

C2C12 成肌细胞体外诱导分化为肌管的实验

陈永乐¹, 周光前², 邓宇斌¹, 智伟², 谢慧琪², 邓力², 杨志明², 王亚柱¹

(1. 中山大学中山医学院病理生理教研室, 广东 广州 510089;

2. 四川大学华西临床医院干细胞与组织工程研究室, 四川 成都 610041)

摘要:【目的】观察低浓度马血清体外诱导成肌细胞 C2C12 向成熟肌细胞分化、形成肌管的作用, 探索定向诱导肌分化的途径及其分子机制。【方法】将 C2C12 成肌细胞用含不同浓度马血清的高糖 DMEM 培养基培养, 收集细胞, 在相差显微镜下观察形态变化, 并通过免疫细胞化学 (Immunocytochemistry, ICC) 及 RT-PCR 方法分别检测肌性相关基因表达的改变。【结果】①20 mL/L 和 50 mL/L 的马血清均能促使 C2C12 细胞形成肌小管, 20 mL/L 浓度马血清诱导效率最好 (第 7 天时肌小管形成率分别为 $31.4\% \pm 2.1\%$ 和 $19.0\% \pm 1.6\%$, $P < 0.001$)。②20 mL/L 马血清诱导 3~4 d 开始有肌管形成, 之后肌管越来越多, 到 8~9 d 达高峰 (第 9 天 $40.2\% \pm 1.3\%$), 往后细胞逐渐衰老死亡。③20 mL/L 马血清诱导 C2C12 细胞向成熟肌细胞分化过程中, 肌相关蛋白分子表达发生变化: 结蛋白 (desmin)、成肌分化抗原 (MyoD)、生肌素 (myogenin) 和肌球蛋白 (myosin) 等表达逐渐增强 (未刺激时分别约为 $49.6\% \pm 1.1\%$ 、 $23.4\% \pm 1.1\%$ 、 $4.8\% \pm 1.6\%$ 和 $2.6\% \pm 1.5\%$; 第 6 天时分别提高为 $80.4\% \pm 1.8\%$ 、 $85.4\% \pm 1.1\%$ 、 $22.2\% \pm 1.1\%$ 和 $26.0\% \pm 1.6\%$; $P < 0.001$); desmin、MyoD 和 myogenin 相应的 mRNA 分子也可以通过 RT-PCR 检测到。【结论】①低浓度的马血清能够有效刺激 C2C12 成肌细胞向成熟细胞分化, 以 20 mL/L 浓度效果最好; ②C2C12 细胞是研究肌细胞发育分化的理想模板; ③肌分化发育过程比较复杂, 许多因素都可能起影响, 研究设计要尽量标准化。

关键词: 成肌细胞; 肌细胞; 肌管; 定向分化; 基因表达

中图分类号: Q81

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2008)01-0010-06

In Vitro Inducement of C2C12 Myoblasts into Differentiation of Myotubes

CHEN Yong-le¹, ZHOU Guang-qian², DENG Yu-bin¹, ZHI Wei²,

XIE Hui-qi², DENG Li², YANG Zhi-ming², WANG Ya-zhu¹

(1. Department of Pathophysiology, SUN Yat-sen Medical School, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510089, China; 2. Institute of Stem Cells and Engineering, Huaxi Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: 【Objective】To observe the role of low concentration horse serum on differentiation inducement of C2C12 myoblasts into mature myocytes and consequent formation of myotubes, exploring a method for committed myogenic differentiation, and its related molecular mechanisms. 【Methods】The C2C12 myoblasts were cultured in high glucose-containing DMEM complemented with various concentration horse serum, then harvested and observed under the phase contrast microscope for the alteration of their appearance, and detected for the expression changes of muscle-associated genes by immunocytochemistry and RT-PCR assays respectively. 【Results】(1) Both 20 mL/L and 50 mL/L horse serum concentrations were capable of stimulating myotube formation of C2C12 myoblasts, of which the 20 mL/L horse serum had the higher inducing effect (on day 7, the ratios of myotube formation in both groups are $31.4\% \pm 2.1\%$ and $19.0\% \pm 1.6\%$, respectively, $P < 0.0001$). (2) Induced with 20 mL/L horse serum for 3~4 days, myotubes started to form. Later on, more and more myotubes appear, and at the peak on 8~9 days (day 9, the myotube formation ratio was $40.2\% \pm 1.3\%$). After that, the cells gradually got senile and end in

收稿日期: 2007-05-08

基金项目: 中国博士后科学基金资助 (20060390752)。

作者简介: 陈永乐 (1968-), 男, 广东惠来人, 博士后, 从事干细胞研究, 现在解放军 421 医院肿瘤科工作, E-mail: joegzcn@yahoo.com; 邓宇斌, 通讯作者, 教授。

death. (3) In the maturation process from C2C12 to myocytes triggered by 20 mL/L horse serum, expression of muscle-related protein molecules changed: expressions of desmin, MyoD, myogenin, and myosin increased gradually (prior to simulation, their expressions ratios were $49.6\% \pm 1.1\%$, $23.4\% \pm 1.1\%$, $4.8\% \pm 1.6\%$, and $2.6\% \pm 1.5\%$, respectively; on day 6, up to $80.4\% \pm 1.8\%$, $85.4\% \pm 1.1\%$, $22.2\% \pm 1.1\%$, and $26.0\% \pm 1.6\%$, respectively; $P < 0.001$), of which the counterpart mRNAs of desmin, MyoD, and myogenin could also be detected by RT-PCR. 【Conclusions】 (1) Low concentration horse serum is capable of effectively inducing C2C12 myoblasts to differentiate into mature myocytes, of which the 20 mL/L horse serum bears the higher effect. (2) C2C12 cells are an optimal model for research on myogenic development and differentiation. (3) The process of muscle development and differentiation is complicated, in which too many factors are involved with. So, the design should be made in a standard way.

Key words: myoblast; myocyte; myotube; committed differentiation; gene expression

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2008,29(1):10-15]

诱导肌干细胞(myogenic stem cell)向肌细胞定向分化进行移植是治疗 DMD (Duchenne's muscular dystrophy)、心肌梗死以及肌肉先后天缺损等疾病最有希望的方法之一。肌卫星细胞是主要的肌干细胞,是肌再生修复的主要种子细胞。它们存在于成熟肌纤维的浆膜和基膜之间,表达早期肌系特异性因子 Pax3、Pax7 和 c-met,不表达结蛋白(desmin)、成肌分化抗原(myogenic differentiation antigen, MyoD)、生肌素(myogenin)和肌球蛋白(myosin)等肌系中晚期分子。肌卫星细胞也表达 CD34 分子,经激活不同程度表达 desmin、MyoD、Myf-5、myosin 和 M-钙黏附分子(M-cadherin)等分子^[1-6]。对肌干细胞的肌定向诱导研究仍存在不少问题,主要有机制不清楚、诱导分化率低、分化一致性差、结果不稳定、生成的肌细胞功能缺陷等,故需要进一步研究。C2C12 细胞是由 C3H 小鼠骨骼肌卫星细胞永生化的细胞株,因为细胞形态和特性均一,可无限代培养,因此常常被用做肌系细胞发育分化研究的模板^[1,6-9]。本研究以 C2C12 成肌细胞为研究对象,尝试应用不同浓度马血清和牛血清进行体外培养,诱导其向成熟肌细胞分化,并进行定性证明,揭示肌发育分化过程一些肌特征性分子的表达情况,探索向肌细胞定向分化的诱导途径,为临床治疗肌性疾病的应用打下实验基础。

1 材料与方 法

1.1 细 胞

小鼠肌卫星细胞株 C2C12 (为英国贝尔法斯特女王大学肿瘤研究和细胞生物学中心所保存,

在含 100 mL/L 牛血清的高糖 DMEM 培养基中增殖性生长)。

1.2 主要试剂

高糖 DMEM 培养基和马血清 (均为 Gibco 公司产品), FBS 血清 (Hyclone 公司产品), TNE (5 g/L 胰酶 + 0.2 g/L EDTA, 四川大学华西临床医院实验中心干细胞与组织工程研究室自配), 鼠抗 MyoD 抗体、鼠抗 myosin 抗体、鼠抗 myogenin 抗体、兔抗 Pax7 抗体、鼠抗 desmin 抗体 (均为 Sigma 公司产品), DAB 显色试剂盒 (购自武汉博士德生物工程有限公司), RT-PCR 试剂盒 (Invitrogen 公司产品), Trizol 和 DEPC (均为 Sigma 公司产品)。

1.3 PCR 引物

根据文献报道得到 Pax7、desmin、MyoD、myogenin、MRF4 (muscle regulatory factor 4, 肌调节因子 4) 和 GAPD 分子的引物序列^[10], 然后在 www.pubmed.blast 中验证。引物由上海 Generay Biotech 公司合成。

1.4 方 法

1.4.1 C2C12 细胞增殖培养 复苏 C2C12 细胞, 用含 100 mL/L FBS 血清的高糖 DMEM 培养基调节细胞浓度为 5×10^3 /mL, 移入培养瓶中, 置 37 °C, 体积分数 5% CO₂ 的孵箱中培养, 隔 2 d 换液, 观察细胞形态和生长情况。

1.4.2 C2C12 细胞诱导肌分化培养 用 TNE 消化增殖培养达 90% ~ 100% 融合的 C2C12 细胞, 用含 20 mL/L、50 mL/L FBS 或 20 mL/L、50 mL/L、100 mL/L 马血清的高糖 DMEM 培养基调节细胞浓度为 5×10^4 /mL, 置 37 °C, 体积分数 5% CO₂ 的孵箱中培养, 观察细胞形态和生长情况, 特别注意是否肌管出现。细胞在 25 mL 的培养瓶培养, 每瓶计 1

个样品,使用时每个样品细胞数达 $1 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ 。不同浓度组分别设 3 个复瓶。

1.4.3 Gimsa 染色并显微镜下观察 和 1.4.2 步骤一样爬片培养 C2C12 细胞,按四川大学华西临床医院实验中心干细胞与组织工程研究室方法进行 Gimsa 染色,观察细胞形态和生长情况,特别注意是否肌管出现。

1.4.4 细胞免疫化学检测细胞肌性蛋白分子表达 常规制作经肌分化诱导的 C2C12 细胞不同时期(经 20 mL/L 马血清培养 d0, d3, d6 3 个时间点)的细胞爬片,经 40 g/L 多聚甲醛固定之后按试剂盒的使用说明行 DAB 免疫细胞化学染色,观察、计算阳性率。细胞在 6 孔板培养,每个爬片计 1 个样品,使用时每个样品细胞数达 $3 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 。每个时间点设 1 个组,分别设 3 个复孔。

1.4.5 RT-PCR 检测细胞肌性 mRNA 分子表达 细胞在 25 mL 的培养瓶培养,每瓶计 1 个样品,使用时每个样品细胞数达 $1 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ 。20 mL/L 马血清诱导的 d0 和 d6 分别设 1 组,每组分别设 3 个复瓶。

①RNA 提取及纯化:用 Trizol 溶解 C2C12 或 C2C12 经诱导分化的细胞,按常规方法提取纯化 RNA,57 °C 孵育 10 min,取适量上分光光度计测纯度和总量。

②逆转录反应(RT):按括弧内体系加入各成分[总体积 25 μ L:10 $\times$ PCR buffer 2.5, MgCl₂ 5.0, DNTTP mixture 2.5, RNase inhibitor 0.5, AMV Reverse Transcriptionase XL 0.5, RAndom primer pairs(F+R) 0.5, RNA sample 2.5, RNase free H₂O 11.0]并混匀,按 50 °C 反应 50 min,接着转入 95 °C 反应 2 min,共 1 个循环进行 RT 反应得到 cDNA,保存于 4 °C 中待用。

③多聚合酶链反应(PCR):按括弧内体系[总体积 25 μ L:Premix Taq 12.5, 双蒸水 9.5, Primer pairs(F+R) 1.0, cDNA 2.0, GADP(内参照)0.6]加入各样本,混匀然后按如下的设定上 PCR 仪扩增目的基因:95 °C 变性 2 min 共 1 个循环,然后执行(95 °C 变性 30 s,接着 60 °C 退火 45 s,最后 72 °C 延伸 1 min 30 s)35 个循环,接着 72 °C 再延伸 10 min,结束反应,保存于 4 °C 待用。

将 RT-PCR 终产物上 12 g/L 琼脂糖凝胶中电泳,电泳结束后在自动成像系统中观察并拍照。

1.4.6 统计学分析 应用 SPSS 软件进行两个样

品均数比较的 *t* 检验分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 C2C12 细胞增殖培养

细胞在含 10 mL/L 的 FBS 血清的高糖 DMEM 培养基中培养,开始稀疏时细胞形态呈梭状,均一。细胞生长较快,3 ~ 4 d 基本达完全融合。随着密度增加,细胞相互挤压,形态由梭状逐渐变长变细,呈纤维状,最后慢慢衰老死亡。包括 Gimsa 染色,整个过程极少见细胞融合,没有肌小管出现(图 1A-D)。减少培养基中 FBS 浓度,由 100 mL/L 降为 50 mL/L 甚至是 20 mL/L,细胞生长进一步减慢,但形态保持不变。

2.2 C2C12 细胞诱导肌分化培养

C2C12 肌前体细胞在含 20 mL/L 浓度马血清的高糖 DMEM 中培养,约 3 ~ 4 d 后显微镜下开始观察到细胞的融合出现,发现肌管形成,随着时间推移,细胞密度变大变长,细胞融合越来越多,可以见到许多有两个核以上象串珠似的肌管出现(图 2A-E),到第 8~9 天达高峰(第 9 天为 $40.2\% \pm 1.3\%$),之后细胞逐渐衰老死亡。50 mL/L 马血清也有同样肌分化诱导作用,但速度要慢 2 ~ 3 d,效果也明显低于 20 mL/L 浓度(第 7 天时肌小管形成率分别为: $31.4\% \pm 2.1\%$ 和 $19.0\% \pm 1.6\%$, $P < 0.001$)。100 mL/L 马血清没有观察到肌诱导分化作用。

2.3 C2C12 肌前体细胞向肌细胞分化过程肌相关蛋白分子表达

免疫细胞化学检测发现,C2C12 细胞未经 20 mL/L 马血清刺激(d0)时 desmin 和 MyoD 表达较高阳性率(分别约为: $49.6\% \pm 1.1\%$ 、 $23.4\% \pm 1.1\%$ 。图 3A,B),而 myogenin 和 myosin 虽表达,但表达率很低(分别约为: $4.8\% \pm 1.6\%$ 和 $2.6\% \pm 1.5\%$,图 3 C,D)。20 mL/L 马血清刺激一段时间后,经 20 mL/L 马血清刺激 6 d,desmin、MyoD、myogenin 和 myosin 表达都有明显提高(表达阳性率分别约为: $80.4\% \pm 1.8\%$, $85.4\% \pm 1.1\%$, $22.2\% \pm 1.1\%$, $26.0\% \pm 1.6\%$; $P < 0.001$ 。图 4A-D)。

2.4 C2C12 肌前体细胞向肌细胞分化过程肌相关 mRNA 分子表达

进行 RT-PCR 首先要得到优质的总 RNA,本

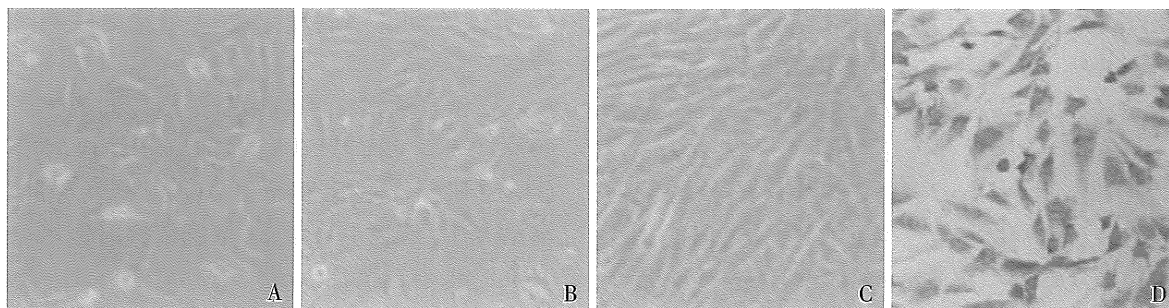


图 1 相差显微镜下增殖培养 C2C12 细胞形态

Fig.1 Views of C2C12 raised in the proliferation medium under phase contrast microscope

A: C2C12 cells look alike in shape when growing in a low density; B and C: C2C12 cells become thin and long like fibers when growing in a large density; D: Gimsa staining shows C2C12 cells look like shuttles, without fusion of cells and formation of myotubes; $\times 200$

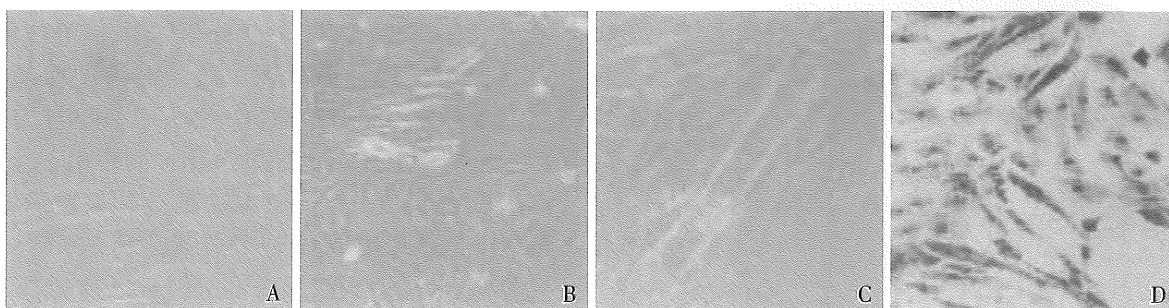


图 2 相差显微镜下 C2C12 细胞肌分化培养形态

Fig.2 Views of C2C12 cells raised in the myogenic differentiation medium under phase contrast microscope

A: after 3 days' stimulation with 20 mL/L horse serum, fusion of cells and formation of myotubes rise to view; B: on day 4 of stimulation, with cells growing in a larger density, the number of fusion cells goes up. Quite a few myotubes comes to view; C: on day 7 of stimulation, more fusion occurs. Longer and larger myotubes appear; D: through Gimsa staining, bead-like nuclei in the myotubes on day 5 become clearer; A, B, D: $\times 200$; C: $\times 400$

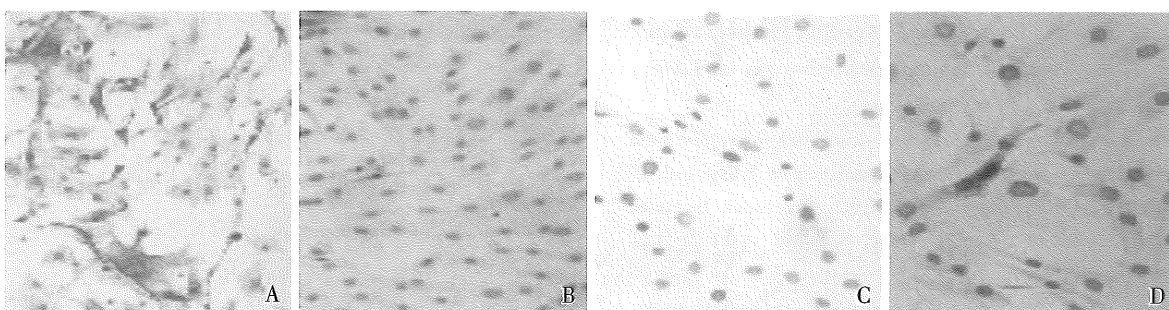


图 3 ICC 测定肌标志性分子在无刺激的 C2C12 细胞的表达

Fig.3 Expression of muscle-associated molecules in non-stimulation C2C12 myoblasts are detected by using ICC assay

The expression ratios of the proteins are: A: desmin 50%; B: MyoD 24%; C: myogenin 6%; and D: myosin 4%; $\times 200$

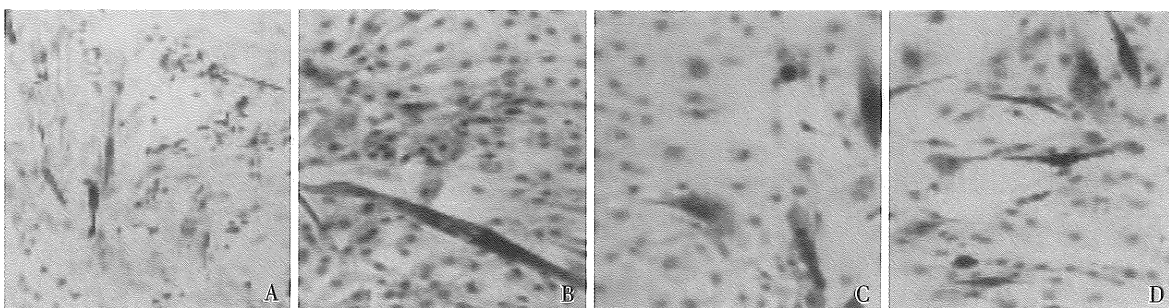


图 4 ICC 检测肌标志性分子在经 20 mL/L 马血清刺激 6 d 的 C2C12 细胞上的表达

Fig.4 Expression of muscle-associated molecules in C2C12 myoblasts stimulated with 20 mL/L horse serum for 6 days are detected by using ICC assay

Expressions of all the four proteins markedly rise; A: desmin 81%; B: MyoD 86%; C: myogenin 22%; D: myosin 27%; $\times 200$

实验抽提到的 RNA 产物 A260/280 比值都在 1.6 到 2.2 之间,并获得了较高的量。做 RT-PCR 检测,未经诱导的 C2C12 细胞 desmin、MyoD 和 myogenin 表达,desmin 和 MyoD 有一定程度表达,myogenin 表达很微弱,其余(Pax7、和 MFR4)均未检测到 mRNA 表达。细胞经过含 20 mL/L 的马血清的高糖 DMEM 6 d 培养,发现 desmin 和 MyoD 表达最强,myogenin 仍保持微弱表达,而 Pax7 和 MFR4 仍然未检测到 mRNA 表达(图 5)。

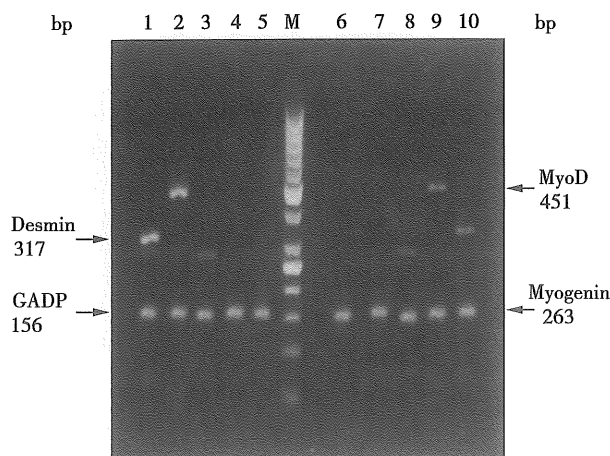


图 5 1.2% 琼脂糖凝胶电泳探测 RT-PCR 扩增的目的基因产物

Fig.5 Products of target genes (mRNA) expanded in RT-PCR are analyzed through eletrophoresis on 1.2% agarose gel

Without stimulation, desmin, MyoD mRNA and myogenin could be detected, but in a weak way. After stimulation for 6 days with 20 mL/L horse serum, desmin and MyoD expressions increased remarkably and that of myogenin seemed to remain at its previous level. Pax7 and MRF4 didn't appear in either non-stimulation or 20 mL/L horse serum treated group (Lanes 1-5 for desmin, MyoD, myogenin, MFR4 and Pax7 respectively, and from 20 mL/L HS stimulated C2C12; 6-10 for Pax7, MFR4, myogenin, MyoD and desmin respectively, and from non-stimulated C2C12; Lane M for 50 bp DNA ladders. GAPD used as inner control)

3 讨论

在肌卫星细胞向肌细胞发育分化过程中,细胞出现融合,形成肌管、肌纤维,甚至可见肌细胞的搏动^[11]。相应地,一些肌性标志性分子表达发生变化。早期的分子表达有 Pax3, Six1, Six4 等, Pax7, c-met 接着出现,跟着的是 MyoD, myogenin, dystrophin, desmin 等, myf6, MRF, myosin 和 β -actin 在分化终末期出现^[11, 12]。

3.1 低浓度血清刺激 C2C12 细胞向成熟肌细胞分化

低浓度血清能够刺激肌干细胞向成熟肌细胞分化^[13, 14]。我们只观察到低浓度马血清有刺激 C2C12 肌分化作用,低浓度 FBS 没有该效能。无血清培养下,细胞生长缓慢,细胞密集时也可见数量有限的肌小管融合形成。马血清中可能含有某种有利于启动肌前体细胞向成熟肌细胞分化的因子,低浓度血清本身能刺激血清反应因子(SRFs)产生,因此低浓度马血清能有效诱导肌干细胞沿肌系下游分化。但是 Yoshiko Y 等^[15]发现,高浓度血清也有诱导 C2C12 的肌分化作用,高峰值更高,只是作用出现延迟。理由是,高浓度血清刺激 C2C12 自分泌和旁分泌 IGF 因子,刺激肌分化更甚于血清的有丝分裂原的分化抑制作用。分析我们用低浓度 FBS 诱导 C2C12 肌分化失败的原因,可能也是延迟出现而已,只是我们没观察到。这也说明,肌分化诱导结果受许多因素影响,实验设计要尽量标准化。

本实验观察到,永生化的肌卫星细胞 C2C12 在 100 mL/L 牛血清的高糖 DMEM 中没有形态的改变,经低浓度马血清诱导后可靠、稳定地向成熟肌细胞分化,形成肌管,但没有肌纤维,未见肌细胞搏动。相反,原代肌细胞在含 100 mL/L 牛血清的低糖 DMEM 培养基中培养两周左右会出现肌纤维和肌细胞搏动。原因可能是肌原代细胞中含有肌分化更晚的早期细胞,容易在体外培养被激发,形态和功能也能够保持。而 C2C12 可能处于更早阶段,20 mL/L 马血清只能在形态而不能在功能诱导上起作用。

3.2 与低浓度血清诱导 C2C12 向肌管分化相关的一些肌调节因子表达

文献报道^[5, 16],未经刺激的 C2C12 有少量 desmin、MyoD 和 myogenin 表达,刺激后表达明显增加。本实验中,增殖培养下,C2C12 成肌细胞表达一定量的 desmin、MyoD 和少量的 myogenin。分化诱导培养后,desmin 和 MyoD 表达明显上调,但 myogenin 还保持少量水平。Pax7 和 MRF4,不管在蛋白水平还是 mRNA 水平都未检测到表达,这与文献报道不一致^[12, 17],可能是受某些影响的结果。Pax7 是转录子,在增殖和静止的肌卫星细胞(包括 C2C12)均有表达。它在肌转化作用中作用较弱,因此,估计可能是 pax7 分子表达低的缘故,可能与

检测不够灵敏也有关。另外原因可能因为pax7 只在比 C2C12 更早阶段的肌干细胞表达^[3,12,17]。te Pas MF 等^[18]用激素刺激 C2C12,发现对细胞增殖和分化均有抑制;但是对 MyoD、myf5 和 MRF4 表达水平都起上调作用,而对 myogenin 均起下调作用。与其它文献报道不一致,因为 myogenin 在 MyoD 等下游,MyoD 高则 myogenin 高^[5]。结合我们研究,说明细胞分化受许多方面影响,如细胞种类、发育时期、受刺激的方向等^[19]。

肌干细胞体外发育分化受刺激因素、干细胞本身所处阶段等多因素影响,因此,诱导分化的路径、分化过程相伴随的分子的表达以及细胞形态功能等生物学特征差别较大,有许多方面需进一步探明。想获得高效、稳定、均一的成熟肌细胞用于研究或临床治疗必须尽可能选用高效途径,公式化作用模式,排除干扰因素。

参考文献:

- [1] Zhou GQ, Xie HQ, Zhang SZ, et al. Current understanding of dystrophin-related muscular dystrophy and therapeutic challenges ahead [J]. Chinese Medical Journal, 2006,119(16):1381-1391.
- [2] Hashimoto N, Murase T, Kondo S, et al. Inagawa-Ogashiwa M. Muscle reconstitution by muscle satellite cell descendants with stem cell-like properties [J]. Development, 2004,131(21):5481-5490.
- [3] Buckingham M. Skeletal muscle progenitor cells and the role of Pax genes [J]. C R Biol, 2007,330(6-7):530-533.
- [4] Cooper RN, Butler-Browne GS, Mouly V. Human muscle stem cells [J]. Curr Opin Pharmacol, 2006,6(3):295-300.
- [5] Lindon C, Montarras D, Pinset C. Cell Cycle-regulated expression of the muscle determination factor Myf5 in proliferating myoblasts [J]. J Cell Biol, 1998,140(1):111-118.
- [6] Melo F, Carey DJ, Brandan E. Extracellular matrix is required for skeletal muscle differentiation but not myogenin expression [J]. J Cell Biochem, 1996,62(2):227-239.
- [7] 杨川,李莉,王川,等.重构腺相关病毒转导 PDX-1 对 C2C12 分化为胰岛素分泌细胞的作用 [J]. 中山大学学报:医学科学版, 2006,27(5):486-490.
- [8] 杨川,程桦,王川,等.PDX-1 对成肌细胞株 C2C12 分化为胰岛素分泌细胞的作用 [J]. 中山大学学报:医学科学版, 2005,26(4):409-412.
- [9] Thinakaran G, Ojala J, Bag J. Expression of c-jun/AP-1 during myogenic differentiation in mouse C2C12 myoblasts [J]. FEBS Lett, 1993,319(3):271-276.
- [10] Tamaki T, Akatsuka A, Ando K. Identification of myogenic-endothelial progenitor cells in the interstitial spaces of skeletal muscle [J]. J Cell Biol, 2002,157(4):571-576.
- [11] Dezawa M, Ishikawa H, Itokazu Y, et al. Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration [J]. Science, 2005,309(5732):314-317.
- [12] 夏顺汉,妖鑫,Mansouri A,等. Pax7 基因在 C2C12 细胞内的表达及诱导失活 [J]. 实验生物学报, 1996,29(2):185-189.
- [13] Goto S, Miyazaki K, Funabiki T, et al. Serum-free culture conditions for analysis of secretory proteinases during myogenic differentiation of mouse C2C12 myoblasts [J]. Anal Biochem, 1999,272(2):135-142.
- [14] Langen RC, Schols AM, Kelders MC, et al. Enhanced myogenic differentiation by extracellular matrix is regulated at the early stages of myogenesis [J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2003,39(3-4):163-169.
- [15] Yoshiko Y, Hirao K, Maeda N. Differentiation in C2C12 myoblasts depends on IGFs and not serum depletion [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2002,283(4):1278-1286.
- [16] Dedieu S, Mazeres G, Cottin P, et al. Involvement of myogenic regulator factors during fusion in the cell line C2C12 [J]. Int J Dev Biol, 2002,46(2):235-241.
- [17] Zammit PS, Relaix F, Nagata Y, et al. Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells [J]. J Cell Science, 2006,119(pt 9):1824-1832.
- [18] te Pas MF, de Jong PR, Verburg FJ. Glucocorticoid inhibition of C2C12 proliferation rate and differentiation capacity in relation to mRNA levels of the MRF gene family [J]. Mol Biol Rep, 2000,27(2):87-98.
- [19] 邱小忠,李小娜,陈维毅,等. 周期性机械拉伸对 C2C12 成肌细胞增殖的影响 [J]. 中国临床解剖学杂志, 2006,24(2):183-185.

(编辑 孙慧兰)