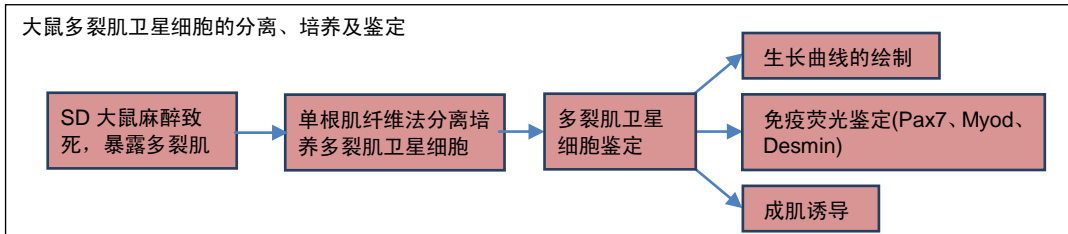


单根肌纤维法分离培养多裂肌卫星细胞及鉴定

刘通¹, 于佳妮², 陈玉佩³, 陈欢⁴, 邹德辉³, 晏珺³, 卢宗孝³, 刘悦¹, 张莉³, 霍则军⁵ (1广东省第二中医院针灸康复科, 广东省广州市 510095; 2广东省中医院康复科, 广东省广州市 510120; 3北京中医药大学针灸推拿学院, 北京市 100029; 4江苏省人民医院针灸科, 江苏省南京市 210000; 5北京大学第三医院中医科, 北京市 100191)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0941 ORCID: 0000-0002-5185-2188(刘通)

文章快速阅读:



刘通, 男, 1987年生, 山东省莱芜市人, 汉族, 2016年北京中医药大学毕业, 博士, 医师, 主要从事针灸临床机理研究。

通讯作者: 张莉, 博士, 主任医师、教授, 北京中医药大学针灸推拿学院, 北京市 100029

中图分类号:R394.2

文献标识码:B

稿件接受: 2018-05-15



文题释义:

多裂肌: 多裂肌位于脊柱最内侧, 是附着面积最大的椎旁肌, 由多束组成, 起于腰椎横突, 斜行向上, 止于上位椎体的棘突, 对维持腰椎的稳定性极为重要。其中, 浅层多裂肌主要控制脊柱的屈曲和定向活动, 深层多裂肌主要控制节段间的运动。

肌卫星细胞: 骨骼肌干细胞, 是一系列未分化的单核细胞, 位于肌原纤维基膜与基底膜之间, 生理情况下, 肌卫星细胞通常处于静止状态, 一旦细胞的基膜遭到破坏, 肌卫星细胞便开始活跃、增殖、分化、融合成为新生的肌纤维。

摘要

背景: 多裂肌的损伤、萎缩是临床各种腰背痛及功能障碍的主要来源之一, 肌卫星细胞是肌肉干细胞, 对肌肉的损伤修复起至关重要的作用。但目前尚缺少有关多裂肌卫星细胞分离培养方面的研究。

目的: 采用单根肌纤维法分离大鼠多裂肌卫星细胞并进行鉴定。

方法: 在体分离大鼠多裂肌, 采用单根肌纤维法获得多裂肌卫星细胞, 经反复差速贴壁法纯化, 观察其形态变化并绘制细胞增殖曲线; 以分化培养基进行诱导, 观察其成肌分化情况; 并采用免疫荧光法鉴定多裂肌卫星细胞标志蛋白 Pax7、Myod、Desmin 的表达。

结果与结论: ①单根多裂肌纤维经培养 72 h 后, 可见肌纤维周围有大量长梭形或纺锤形细胞贴壁; ②采用差速贴壁法纯化后, 可见原代细胞呈圆形, 高折光性, 重新接种后 24-48 h 可贴壁, 其生长呈“S”型; ③以分化培养基诱导可出现较大肌管; ④免疫荧光鉴定可见 Pax7、Myod 在肌卫星细胞的细胞核中为阳性反应, Desmin 在细胞质中为阳性反应; ⑤结果表明, 单根肌纤维法可成功分离大鼠多裂肌卫星细胞, 可用于未来多裂肌再生修复方面的研究。

关键词:

单根肌纤维; 多裂肌; 肌卫星细胞; 分离; 培养; 鉴定; Pax7; Myod; Desmin; 损伤修复; 国家自然科学基金

主题词:

卫星细胞; 骨骼肌; 肌肉纤维; 骨骼; 细胞分离; 组织工程

基金资助:

国家自然科学基金青年基金(81704179, 81503641); 国家自然科学基金面上项目(81574052)

Isolation and culture of multifidus satellite cells by single muscle fiber method

Liu Tong¹, Yu Jia-ni², Chen Yu-pei³, Chen Huan⁴, Zou De-hui³, Yan Jun³, Lu Zong-xiao³, Liu Yue¹, Zhang Li³, Huo Ze-jun⁴ (1Department of Acupuncture and Rehabilitation, Guangdong Second Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510095, Guangdong Province, China; 2Department of Rehabilitation, Guangdong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China; 3School of Acu-moxibustion and Tuina, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 4Department of Acupuncture and Moxibustion, Jiangsu Province Hospital, Nanjing 210000, Jiangsu Province, China; 5Department of Chinese Medicine, Peking University 3rd Hospital, Beijing 100191, China)

Abstract

BACKGROUND: Atrophy and damage of multifidus muscles mainly result in various low back pains and dysfunctions. Muscle satellite cells, which belong to muscle stem cells, play an important role for muscle regeneration after injury. However, little is reported on the isolation and culture of multifidus muscle up to now.

OBJECTIVE: To isolate and identify multifidus satellite cells of rats using single muscle fiber method.

Liu Tong, M.D., Physician, Department of Acupuncture and Rehabilitation, Guangdong Second Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510095, Guangdong Province, China

Corresponding author: Zhang Li, M.D., Chief physician, Professor, School of Acu-moxibustion and Tuina, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China

METHODS: Multifidus muscles were isolated *in vivo* and multifidus satellite cells were obtained by single muscle fiber method. Then the cells were purified by repeated differential attachment. Morphological changes of the cells were observed and the proliferation curve was made thereafter. Moreover, myogenic differentiation of the isolated cells cultured in differentiation medium was analyzed and marker proteins of multifidus satellite cells (Pax7, Myod, Desmin) were characterized by immunofluorescence.

RESULTS AND CONCLUSION: A large number of fusiform or spindle cells were seen around the muscle fibers after 72 hours of culture. Round cells with high refraction were visible after being purified by repeated differential attachment, and the cells adhered after 24–48 hours of re-inoculation exhibited an “S” shaped growth curve. Large myotubes formed in the differentiation medium. Immunofluorescence findings showed that Pax7 and Myod were positively expressed in muscle satellite cell nuclei, while Desmin was positively expressed in the cytoplasm. These findings reveal that multifidus satellite cells can be successfully separated by single muscle fiber method, which can be used for regeneration of multifidus muscles in the future.

Subject headings: Satellite Cells, Skeletal Muscle; Muscle Fibers, Skeletal; Cell Separation; Tissue Engineering

Funding: the National Natural Science Foundation of China for the Youth, No. 81704179, 81503641; the General Project of the National Natural Science Foundation of China, No. 81574052

0 引言 Introduction

多裂肌位于脊柱最内侧, 是附着面积最大的椎旁肌, 由多束组成, 在腰部比较发达, 对维持腰椎的稳定性尤为重要。目前, 已有大量研究证实多裂肌的损伤、萎缩及功能紊乱可引发各种急慢性腰痛^[1-4]。此外, 在目前流行的脊椎后路手术过程中, 术中对照旁多裂肌的过度牵拉或钝性损伤往往导致多裂肌炎性肿胀、坏死、萎缩, 成为患者再发腰背痛和功能障碍的新来源^[5-6]。因此, 进一步研究多裂肌损伤后的再生修复有重要临床意义。

肌卫星细胞属于肌肉干细胞, 是具有增殖和自我更新能力的成肌前体细胞, 是骨骼肌再生能力的重要保障。1961年, Alexander Mauro首先在青蛙的骨骼肌肌细胞膜和基底膜之间发现了肌卫星细胞^[7]。生理情况下, 肌卫星细胞通常处于静止状态, 一旦细胞的基膜遭到破坏, 肌卫星细胞便开始活跃、增殖、分化、融合成为新生的肌纤维^[8]。

肌卫星细胞的分离与培养不仅为体外研究肌肉相关疾病, 如肌肉的损伤修复、肌肉再生能力缺陷等提供平台, 对干细胞的移植也有重要意义。目前为止, 分离肌卫星细胞的方法有多种, 如酶消化法、组织块法、单根肌纤维法等, 组织块法需将肌肉组织剪碎成1 mm³或更小的碎块, 操作起来比较耗时间, 容易造成污染; 酶消化法需用多种酶共同作用, 容易造成对细胞的损伤^[9]。基于肌卫星细胞的自发迁移特性, Bekoff和Betz于1977年首次提出了单根肌纤维的分离和培养, 后来, 单根肌纤维法开始广泛用于肌卫星细胞的分离, 这种方法便于观察肌卫星细胞静止、迁移、增殖、分化的全过程^[10-12]。基于此, 课题组采用单根肌纤维法, 成功从大鼠多裂肌中分离出肌卫星细胞, 为下一步研究多裂肌的损伤修复奠定基础。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学体外观察实验。

1.2 时间及地点 于2015年11月至2016年3月在北京中医药大学实验室完成。

1.3 材料

实验动物: SPF级雄性SD大鼠1只, 4周龄, 体质量约120 g。购买于北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证编号: SCXK(京)2012-0001。动物的使用符合科技部《关

于善待实验动物的指导性意见》相关规定。

实验用主要试剂及仪器: DMEM高糖培养基, 马血清(美国Gibco公司); 胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司); I型胶原酶(北京金博益生物技术有限公司); 0.25%含EDTA胰蛋白酶, 40 g/L多聚甲醛(北京索莱宝科技有限公司); GELATIN明胶(美国Amresco公司); 0.1% Triton X-100(北京鼎国生物技术有限公司); 封闭用羊血清、FITC标记羊抗兔IgG、FITC标记羊抗小鼠IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司); 兔来源Pax7、小鼠来源Myod、兔来源Desmin抗体(英国abcam公司); FITC标记羊抗小鼠IgG(武汉博士德生物工程有限公司); DAPI染色液(北京碧云天生物技术有限公司); CO₂培养箱(德国BINDER公司); 超净工作台(ESCO, 型号: SAE-4AI); 倒置式荧光显微镜(德国蔡司公司)。

实验主要试剂的配制: 体积分数0.1% I型胶原酶的配制: 用电子天平称量10 mg I型胶原酶粉末, 溶于10 mL DMEM培养基, 混匀后, 无菌条件下用0.22 μm滤膜过滤, 4 °C保存; GELATIN明胶的配制: 购买的GELATIN明胶为粉末状, 取0.1 g明胶溶解于100 mL PBS溶液中, 50–65 °C水溶20 min, 无菌条件下通过0.22 μm滤膜过滤, 分装4 °C保存备用; 完全培养基的配制: 超净工作台内取10 mL胎牛血清溶于90 mL DMEM培养基, 配置含体积分数10%胎牛血清的生长培养基, 4 °C保存; 分化培养基的配制: 超净工作台内取1 mL马血清溶于50 mL DMEM培养基中, 加入10 μmol/L 胰岛素类生长因子1, 配制成含体积分数2%马血清的分化培养基, 4 °C保存。

1.4 方法

1.4.1 单根多裂肌纤维的分离 取大鼠1只, 将大鼠腰背部毛发剪净, 以过量10%水合氯醛麻醉致死, 从L₆部位剪开皮肤, 层层剥离竖脊肌, 直至找到多裂肌(图1), 选取其中两三条较明显的多裂肌, 尽量将整条肌肉从肌腱到肌腱取下, PBS冲洗3次, 以去除可能夹杂的脂肪组织、血液等, 立即将肌肉放入37 °C预温的含有4 mL体积分数 0.1% I型胶原酶的试管中, 放回培养箱, 消化90 min, 期间每隔15 min摇动1次, 以促进肌纤维的分离。在显微镜下观察, 当肌肉呈肿胀状态并有发丝样纤维发出时, 终止消化。将肌肉从试管中取出, 放入含有预温DMEM培养基的培养皿



图1 暴露的腰段多裂肌
Figure 1 Exposed lumbar multifidus
图注: 箭头所示为分离出的腰段多裂肌。

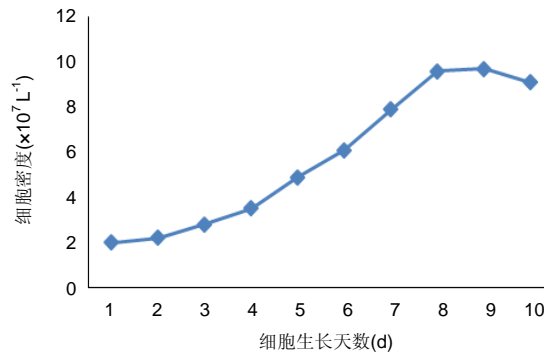


图3 肌卫星细胞生长曲线
Figure 3 Growth curve of muscle satellite cells
图注: 肌卫星细胞呈“S”型生长, 在接种后 24-48 h 内, 生长并不明显; 48 h 后, 细胞即开始迅速增殖; 在第 8 天左右细胞生长达最佳状态。

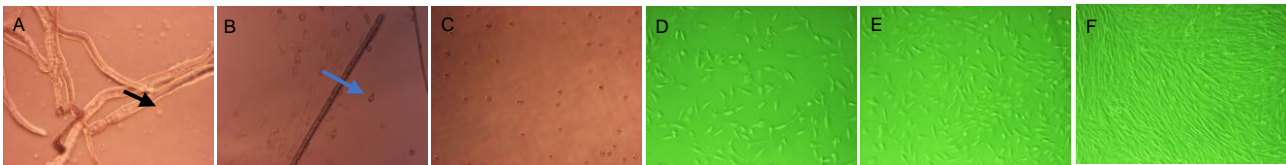


图2 单根多裂肌纤维及肌卫星细胞的分离与培养
Figure 2 Isolation and culture of multifidus satellite cells by single muscle fiber method
图注: 图中 A 为吹打后的单根肌纤维($\times 10$), 黑色箭头示单个肌卫星细胞; B 为从单根肌纤维游离出的肌卫星细胞, 蓝色箭头示肌卫星细胞($\times 5$); C 为消化后, 显微镜下观察, 细胞呈圆形, 高折光性($\times 5$); D 为重新接种后 12 h 肌卫星细胞开始贴壁($\times 5$); E 为处于增殖过程中的肌卫星细胞($\times 5$); F 为肌卫星细胞呈方向性排列并开始出现成肌融合($\times 5$)。



图4 成肌诱导形成较大肌管($\times 10$)
Figure 4 Formation of large myotubes after myogenic induction ($\times 10$)
图注: 图 A-C 为肌卫星细胞经成肌诱导 24 h, 可相互融合形成大小不等的肌管, 箭头所示为形成的肌管。

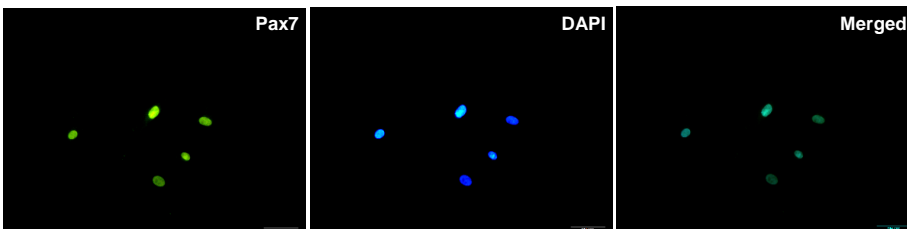


图5 Pax7 的免疫荧光鉴定
Figure 5 Immunofluorescence identification of Pax7
图注: Pax7 抗体在肌卫星细胞细胞核中呈阳性反应(黄绿色), 标尺: 50 μm 。

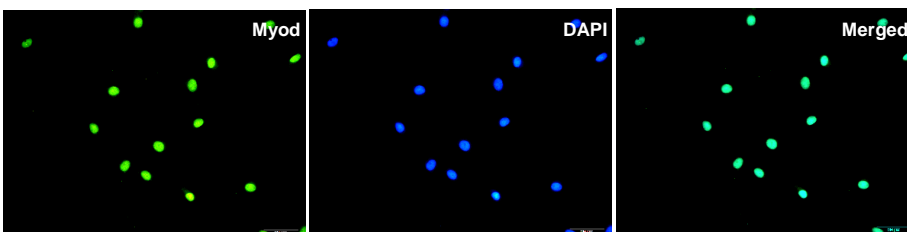


图6 Myod 的免疫荧光鉴定
Figure 6 Immunofluorescence identification of Myod
图注: Myod 抗体在肌卫星细胞细胞核中呈阳性反应(黄绿色), 标尺: 50 μm 。

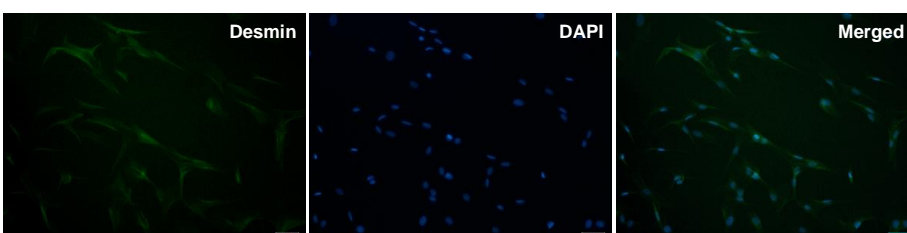


图7 Desmin 的免疫荧光鉴定
Figure 7 Immunofluorescence identification of Desmin
图注: Desmin 抗体在肌卫星细胞细胞质中呈阳性反应(黄绿色), 标尺: 50 μm 。

中漂洗1次, 转入另一含有预温的DMEM培养皿中, 用10 mL注射器反复吹打, 将肌肉尽量吹打成单根肌纤维, 吹打时尽量不要产生气泡。吸取大约100根完整未受损的肌纤维(每次吸取肌纤维时, 均需依次在3个盛有DMEM培养基的培养皿中漂洗, 以尽可能去除混入的肌肉碎片及肌腱组织, 共漂洗3次), 移入含有生长培养基的25 mm²培养瓶中, 放入培养箱中, 体积分数5%CO₂、37 °C培养72 h, 期间尽量不要晃动培养瓶。

1.4.2 多裂肌卫星细胞的培养 72 h后, 取出培养瓶, 显微镜下观察肌纤维周边细胞生长情况, 若有大量细胞贴壁, 则将肌纤维取出, 吸出培养基, 以PBS清洗培养瓶两三次。加入含EDTA的0.25%胰蛋白酶500 μL, 消化两分钟, 显微镜下观察细胞变成圆形时, 加入5 mL生长培养基终止消化, 用1 mL移液枪轻轻吹打细胞, 使紧贴在细胞分离, 制备单个细胞悬液。将细胞悬液移入另一培养瓶中, 放回培养箱培养1 h, 以去除容易贴壁的成纤维细胞(前3次传代均差速贴壁1 h, 尽可能去除成纤维细胞)。1 h后, 将细胞悬液移入另一预先用体积分数0.1%明胶包被的培养瓶中, 继续培养, 以后每2 d换液1次, 七八天传代1次。

1.4.3 多裂肌卫星细胞生长曲线的测定 取第3代多裂肌卫星细胞, 胰蛋白酶消化后, 吹打均匀, 以2×10⁴个/孔的密度接种于96孔板, 放回培养箱培养。每天取3孔细胞进行计数, 取平均值, 连续计数10 d。根据计数结果绘制细胞生长曲线。

1.4.4 多裂肌卫星细胞的成肌诱导 以含10 μmol/L胰岛素类生长因子1的体积分数2%马血清成肌诱导24 h, 显微镜下观察肌卫星细胞分化情况。

1.4.5 多裂肌卫星细胞的免疫荧光鉴定 在增殖、分化的不同阶段, 肌卫星细胞所表达的抗体标志物不同。增殖期Pax7、Myod多为阳性表达, 肌源性标志物结蛋白(Desmin)是成肌分化的早期标志。

增殖期肌卫星细胞中Pax7、Myod鉴定: 取第3代肌卫星细胞, 以2×10⁴个/孔的密度接种于12孔板, 待细胞贴壁。继续培养24 h, 倒去培养液, PBS漂洗3次×5 min。以40 g/L多聚甲醛固定30 min。0.5%Triton X-100破膜15 min。山羊血清室温封固2 h。滴加一抗(兔来源Pax7: 1:200; 小鼠来源Myod: 1:200), 覆盖孔板底面, 4 °C过夜。吸出一抗, PBS漂洗3次×5 min, 分别滴加FITC标记荧光羊抗兔二抗(1:50)、羊抗小鼠二抗(1:50), 避光置2 h。吸出二抗, 滴加DAPI染色液, 避光置30 min。弃DAPI染色液, PBS漂洗3次×5 min。于倒置荧光显微镜下观察染色情况并拍照。

分化初期肌卫星细胞中Desmin鉴定: 取第3代肌卫星细胞, 以2×10⁴个/孔的密度接种于12孔板, 待细胞贴壁。继续培养72 h, 更换为分化培养基, 继续培养24 h。倒去培养液, PBS漂洗3次×5 min。以40 g/L多聚甲醛固定30 min。0.5%Triton X-100破膜15 min。山羊血清室温封固2 h。滴

加一抗(兔来源Desmin: 1:50), 覆盖孔板底面, 4 °C过夜。吸出一抗, PBS漂洗3次×5 min, 滴加FITC标记荧光羊抗兔二抗(1:50), 避光置2 h。吸出二抗, 滴加DAPI染色液, 避光置30 min。弃DAPI染色液, PBS漂洗3次×5 min。于倒置荧光显微镜下观察染色情况并拍照。

在荧光倒置显微镜下观察, 于100倍数下随机选取5个视野, 对Pax7、MyoD、Desmin阳性细胞和细胞总数(DAPI⁺)进行计数。Pax7阳性率=Pax7阳性细胞数/细胞总数(DAPI⁺)×100%; MyoD阳性率=MyoD阳性细胞数/细胞总数(DAPI⁺)×100%; Desmin阳性率=Desmin阳性细胞数/细胞总数(DAPI⁺)×100%。

1.5 主要观察指标 多裂肌卫星细胞细胞形态、数量、诱导分化情况及主要标志蛋白的免疫荧光染色。

2 结果 Results

2.1 单根多裂肌纤维及肌卫星细胞的分离 倒置显微镜下观察, 可看到清晰的单根肌纤维(图2A), 肌纤维上可隐约看到单个肌卫星细胞(黑色箭头处)。72 h后, 取出培养瓶, 显微镜下观察, 可见单根肌纤维周围已有大量长梭形或纺锤形细胞贴壁, 大部分细胞成长轴排列, 方向性较明显(图2B)。此时, 所得细胞中可能混有一定的成纤维细胞, 需用差速贴壁法去除。原代细胞经消化后, 显微镜下观察, 细胞呈圆形, 高折光性(图2C)。重新接种后12 h, 细胞大部分已经贴壁, 伸展为长梭形或纺锤形(图2D), 接种后3 d, 细胞明显增殖(图2E), 接种后5 d, 肌卫星细胞开始出现方向性排列, 接种后8 d, 肌卫星细胞方向性更加明显, 并且有多核肌管形成(图2F)。

2.2 肌卫星细胞生长曲线测定 原代培养的肌卫星细胞呈“S”型生长, 在接种后24-48 h内, 细胞处于潜伏期, 生长并不明显; 48 h后, 细胞即开始迅速增殖, 进入指数增殖期; 约在第8天细胞生长达最佳状态, 生长进入平台期; 此后, 由于细胞与细胞之间的相互接触, 细胞的生长开始受到抑制, 若不及时传代, 可出现细胞的成肌分化与衰老凋亡(图3)。

2.3 肌卫星细胞的成肌诱导 以含10 μmol/L胰岛素类生长因子1的体积分数2%马血清成肌诱导后, 可出现较大肌管(图4)。

2.4 肌卫星细胞的免疫荧光鉴定 免疫荧光结果显示, Pax7(图5)、MyoD(图6)在肌卫星细胞增殖过程中呈阳性反应, 分化初期Desmin(图7)在细胞质中呈阳性反应; 经计数, 3种抗体的阳性细胞率均在95%以上。

3 讨论 Discussion

3.1 肌卫星细胞的分离与培养 目前, 肌卫星细胞的分离方法有多种, 如酶消化法、组织块法、单根肌纤维法等。由于肌卫星细胞存在于骨骼肌基膜与基底膜之间, 彼此之间联系紧密, 能抵抗一般消化酶的作用, 因而酶消化法一

般采用两步法,即分别用胶原酶和链霉菌蛋白酶对肌肉进行消化分解,再吹打释放肌卫星细胞,该法步骤多,消耗时间长,且酶消化的时间不易把握,容易产生污染。组织块法虽然步骤较少,操作简单,但容易混杂杂质细胞,肌卫星细胞产量偏低。因此,目前大量的国内外研究多采用单根肌纤维法分离培养肌卫星细胞,但目前研究多采用胫骨前肌、趾长伸肌、趾短屈肌、竖脊肌等作为分离肌肉,有关多裂肌卫星细胞的分离培养尚无相关报道^[13-15]。

当前实验通过后路层层剥离竖脊肌的方法暴露多裂肌,后采用单根肌纤维法成功分离出多裂肌卫星细胞,分离出的细胞呈圆形,高折光性,重新接种后12 h,细胞大部分可贴壁,伸展为长梭形或纺锤形,接种后3 d,细胞明显增殖,接种后5 d,肌卫星细胞开始出现方向性排列,接种后8 d,肌卫星细胞方向性更加明显,并且有多核肌管形成。这些特点与文献报道的肌卫星细胞特性基本相同^[16-17]。从细胞生长周期来说,细胞初期处于适应阶段,生长缓慢,然后过渡到对数期,最后达到平台期。增殖曲线提示刚接种后,细胞处于潜伏期,生长并不明显;48 h后,细胞即开始进入指数增殖期;约在第8天细胞生长进入平台期。鉴于有研究指出,不同年龄、不同部位肌肉的肌卫星细胞特性存在异质性,课题组下一步将进一步探讨多裂肌卫星细胞与其他部位肌肉肌卫星细胞在增殖及分化能力等方面的差异^[18-19]。

3.2 肌卫星细胞的纯化 从肌肉组织分离出细胞后,细胞纯化是关乎细胞纯度的关键步骤,基于结缔组织、筋膜及肌肉局部血管、神经等的干扰,所分离出的细胞中不可避免的可能会掺杂一些其他细胞,如成纤维细胞、血管内皮细胞、神经细胞、甚至红细胞等,其中成纤维细胞是最主要的混杂细胞。因此,通过一定的方法和技术去除混杂细胞,以求得到较高纯度的肌卫星细胞是非常必要的。目前,可供选用的方法很多,如差速离心、免疫磁珠分选术等^[20-21]。然而,尽管离心可以将部分混杂细胞分离,但是不适当的离心力会对肌卫星细胞造成一定的伤害,降低肌卫星细胞的产率。通过免疫荧光染色或者单克隆抗体标记的方法可以得到较高纯度的肌卫星细胞,然而,这种方法代价较高,大部分实验室由于仪器设备和实验室条件的限制,并不能顺利开展。基于成纤维细胞贴壁迅速、肌卫星细胞贴壁缓慢的特点,实验通过反复差速贴壁离心法,尽可能的去除杂质细胞,计数结果显示肌卫星细胞的纯度在95%以上,显著提高了肌卫星细胞的纯度。

3.3 肌卫星细胞的鉴定 目前,已发现多种肌肉特异性蛋白,这些蛋白的表达可以作为肌卫星细胞鉴定的标志,如Pax7、M-钙黏蛋白、Myod、Desmin、Cxcr4、syndecan3/4、c-met等^[22]。其中,Pax7和Myod是用于鉴定肌卫星细胞最常用的标志蛋白。Pax7基因是肌卫星细胞的标志基因,在肌卫星细胞静止和增殖过程中均有表达^[23]。Myod作为bHLH转录因子家族的一员,在肌肉再生过程中对于肌卫星

细胞向肌细胞的特异性分化有决定性的趋向引导作用,同时,Myod在非肌肉细胞内的特异性表达可以引导细胞出现成肌特性^[24-25]。Desmin是一种结构蛋白,属于存在于肌节Z线附近的III型中间纤维,为肌纤维所特有,对细胞质和收缩蛋白起到支持和固定的作用,主要在分化初期表达,也可作为鉴定肌卫星细胞的标志^[26]。实验发现分离出的细胞中Pax7、Myod、Desmin均为阳性反应,提示分离出的干细胞为肌卫星细胞。然而,当前实验未进行肌卫星细胞增殖分化过程中相关蛋白的Western blot定量检测,下一步课题组将进一步完善该部分内容,以进一步揭示肌卫星细胞具体的增殖分化规律。

3.4 肌卫星细胞的成肌诱导 成肌分化是骨骼肌肌卫星细胞的特性之一,以往研究多采用体积分数2%马血清来诱导,但是低血清浓度的培养基缺乏肌卫星细胞生长的必需物质,因此诱导效率不高,且分化晚期容易漂浮^[27]。近来,有研究发现,胰岛素类生长因子1可以通过PI3K-Akt信号通路抑制肌生成抑制蛋白的活性,促进成肌分化^[28]。因此实验在体积分数2%马血清的基础上,加用胰岛素类生长因子1作为分化培养基,提高了诱导效率。而亦有研究使用高糖DMEM+体积分数2%马血清+5%青霉素/链霉素+1%两性霉素B作为分化培养液的效果较好,以后可进行相关的对比实验,以进一步优化分化培养基的选择^[29]。

综上,实验采用单根多裂肌纤维法成功分离出细胞,并采用免疫荧光法鉴定肌卫星细胞特异性标志蛋白的表达,以分化培养基成功诱导细胞分化为肌管,表明实验分离出的细胞为肌卫星细胞。实验成功应用单根肌纤维法完成了大鼠多裂肌卫星细胞的分离、纯化、培养和鉴定,为以后进一步研究多裂肌的损伤修复奠定了基础。

作者贡献: 实验设计为张莉、霍则军,实验实施为刘通、于佳妮、陈玉佩,资料收集为邹德辉、晏璐、卢宗孝,成文为刘通,文章审校为陈欢、刘悦、张莉。

经费支持: 该文章接受了“国家自然科学基金青年基金(81704179, 81503641)”、“国家自然科学基金面上项目(81574052)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

伦理问题: 实验方案经广东省第二中医院动物实验伦理委员会批准。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在水合氯醛麻醉下进行所有的手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。文章的撰写与编辑修改后文章遵守了《动物实验体内实验研究报告规范指南》(ARRIVE指南)。

文章查重: 文章出版前已经过CNKI反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审,符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者和通讯作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁,可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关

协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享3.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Shahidi B, Hubbard JC, Gibbons MC, et al. Lumbar multifidus muscle degenerates in individuals with chronic degenerative lumbar spine pathology. *J Orthop Res.* 2017;35(12): 2700-2706.
- [2] Hildebrandt M, Fankhauser G, Meichtry A, et al. Correlation between lumbar dysfunction and fat infiltration in lumbar multifidus muscles in patients with low back pain. *BMC Musculoskelet Disord.* 2017; 18(1):e92-92.
- [3] Ogon I, Takebayashi T, Takashima H, et al. Magnetic resonance spectroscopic analysis of multifidus muscles lipid content and association with spino-pelvic malalignment in chronic low back pain. *Br J Radiol.* 2017;90(1073):20160753.
- [4] Wangprice S, Zafereo J, Brizzolara K, et al. Effects of different verbal instructions on change of lumbar multifidus muscle thickness in asymptomatic adults and in patients with low back pain. *J Man Manip Ther.* 2016; 25(1):22-29.
- [5] Hu ZJ, Zhang JF, Xu WB, et al. Effect of pure muscle retraction on multifidus injury and atrophy after posterior lumbar spine surgery with 24 weeks observation in a rabbit model. *Eur Spine J.* 2017;26(1):210-220.
- [6] Pourtaheri S, Issa K, Lord E, et al. *Orthopedics.* 2016;39(2): e209-214.
- [7] Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol.* 1961; 9(2):493-495.
- [8] Morgan J, Luisa B. Satellite cells and skeletal muscle regeneration. *Compr Physiol.* 2015;5(3):1027.
- [9] Bekoff A, Betz W. Properties of isolated adult rat muscle fibres maintained in tissue culture. *J Physiol.* 1977; 271(2): 537-547.
- [10] Di FV, Robson L. Isolation of satellite cells from single muscle fibers from young, aged, or dystrophic muscles. *Methods Mol Biol.* 2012;916(916):3.
- [11] Pasut A, Jones AE, Rudnicki MA. Isolation and culture of individual myofibers and their satellite cells from adult skeletal muscle. *J Vis Exp.* 2013;22(73):e50074-50074.
- [12] Moyle LA, Zammit PS. Isolation, Culture and Immunostaining of skeletal muscle fibres to study myogenic progression in satellite cells. *Stem Cells Int.* 2014;6:63-78.
- [13] Yang J, Liu H, Wang K, et al. Isolation, culture and biological characteristics of multipotent porcine skeletal muscle satellite cells. *Cell Tissue Bank.* 2017;18(4):1-13.
- [14] Brun C E, Wang Y X, Rudnicki M A. Single EDL Myofiber Isolation for Analyses of Quiescent and Activated Muscle Stem Cells. *Methods Mol Biol.* 2018;1686:149-159.
- [15] 徐义明,白跃宏,俞红.腰痛患者肌卫星细胞生物学特性及其鉴定[J].中国康复医学杂志,2009, 24(8):734-736.
- [16] 刘志坚,方翊,王云龙,等.原代咬肌肌卫星细胞的提取及鉴定[J].口腔医学研究,2014,30(1):30-33.
- [17] 黄郁凯,李晓红,潘宇,等.成年大鼠骨骼肌干细胞的制备与新型培养方法[J].中国病理生理杂志,2013, 29(1):183-187.
- [18] 任宇,俞兰,赵兴胜.不同鼠龄大鼠骨骼肌卫星细胞生物学特性的探讨[J].中国细胞生物学报,2017(5):566-574.
- [19] Ding S, Wang F, Liu Y, et al. Characterization and isolation of highly purified porcine satellite cells. *Cell Death Discov.* 2017; 3:17003.
- [20] 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.
- [21] 贺亚南,陈晓丽,任晓霞,等.免疫磁珠纯化小鼠精原干细胞的研究[J].中国生物工程杂志,2014,34(7):38-43.
- [22] Fukada S, Ma Y, Ohtani T, et al. Isolation, characterization, and molecular regulation of muscle stem cells. *Front Physiol.* 2013;4:317.
- [23] Von MJ, Jones AE, Parks RJ, et al. Pax7 is critical for the normal function of satellite cells in adult skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110(41):16474-16479.
- [24] Kodama H, Kumai Y, Nishimoto K, et al. Modulation of satellite cells activity and MyoD in rat thyroarytenoid muscle after reinnervation. *Laryngoscope.* 2015;125(7):e245-251.
- [25] Zhang F, Deng B, Wen J, et al. PPAR γ and MyoD are differentially regulated by myostatin in adipose-derived stem cells and muscle satellite cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;458(2):375-380.
- [26] Jonuschies J, Antoniou M, Waddington S, et al. The human desmin promoter drives robust gene expression for skeletal muscle stem cell-mediated gene therapy. *Curr Gene Ther.* 2014;14(4): 276-288.
- [27] 刘月光,史新娥,沈清武,等.利用单根肌纤维法分离和培养猪骨骼肌卫星细胞及其成肌诱导分化[J].农业生物技术学报, 2011, 19(05): 856-63.
- [28] Retamales A, Zuloaga R, Valenzuela CA, et al. Insulin-like growth factor-1 suppresses the Myostatin signaling pathway during myogenic differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015; 464(2):596-602.
- [29] 兴孝友,佟慧丽,李树峰.牛骨骼肌卫星细胞的分离培养及诱导分化方法的建立[J].黑龙江畜牧兽医,2012,6(11):27-29.