

安淮山羊骨骼肌卫星细胞的分离培养与鉴定

郑琪^{1,2}, 睢梦华^{1,2}, 朱龙^{1,2}, 吴昊^{1,2}, 丁建平^{1,2}, 张运海^{1,2}, 凌英会^{1,2,3*}

(1. 安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036; 2. 安徽地方畜禽遗传资源保护与生物育种省级实验室, 合肥 230036; 3. 安徽省羊繁育工程技术研究中心, 合肥 230036)

摘要: 为了分离得到安淮山羊骨骼肌卫星细胞, 成功构建山羊骨骼肌卫星细胞系, 为相关研究提供实验材料。以安淮山羊背最长肌肌肉组织为材料, 采取胶原酶和胰蛋白酶结合的二次消化法, 结合差速贴壁法纯化原代骨骼肌卫星细胞。对骨骼肌卫星细胞中特异性基因 *Pax7* 用免疫荧光染色法及 PCR 扩增加以鉴定。通过分离、纯化, 得到纯度较高的山羊骨骼肌卫星细胞, 其形态为圆形, 折光性强。培养一段时间后密度增大, 细胞呈梭型。所得骨骼肌卫星细胞生长状态良好, 具有较为一致的生长方式和形态特点。经免疫荧光染色法以及 PCR 鉴定发现细胞系中有 *Pax7* 基因的表达。通过上述材料和方法, 可获得较纯的山羊骨骼肌卫星细胞, 并稳定传代。

关键词: 山羊; 骨骼肌卫星细胞; 细胞分离; 体外培养; 免疫荧光染色

中图分类号: S827.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2017)02-0198-05

Separation and identification of Anhuai goat skeletal muscle satellite cells

ZHENG Qi^{1,2}, SUI Menghua^{1,2}, ZHU Long^{1,2}, WU Hao^{1,2}, DING Jianping^{1,2}, ZHANG Yunhai^{1,2}, LING Yinghui^{1,2,3}

(1. School of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. Local Animal Genetic Resources Conservation and Biobreeding Laboratory of Anhui Province, Hefei 230036;

3. Engineering Research Center of Reproduction and Breeding in Sheep of Anhui Province, Hefei 230036)

Abstract: The skeletal muscle satellite cells of Anhuai goat were isolated and used for construction of a series of experimental materials. The skeletal muscle satellite cells from longissimus muscle tissue of goats were isolated by collagenase and trypsinase digestion method. The satellite cells were purified by differential adhesion and cultured by passage, cryopreservation and other experimental methods. The marker gene of paired protein box (*Pax7*) of the cells was detected by PCR and immunocytochemistry technology. After purified by differential adhesion method, the high purity skeletal muscle satellite cells were grown from sphere with a strong refraction to long-shuttle in shape after culturing for a certain time. The results showed that the isolated muscle satellite cells were healthy and had a similar growth style and morphological characteristics. The expression of *Pax7* in the cells was detected through immunofluorescent staining and PCR amplification. The analysis result showed that high purity skeletal muscle satellite cells were obtained and these cells were genetic stable.

Key words: goat; skeletal muscle satellite cells; cell isolation; cell culture; immunocytochemistry technology

骨骼肌卫星细胞是存在于肌细胞膜和基膜之间具有增殖和分化潜能的组织干细胞, 被认为有一定的自我更新能力^[1]。骨骼肌卫星细胞在正常情况下, 位于肌纤维的肌膜与基底膜之间, 一般处于相对静止状态, 但在特定的应激条件比如肌肉损伤、萎缩等情况下可被激活, 进入分裂、增殖产生肌前体细胞, 并分化形成新的肌纤维或与原来的肌纤维

融合完成肌肉组织的生长与发育, 对肌组织的发育和修复有着重大意义^[2-5]。骨骼肌是动物躯体最重要的组成部分, 占到产肉动物躯体的 40%, 因此骨骼肌的生长发育与动物的产肉性能有着紧密联系^[6]。骨骼肌卫星细胞具有免疫原性低、移植后存活时间长, 具有较强增殖和分化能力等, 且在适当条件下培养, 可向成肌细胞、成脂肪细胞等多个方向发

收稿日期: 2016-07-13

基金项目: 安徽省自然科学基金项目 (1708085MC61) 和安徽省现代农业产业技术体系 (2016-2020) 共同资助。

作者简介: 郑琪, 硕士研究生。E-mail: noooooyeah@qq.com

* 通信作者: 凌英会, 博士, 副教授。E-mail: caaslyh@163.com

展^[7]。骨骼肌卫星细胞可作为动物产肉性能、肌肉方面的疾病等组织工程研究的实验材料。

骨骼卫星细胞的体外分离、培养与鉴定, 国内外已经有过不少报道。Mauro 在 1961 年采用电镜技术初次分离获得蛙的骨骼肌卫星细胞^[8]。目前, 小鼠、大鼠、山羊、绵羊、鸡、猪、牛和人等动物的骨骼肌卫星细胞均取得了一定进展^[9]。本实验研究山羊骨骼肌卫星细胞的培养及鉴定方法, 为构建一种理想的体外培养骨骼肌细胞的方法提供思路, 并为山羊繁殖育种研究提供良好的细胞材料来源。

1 材料与方 法

1.1 试验动物

实验用安淮山羊样本来源于合肥博大农业科技开发有限责任公司羊场。

1.2 主要试剂

含双抗(青霉素与链霉素)的 PBS, I 型胶原酶, 胰蛋白酶, 体积增殖培养液(80%DMEM/F12+10%胎牛血清(FBS)+10%马血清), 分化培养基(80%DMEM/F12+20%新生小牛血清), 4%多聚甲醛, 0.1%Triton X-100, BSA 溶液。

1.3 骨骼肌卫星细胞的分离

取安淮山羊背最长肌肌肉组织置于消毒灭菌的托盘上, 连同托盘送至照过紫外的超净台中, 用含有双抗的 PBS 冲洗。取 1 cm × 1 cm 的肌肉组织块于加入了双抗的 PBS 的 6 cm 培养基中, 去除筋膜、结缔组织以及脂肪组织等。然后转移至灭菌过的培养基中剪至肉糜状。加入 0.25%的 I 型胶原酶进行消化, 37 °C 恒温消化 1 h, 每隔 10 min 摇匀 1 次。加入 3 mL 0.25%胰酶, 37 °C 消化 30 min, 每隔 10 min 摇匀 1 次。

1.4 骨骼肌卫星细胞的培养

对体积增殖培养液进行 37°C 恒温处理。肉糜转入 15 mL 离心管 1 000 r·min⁻¹ 离心 9 min 后去除上清液转, 移至培养基中, 再加入 2.5 倍体积增殖培养液终止消化。将获得的细胞悬液依次通过 200 目、400 目的滤网, 收集滤液, 1 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 弃上清液。加入体积增殖培养液重新悬浮细胞, 接种至细胞培养皿上培养, 12~24 h 后可见细胞开始贴壁生长。4 d 后换液, 之后每天换液, 倒置显微镜下观察细胞的生长情况。

1.5 骨骼肌卫星细胞纯化

培养基中细胞密度达到 70%时, 弃培养皿中培养基^[10]。PBS 洗涤后, 用 0.25%胰酶进行消化 10~30 s, 加入体积增殖培养液终止消化。用枪头反复

吹打细胞悬液后, 1 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 弃上清液。细胞重悬后以 1:1 的比例传代, 换液每天 1 次, 倒置显微镜观察细胞的生长情况。

1.6 骨骼肌卫星细胞的诱导分化

取培养至第 2 代的细胞, 将体积增殖培养液更换为分化培养基进行诱导分化培养。倒置显微镜下观察骨骼肌卫星细胞及肌管生长及分化情况。

1.7 骨骼肌卫星细胞的免疫荧光染色鉴定

将细胞中培养基吸除, 每孔加入 250 μL 的 DPBS 清洗 2 次。用 4%的多聚甲醛固定细胞, 常温下孵育后, 用 DPBS 清洗细胞 3 次。每孔加入 250 μL 0.1%TritonX-100, 37°C 条件下孵育, 用 DPBS 清洗 4 次。1%BSA 在室温条件下孵育 1 h, 加入一抗, 4°C 条件下孵育过夜。用 DPBS 清洗 6 次, 加入二抗, 在 37°C 条件下孵育, 然后用 DPBS 清洗。制备适量的 Hoechst3342 溶液, 避光保存。每孔加入 250 μL, 避光、室温条件下在脱色摇床上孵育 30 min, 然后弃反应液, 每孔加入 250 μL 的 DPBS 清洗 3 次, 最后利用荧光显微镜拍照。

骨骼肌卫星细胞的 PCR 鉴定: 采用 OMEGA 总 RNA 提取试剂盒提取肌肉组织和细胞的总 RNA。反转录实验采用全式金的 EasyScript one-step gDNA Removal and cDNA Synthesis Super Mix 反转录试剂盒进行, 反转录体系包括 AnchAnchored Oligo(dT)₁₈ Primer (0.5 μg·μL⁻¹)/miR-27b、U6 茎环引物 1 μL、2×ES Reaction Mix 10 μL、gDNA Remover 1 μL、RNase-free Water to 20 μL 和 EasyScript RT/RI Enzyme Mix 1 μL, 完成了 cDNA 的合成。

表 1 引物设计
Table 1 Primer design

引物 Primer	序列 Sequence (5' → 3')
<i>Pax7</i>	Forward: AGCCGCACCACCTTCACA Reverse: TCTGGGCCAGTTCCTCCC

采用 TaKaRa 试剂盒, 进行 PCR 的扩增。反应体系包括 Premix *Taq* 25 μL、cDNA 2 μL、引物 1 μL、ddH₂O 22 μL。PCR 扩增条件: 94°C 预变性 3 min; 94°C 变性 30 s; 60°C 退火 30 s; 72°C 延伸 1 min; 共 30 个循环; 72°C 延伸 10 min; 4°C 保存。

PCR 扩增产物的检测: 首先制作 1%琼脂糖凝胶, 待凝胶冷却凝固后放入电泳槽中, 每孔加入 5 μL 的 PCR 产物, 同时加入 5 μL 的 DNA Marker DL2000 作为参照, 在电泳槽中电泳检测, 200 V 25 min, 于凝胶成像系统中观察结果并拍照。通过与 DNA Marker 的比对确认目的条带。

2 结果与分析

2.1 山羊骨骼肌卫星细胞的分离培养

刚分离出的原代山羊骨骼肌卫星细胞形态呈圆形，且折光性强。24 h 后开始贴壁生长，骨骼肌卫星细胞形态仍呈圆形。培养至 48 h，细胞缓慢增殖，骨骼肌卫星细胞未完全展开，但开始出现纺锤形或梭形。72 h 后大部分细胞为贴壁生长，细胞饱满，呈梭形或纺锤形，且折光性强，但此时贴壁细胞中含一定量的成纤维细胞，故需纯化。第 4 天换液，经过差速贴壁纯化，细胞纯度增加。第 2 代骨骼肌卫星生长状态良好，具有较为均一的生长方式和形态特点。

纯化至山羊骨骼肌卫星细胞贴壁生长到 70% 汇合后，体积增殖培养液更换为分化培养基，诱导山羊骨骼肌卫星细胞的形成。72 h 后，于光镜下能观察到肌管。在第 5 天后，开始出现大量肌管。肌管排列成束，且大部分肌管出现收缩跳动现象，说明分离出的山羊骨骼肌卫星细胞体外分化能力较好。

2.2 山羊骨骼肌卫星细胞的免疫荧光鉴定

对经体外培养的骨骼肌卫星细胞进行间接免疫

荧光鉴定。本次实验所选的骨骼肌特异性基因为 *Pax7*，并且进行 DAPI 染核。经免疫荧光染色的 *Pax7* 基因的免疫阳性产物分布于细胞质中，呈明显的亮绿色（图 2-A）。而 DAPI 染核的结果应为阴性，可以使细胞核核仁呈现蓝紫色（图 2-B）。因此，当免疫荧光染色和 DAPI 染核同时进行，细胞应表现为细胞质成亮绿色，细胞核成蓝紫色，与图 2-C 一致。结合实验过程中所观察到的形态学特点，说明所培养的细胞为安淮山羊骨骼肌卫星细胞，并且具有较高的细胞纯度，达到 90% 以上。

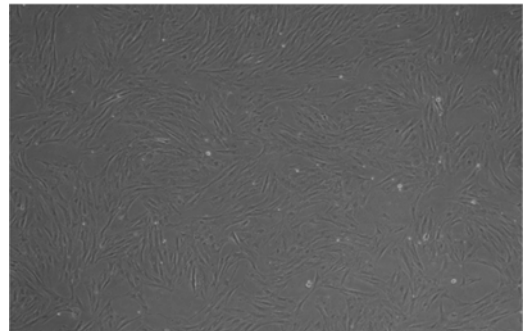
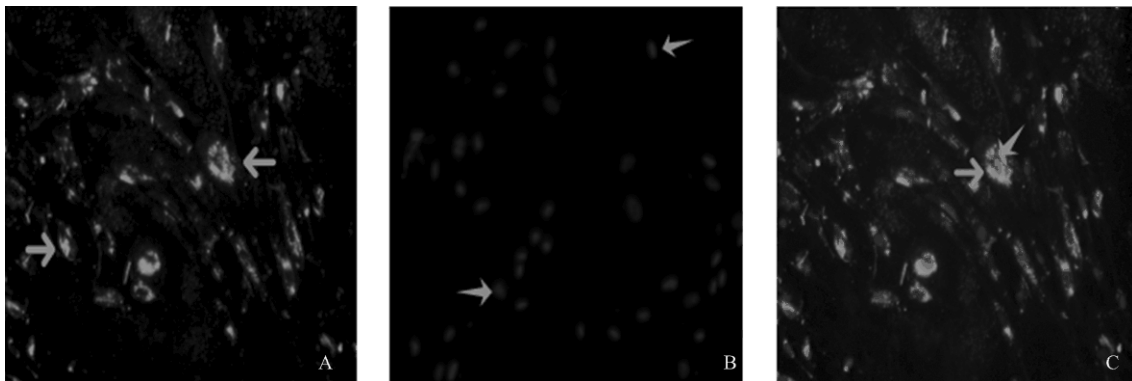


图 1 成肌诱导第 1 天的山羊骨骼肌卫星细胞图
Figure 1 The myoblast induced of goat muscle satellite cells on day 1



A. 表达 *Pax7* 基因结果；B. DAPI 染核结果；C. 同时表达 *Pax7* 和 DAPI 染核结果

A. The results of expressing *Pax7* genes; B. The results of DAPI nuclei staining; C. The results of expressing *Pax7* genes and DAPI nuclei staining

亮绿色的细胞质由图中的→代表。蓝紫色的细胞核由图中的→代表 Bright green cytoplasm from the figure are represented by →. Blue-purple nucleus from the figure re represented →

图 2 安淮山羊骨骼肌卫星细胞培养结果

Figure 2 The cultured Anhuai goat skeletal muscle satellite cells

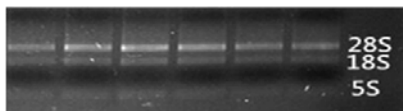


图 3 提取的 RNA 凝胶电泳

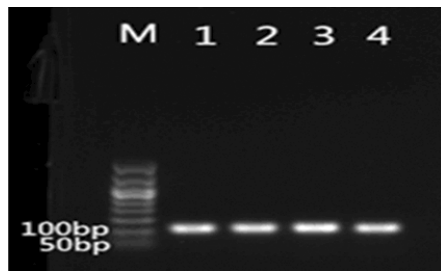
Figure 3 Electrophoresis of PCR product extraction of RNA

2.3 普通 PCR 技术对山羊骨骼肌卫星细胞的鉴定

通过对培养的山羊骨骼肌卫星细胞系提取总

RNA，经凝胶电泳发现，提取的总 RNA 出现 3 条带，说明所提取的总 RNA 完整性较好。并通过分光光度计检测，其 A_{260} / A_{280} 在 1.9~2.1 之间，说明 RNA 质量较好，可以进行下一步的实验。将提取的 RNA 用反转录试剂盒反转成 cDNA 后，根据设计的引物进行 PCR 扩增，然后通过琼脂糖凝胶电泳分析。实验结果发现，经凝胶电泳后，凝胶上出现明

亮的目的条带, 说明细胞中有 *Pax7* 的表达, 可以鉴定此细胞系为山羊骨骼肌卫星细胞系。



M:Marker DL2000,1、2、3 和 4 为 *Pax7* 基因条带

The band in lane 1,2,3 and 4 is *Pax7* gene

图 4 *Pax7* 基因 PCR 结果的凝胶电泳

Figure 4 Electrophoresis of PCR product of *Pax7* genes

3 讨论

3.1 骨骼肌卫星细胞分离及培养

骨骼肌卫星细胞在动物体幼龄时含量较高, 骨骼肌卫星细胞的数量和比例随着动物年龄增加而不断减少, 出生时最多^[11]。分离获得哺乳动物骨骼肌卫星细胞时, 实验动物日龄的长短及分离细胞的时机是分离出高质量骨骼肌卫星细胞的关键。骨骼肌卫星细胞的分离方法, 主要有组织块法和酶消化法, 其中酶消化分离法主要有胶原酶法和胰蛋白酶法等^[12]。分离纯化的手段除了差速贴壁法以外, 还有流式分选法和密度梯度离心法。流式分选法主要应用于人和小鼠的研究, 这种方法使用流式细胞仪来分离细胞, 细胞纯度可达 99%, 但实验仪器比较昂贵且容易受到污染^[13]。而密度梯度离心法虽然能够获得纯度高的细胞, 但由于多次离心可造成细胞的大量流失且对细胞活性有一定的影响, 使其应用值得商榷^[14]。本研究采用幼龄的安淮山羊分离骨骼肌卫星细胞, 利用胶原酶和胰酶联用的二步消化法, 并且结合差速贴壁法来分离细胞。两步消化法可以使细胞充分释放出来, 而差速贴壁法则可以去掉培养的细胞中夹杂的成纤维细胞, 起到纯化的作用, 获得的骨骼肌卫星细胞的纯度和存活率均比较适中, 且能正常增殖。

实际上, 骨骼肌卫星细胞培养难度较大。在培养过程中, 原代骨骼肌卫星细胞的贴壁能力比较差, 采用一般的塑料瓶或者玻璃瓶, 细胞往往不能贴壁生长而死亡。目前的培养方法主要是通过多聚赖氨酸等处理培养瓶来促进细胞贴壁^[15]。骨骼肌卫星细胞的培养对条件要求较高, 须要在培养基中加入胎牛血清来促进细胞生长, 否则增值速度慢且易老化。所以在本实验中经摸索, 采用含 80%DMEM/

F12+10%胎牛血清(FBS)+10%马血清的体积增殖培养液效果较好。另外, 在成肌诱导分化过程中, 要注意采用适当的细胞培养密度和简单可行的培养方法。

3.2 骨骼肌卫星细胞鉴定方法

Pax 基因家族为一组编码含成对结构域转录因子的发育调控基因, 其中 *Pax7* 与中枢神经系统和骨骼肌的发育有关, 能使多能干细胞转变为生肌性细胞, 对骨骼肌的发育和再生有着重要作用^[16]。免疫荧光染色的本质是抗原抗体反应, 是一种将抗原抗体相结合并且与形态学相联系的方法。该方法具有特异性强、灵敏度高和检测速度较快的特点, 是近代免疫学中较为常见的使用方法, 但其操作步骤比较复杂^[17]。本次实验采用免疫荧光鉴定的方法来检测所培养细胞中 *Pax7* 的表达情况, 实验结果表明所培养的细胞为山羊骨骼肌卫星细胞。事实上, 骨骼肌卫星细胞中除了 *Pax7* 以外, 还含有 *Desmin*、*MyoD* 等特异性基因, 这些特异性基因均可以对骨骼肌卫星细胞进行鉴定^[18]。

除此之外, 还可以采用 PCR(聚合酶链式反应)的方法来进行骨骼肌卫星细胞的鉴定。PCR 是一种体外酶促合成, 用来扩增特定 DNA 片段的方法, 其原理是根据待扩增的已知 DNA 片段序列, 通过人工合成与该 DNA 2 条链互补的 2 段引物, 在体外将待检的 DNA 模板在酶促作用下进行扩增^[19]。因其准确性好及检测速度快等优点而被广泛应用于许多领域, 比如法医学和遗传病等方面。同时, 在许多疾病的诊断研究方面, 特别在肿瘤的早期诊断以及癌基因与肿瘤的关系方面, 有着广阔的前景^[20]。PCR 技术有很多类型, 本次实验则采用普通 PCR 的方法, 利用从所培养的细胞中提取 *Pax7* 基因, 根据 PCR 技术原理, 在体外进行总 RNA 的提取, cRNA 的合成、PCR 的扩增以及 PCR 产物的检测与测序等实验方法进行骨骼肌卫星细胞的鉴定。在实验操作过程中, 应该注意掌握具体的操作细节, 如温度的设定、循环的次数等, 避免误差, 减少实验次数。

4 结论

本实验成功分离出山羊的骨骼肌卫星细胞并对其进行了鉴定。建立了山羊骨骼肌卫星细胞分离、培养和鉴定的方法, 通过免疫荧光染色以及 PCR 的鉴定成功建立山羊骨骼肌卫星细胞系, 可为肌肉疾病等方面的组织工程及基因治疗的研究及提供良好的细胞模型。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 秦子来, 朱卫雄, 徐刚, 等. 骨骼肌卫星细胞的体外培养[J]. 武汉大学学报(医学版), 2007, 28(4): 492-495.
- [3] REHFELDT C, FIEDLER I, DIETL G, et al. Myogenesis and postnatal skeletal muscle cell growth as influenced by selection [J]. Livest Prod Sci, 2000, 66(2): 177-188
- [4] KOH G Y, KIM S J, KLUG M G, et al. Targeted expression of transforming growth factor-beta 1 in intracardiac grafts promotes vascular endothelial cell DNA synthesis [J]. J Clin Invest, 1995, 95(1): 114-121.
- [5] 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): 110-112.
- [6] 李伯江, 李平华, 吴望军, 等. 骨骼肌纤维形成机制的研究进展[J]. 中国农业科学, 2014, 47(6): 1200-1207.
- [7] 兴孝友, 佟慧丽, 李树峰, 等. 牛骨骼肌卫星细胞的分离培养及诱导分化方法的建立[J]. 黑龙江兽医学报(科技版), 2012, 6(11): 10.
- [8] MAURO A. Satellite cell of skeletal muscle fibers [J]. J Biophys Biochem Cytol, 1961, 9: 493-495.
- [9] 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.
- [10] 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, 21(1): 1-4.
- [11] CARDASIS C A, COOPER G W. An analysis of nuclear numbers in individual muscle fibers during differentiation and growth: a satellite cell-muscle fiber growth unit [J]. J EXP ZOOL, 1975, 191(3): 347-357.
- [12] 何玉龙, 吴月红, 权富生, 等. 秦川牛胎儿骨骼肌卫星细胞的分离培养[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2012, 40(6): 1-6.
- [13] 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.
- [14] 肖仕辉, 韦庆军, 赵劲民, 等. 全骨髓贴壁法培养兔骨髓间充质干细胞体外定向成骨诱导分化及鉴定[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(6): 1069-1074.
- [15] 韩添翼. 一次力竭性离心运动及恢复期间大鼠骨骼肌超微结构及机械生长因子(MGF)的变化[D]. 扬州: 扬州大学, 2012.
- [16] 许之娟. 恒定性外斜视弱侧眼外肌形态改变及 MyoD、Pax7 表达研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2011.
- [17] 王海燕. 肾脏病学[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1996.
- [18] 张海军, 陈宏, 房兴堂, 等. 山羊 MyoD 基因家族多态性及与体尺性状的相关性[J]. 遗传, 2007, 29(9): 1077-1082.
- [19] 梁青, 董恩妮, 张红平. 骨骼肌卫星细胞体外培养方法与技术[J]. 中国畜牧杂志, 2014, 50(1): 89-93.
- [20] 周晓丽, 朱国坡, 李雪华, 等. 实时荧光定量 PCR 技术原理与应用[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(2): 87-89.