI M A. Single EDL myofiber isolation for analyses of quiescent and activated muscle stem cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1686: 149-159.
- [13] YANG J J, LIU H, WANG K F, et al. Isolation, culture and biological characteristics of multipotent porcine skeletal muscle satellite cells [J]. *Cell Tissue Bank*, 2017, 18(4): 513-525.
- [14] 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.
LI F H, GONG H M, FENG S B, et al. Research progress of skeletal muscle satellite cells [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2010, 37 (10): 25-28. (in Chinese)
- [15] GASTER M, BECK-NIELSEN H, SCHRØDER H D. Proliferation conditions for human satellite cells the fractional content of satellite cells [J]. *APMIS*, 2001, 109(11): 726-734.
- [16] VON MALTZAHN J, JONES A E, PARKS R J, et al. Pax7 is critical for the normal function of satellite cells in adult skeletal muscle [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(41): 16474-16479.
- [17] LAZARIDES E, HUBBARD B D. Immunological characterization of the subunit of the 100 Å filaments from muscle cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1976, 73(12): 4344-4348.