

“十一五”国家重点图书出版规划项目



生命科学实验指南系列

Epidermal Cells
Methods and Protocols

表皮细胞 实验指南

〔加拿大〕K. 图尔克森 主编
彭代智 主译
黄文华 赵雄飞 主审



科学出版社
www.sciencep.com

生命科学实验指南系列

表皮细胞实验指南

Epidermal Cells: Methods and Protocols

〔加拿大〕K. 图尔克森 主编

彭代智 主译

黄文华 赵雄飞 主审

科学出版社

北 京

图字：01-2008-0358 号

内 容 简 介

本书是一本有关表皮细胞和表皮干细胞研究的最新且实用的实验技术指南。全书共 42 章,涵盖了人和小鼠表皮细胞分离培养的技术方法以及表皮干细胞富集、鉴定、培养和体内标记的技术方法,详细介绍了免疫学、细胞生物学、分子生物学和基因组学等最新技术在研究表皮组织的胚胎发生、发育、分化及皮肤疾病中的应用,还叙述了表皮细胞和成纤维细胞的基因修饰(转染、突变和打靶)、组织工程皮肤的体外构建和体内移植及毛囊的基因和干细胞治疗等具有广泛开发和应用前景的重要技术,对从事上皮细胞尤其是表皮细胞和表皮干细胞的教学、科研和开发人员来说是一本很有价值的工具书。

本书可作为上皮细胞尤其是表皮细胞和表皮干细胞研究、开发和应用的工具书,也可供细胞生物学、分子生物学、发育生物学、临床医学等有关领域的教学、科研人员参考。

Translation from the English language edition:

Epidermal Cells: Methods and Protocols by Kursad Turksen

Copyright © 2005 Humana Press Inc.

Springer is a part of Springer Science+Business Media

All Rights Reserved

图书在版编目(CIP)数据

表皮细胞实验指南/(加拿大)图尔克森(Turksen, K.)主编,彭代智主译.
—北京:科学出版社,2010

(生命科学实验指南系列)

ISBN 978-7-03-028236-1

I. ①表… II. ①图… ②彭… III. ①表皮-细胞生物学-实验-指南
IV. ①Q2-33②R322.99-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 128778 号

责任编辑:莫结胜 刘 晶 / 责任校对:李奕莹

责任印制:钱玉芬 / 封面设计:耕者设计工作室

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

铭浩彩色印务有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2010 年 7 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2010 年 7 月第一次印刷 印张:29 1/2 插页:2

印数:1—2 500 字数:673 000

定价:90.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

主 译 彭代智

主 审 黄文华 赵雄飞

译者所在单位及译者名单 (按姓氏汉语拼音排序)

第三军医大学	陈 建	陈 杰	陈 林	党永明	顾长国
	黄 炜	黄文华	黄跃生	蒋丽莉	金 旻
	李 磊	林 恒	刘泽军	罗海水	罗向东
	彭代智	粟永萍	苏踊跃	孙慧勤	王 刚
	王丽华	王亚洲	王 勇	伍津津	严 泉
	张教扬	赵雄飞	赵 云	郑必祥	朱崇涛
	邹仲敏				
第四军医大学	高天文	胡大海	刘佳琦	吕雅洁	
解放军总医院	付小兵	韩 冰			
中山大学	刘旭盛	唐锦明			
清华大学	李 响	孟安明	齐晶晶		
上海交通大学	曹谊林	胡葵葵	陆树良	牛轶雯	周广东

编 者

- BRIAN J. ANESKIEVICH • *Departments of Nutritional and Pharmaceutical Sciences, School of Pharmacy, University of Connecticut, Storrs, CT*
- CLAUDE BACKENDORF • *Laboratory of Molecular Genetics, Leiden Institute of Chemistry, Leiden, The Netherlands*
- WILLIS BACON • *Department of Cell Biology, Neurobiology, and Anatomy, University of Cincinnati College of Medicine, Cincinnati, OH*
- JACKIE R. BICKENBACH • *Department of Anatomy and Cell Biology, University of Iowa, Iowa City, IA*
- CAROLYN BYRNE • *Barts and The London Queen Mary School of Medicine and Dentistry, University of London, London, UK*
- ALBERTO CALLIGARO • *Histology and Embryology Unit, Department of Experimental Medicine, University of Pavia, Pavia, Italy*
- ANDREA CASASCO • *Histology and Embryology Unit, Department of Experimental Medicine, University of Pavia, Pavia, Italy*
- MARCO CASASCO • *Histology and Embryology Unit, Department of Experimental Medicine, University of Pavia, Pavia, Italy*
- PIERRE CHAMBON • *Institut Clinique de la Souris (ICS) and IGBMC, Illkirch, France*
- WING Y. CHANG • *Department of Physiology and Pharmacology, University of Western Ontario, London, Ontario, Canada*
- ROBERT MAN-KIT CHEUNG • *Ottawa Health Research Institute, Ottawa, Ontario, Canada*
- ROBERT M. CLEGG • *Laboratory for Fluorescence Dynamics, Department of Physics, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, IL*
- ANTONIA ICARO CORNAGLIA • *Histology and Embryology Unit, Department of Experimental Medicine, University of Pavia, Pavia, Italy*
- KRISTINE CUFFLEY • *Laboratoire de Recherche des Grands Brûlés/LOEX and Department of Surgery, Laval University, Québec, Québec, Canada*
- LINA DAGNINO • *Departments of Physiology and Pharmacology and of Pediatrics, University of Western Ontario, London, Ontario, Canada*
- RICHARD L. DAVIS, JR. • *NCR Division, Midwest Research Institute, Rockland, MD*
- GYS DE JONGH • *Department of Dermatology, University Medical Center Nijmegen, Nijmegen, The Netherlands*
- BILGE DIKER • *Ottawa Health Research Institute, Ottawa, Ontario, Canada*
- THOMAS P. DOOLEY • *IntegriDerm Inc., Birmingham, AL*
- RUSLA M. DUBREUIL • *Open Biosystems Inc., Huntsville, AL*
- DAVID F. FISCHER • *Netherlands Institute for Brain Research, Amsterdam, The Netherlands*
- PHILIP FLECKMAN • *Department of Medicine (Dermatology), University of Washington, Seattle, WA*
- ANTHONY M. FLORES • *Department of Pharmaceutical Sciences, School of Pharmacy, University of Connecticut, Storrs, CT*

NORBERT E. FUSENIG • *Division of Carcinogenesis and Differentiation, German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany*

JONATHAN A. GARLICK • *Division of Cancer Biology and Tissue Engineering, Department of Oral and Maxillofacial Pathology, School of Dental Medicine and Department of Anatomy and Cellular Biology, School of Medicine, Tufts University, Boston, MA*

FUMITAKE GEIYO • *Division of Clinical Nephrology and Rheumatology, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata, Japan*

LUCIE GERMAIN • *Laboratoire de Recherche des Grands Brûles/LOEX and Department of Surgery, Laval University, Québec, Québec, Canada*

MARC G. GOLIGHTLY • *Department of Pathology, State University of New York at Stony Brook, Stony Brook, NY*

SHARI GREENBERG • *Division of Cancer Biology and Tissue Engineering, Department of Oral and Maxillofacial Pathology, School of Dental Medicine and Department of Anatomy and Cellular Biology, School of Medicine, Tufts University, Boston, MA*

BARBARA HAGER • *Department of Medicine (Dermatology), University of Washington, Seattle, WA*

KERRY M. HANSON • *Department of Chemistry, University of California, Riverside, CA*

MATTHEW J. HARDMAN • *School of Biological Sciences, University of Manchester, Manchester, UK*

NAKA HATTORI • *Laboratory of Cellular Biochemistry, Animal Resource Sciences/ Veterinary Medical Sciences, University of Tokyo, Tokyo, Japan*

CINDY HAYWARD • *Laboratoire de Recherche des Grands Brûles/LOEX and Department of Surgery, Laval University, Québec, Québec, Canada*

ROBERT M. HOFFMAN • *AntiCancer Inc., San Diego, CA*

ALAIN HOVNANIAN • *INSERM CPTP-U563, Service de Génétique Médicale, CHU Purpan, Toulouse, France*

OTMAR HUBER • *Charité-Medical Universities Berlin, Campus Benjamin Franklin, Institute of Clinical Chemistry and Pathobiochemistry, Berlin, Germany.*

NAM-HO HUH • *Department of Cell Biology, Okayama University Graduate School of Medicine and Dentistry, Okayama, Japan*

OLGA IGOUCHEVA • *Department of Dermatology and Cutaneous Biology, Jefferson Institute of Molecular Medicine, Jefferson Medical College, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA*

WALLACE IP • *Department of Cell Biology, Neurobiology, and Anatomy, University of Cincinnati College of Medicine, Cincinnati, OH*

AKEMI ISHIDA-YAMAMOTO • *Department of Dermatology, Asahikawa Medical College, Asahikawa, Japan*

MAYUMI ITO • *Basic Research Laboratory, Kanebo Ltd., Odawara, Japan*

BASTIAAN J. H. JANSSEN • *Department of Tumor Immunology, Nijmegen Center for Molecular Life Sciences, Nijmegen, The Netherlands*

KIM BAK JENSEN • *Department of Molecular Biology, University of Aarhus, Aarhus, Denmark*

GYS DE JONGH • *Department of Dermatology, University Medical Center Nijmegen, Nijmegen, The Netherlands*

MONIKA JOST • *SymbioTec GmbH, Saarbrücken, Germany*

TAKASHI KAMEDA • *Department of Biochemistry, Akita University, School of Medicine, Akita, Japan*

MARIKO KASHIWAGI • *Institute of Molecular Oncology, Showa University, Tokyo, Japan*

PRITINDER KAUR • *Epithelial Stem Cell Biology Laboratory, Peter MacCallum Cancer Institute, East Melbourne, Victoria, Australia*

DAVID KIMELMAN • *Department of Biochemistry, University of Washington, Seattle*

KENJI KIZAWA • *Basic Research Laboratory, Kanebo Ltd, Odawara, Japan*

TAKASHI KOBAYASHI • *Department of Dermatology, Chiba University School of Medicine, Chiba, Japan*

LÁSZLÓ G. KÖMÜVES • *Department of Dermatology, VA Medical Center, University of California at San Francisco, San Francisco, CA and Millennium Pharmaceuticals, San Francisco, CA*

PETER KRISTENSEN • *Department of Molecular Biology, University of Aarhus, Aarhus, Denmark*

COREY LARGMAN • *Departments of Dermatology and Medicine, VA Medical Center, University of California at San Francisco, San Francisco, CA*

DANIELLE LAROUCHE • *Laboratoire de Recherche des Grands Brûlés/LOEX and Department of Surgery, Laval University, Québec, Québec, Canada*

AMY LI • *Epithelial Stem Cell Biology Laboratory, Peter MacCallum Cancer Institute, East Melbourne, Victoria, Australia*

MEI LI • *Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC) and ICS, Illkirch, France*

NICOLE MAAS-SZABOWSKI • *Division of Carcinogenesis and Differentiation, German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany*

ALEXANDER MARGULIS • *Division of Cancer Biology and Tissue Engineering, Department of Oral and Maxillofacial Pathology, School of Dental Medicine and Department of Anatomy and Cellular Biology, School of Medicine, Tufts University, Boston, MA*

HIROKI MARUYAMA • *Division of Clinical Nephrology and Rheumatology, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata, Japan*

MAJA MATIC • *Departments of Biochemistry and Cell Biology and Pathology, The State University of New York at Stony Brook, Stony Brook, NY*

JIN-JUN MENG • *Department of Cell Biology, Neurobiology, and Anatomy, University of Cincinnati College of Medicine, Cincinnati OH*

DANIEL METZGER • *Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC) and ICS, Illkirch, France*

JUN-ICHI MIYAZAKI • *Division of Stem Cell Regulation Research, Osaka University Medical School, Osaka, Japan*

HITOSHI MIZUTANI • *Department of Dermatology, Faculty of Medicine, Mie University, Mie, Japan*

REBECCA J. MORRIS • *Department of Dermatology, Columbia University College of Physicians and Surgeons, New York, NY*

JUN OHGANE • *Laboratory of Cellular Biochemistry, Animal Resource Sciences/ Veterinary Medical Sciences, University of Tokyo, Tokyo, Japan*

WILLIAM R. OTTO • *Histopathology Unit, London Research Institute, Cancer Research UK, London, UK*

ANNALISA PIRRONE • *Department of Medicine (Dermatology), University of Washington, Seattle, WA*

RICHARD B. PRESLAND • *Departments of Oral Biology and Medicine (Dermatology), University of Washington, Seattle, WA*

CHRISTOPHER PULLIS • *Department of Pathology, State University of New York at Stony Brook, Stony Brook, NY*

RAMTIN RAHBAR • *Ottawa Health Research Institute, Ottawa, Ontario, Canada*

SHANKER P. REDDY • *IntegriDerm Inc., Birmingham, AL*

RICHARD P. REDVERS • *Epithelial Stem Cell Biology Laboratory, Peter MacCallum Cancer Institute, East Melbourne, Victoria, Australia*

FEDERICA RIVA • *Histology and Embryology Unit, Department of Experimental Medicine, University of Pavia, Pavia, Italy*

ULRICH RODECK • *Department of Dermatology and Cutaneous Biology, Sidney Kimmel Cancer Center, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA*

MEGHAN ROJAS • *Department of Cell Biology, Neurobiology, and Anatomy, University of Cincinnati College of Medicine, Cincinnati OH*

JOOST SCHALKWIJK • *Department of Dermatology, University Medical Center Nijmegen, Nijmegen, The Netherlands*

CHUN-SHEN SHEN • *Department of Dermatology, Faculty of Medicine, Mie University, Japan*

KUNIO SHIOTA • *Laboratory of Cellular Biochemistry, Animal Resource Sciences/Veterinary Medical Sciences, University of Tokyo, Tokyo, Japan*

SANFORD R. SIMON • *Departments of Biochemistry and Cell Biology and Pathology, State University of New York at Stony Brook, Stony Brook, NY*

HANS-JÜRGEN STARK • *Division of Carcinogenesis and Differentiation, German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany*

JOHN T. STICKNEY • *Department of Cell Biology, Neurobiology, and Anatomy, University of Cincinnati College of Medicine, Cincinnati OH*

TOSHIHIRO SUGIYAMA • *Department of Biochemistry, Akita University, School of Medicine, Akita, Japan*

TAMMY-CLAIRE TROY • *Ottawa Health Research Institute, Ottawa, Ontario, Canada*

KURSAD TURKSEN • *Hormones, Growth, and Development Program, Ottawa Health Research Institute, Ottawa, Ontario, Canada*

PIET E. J. VAN ERP • *Department of Dermatology, University Medical Center Nijmegen, Nijmegen, The Netherlands*

FRED VAN RUIJSSEN • *Department of Neurogenetics, Academic Medical Centre, Amsterdam, The Netherlands*

ASHLEY E. WEBB • *Molecular and Cellular Biology Program, Department of Biochemistry, University of Washington, Seattle*

JÖRG WEISKE • *Charité-Medical Universities Berlin, Campus Benjamin Franklin, Institute of Clinical Chemistry and Pathobiochemistry, Berlin, Germany.*

SARAH H. WILLIAMS • *Pediatric Molecular Genetics, Weatherall Institute of Molecular Medicine, John Radcliffe Hospital, University of Oxford, Oxford, UK*

WEI-YANG WU • *Department of Dermatology, Columbia University College of Physicians and Surgeons, New York, NY*

KIYOFUMI YAMANISHI • *Department of Dermatology, Hyogo College of Medicine, Hyogo, Japan*

KYONGGEUN YOON • *Departments of Dermatology and Cutaneous Biology and Biochemistry and Molecular Pharmacology, Jefferson Medical College, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA*

WEITIAN ZHANG • *Division of Cancer Biology and Tissue Engineering, Department of Oral and Maxillofacial Pathology, School of Dental Medicine and Department of Anatomy and Cellular Biology, School of Medicine, Tufts University, Boston, MA*

中译本序

皮肤是人体最大的器官，具有保护体内组织、调节体温、感受刺激、排泄废物和参与免疫应答等重要的生物学功能。长久以来，表皮细胞一直被认为是难以培养的细胞，限制了皮肤生物学基础研究的发展。皮肤覆盖在人体表面，易于受到伤害，如发生大面积烧伤、皮肤溃疡和皮肤撕脱伤等。自体皮肤移植、异体皮肤移植或其他皮肤代用品是临床修复各种皮肤缺损的主要途径，但常存在自体皮源不足、免疫排斥和修复效果差等难题。组织工程皮肤为解决这些难题带来了新的希望。Rheinwald 和 Green 于 1975 年建立了表皮细胞培养技术，Jones 于 1997 年从表皮基底层中分离出了表皮干细胞，为皮肤生物学的基础研究和组织工程皮肤的临床应用奠定了重要的技术和理论基础。

《表皮细胞实验指南》(Kursad Türksen 主编的 *Epidermal Cells: Methods and Protocols*, Humana Press, Totowa, New Jersey, 2005) 涵盖表皮细胞和表皮干细胞一系列先进而实用的实验方案。此书不仅介绍了表皮细胞和表皮干细胞分离、培养和鉴定的基本实验技术，而且对表皮组织胚胎发生、发育、分化以及皮肤疾病研究中所用的免疫学、细胞生物学、分子生物学新技术进行了详尽阐述。皮肤种子细胞基因修饰、组织工程皮肤体外构建和体内移植，以及毛囊基因和干细胞治疗等前沿技术的介绍还为读者展示出极其诱人的应用前景。这本书的特点在于既有基础研究，又有应用研究；既有详细的实验步骤，又指出了可能遇到的难点及其解决办法，还有十分详尽的参考文献。因此，这本书是一本十分有用的工具书，从事表皮细胞和表皮干细胞的教学、科研和开发的人员将会从中大获裨益。

第三军医大学的科技人员作为主体，联合多个院校从事相关领域研究的专家学者，在完成繁重的教学、科研和医疗任务之余，抽出时间将这本书译成中文，相信这本书的翻译出版会对我国皮肤生物学的基础研究、皮肤疾病和损伤的临床应用研究起到重要的促进作用。

中国工程院院士
防原医学与病理学教授

程天民

2010 年 7 月 1 日

译者的话

1975年 Rheinwald 和 Green 在 *Cell* 杂志发表成功培养表皮细胞的论文以来,表皮细胞的分离和培养技术已经取得重大进展。干细胞是近年来生物医学领域的研究热点之一,表皮干细胞和毛囊干细胞也分别由 Jones 和 Talor 于 1997 年和 2000 年成功分离培养。随着免疫学、细胞生物学、分子生物学和基因组学等学科不断发展,来自这些领域的前沿技术已广泛应用于表皮细胞、表皮干细胞及表皮组织的研究。《表皮细胞实验指南》一书反映了该领域成熟的一系列操作规程,内容丰富而新颖,给科研人员提供了先进和系统的技术方法,可作为一本经典的上皮细胞尤其是表皮细胞研究用工具书。

这本书的翻译和审校是在第三军医大学复合伤研究所程天民院士的鼓励下,由第三军医大学、第四军医大学、解放军总医院、清华大学、上海交通大学和中山大学的第一线科技骨干完成的,他们从繁重的医教研工作中抽出时间,加班加点,为尽快完成这本书的翻译审校工作作出了很大的贡献。付小兵院士、孟安民院士和曹谊林教授亲自参与相关章节的译校工作,是对这本书的极大支持。科学出版社科学出版中心的马学海副主任和莫结胜编辑为确保高质量地完成这本书的翻译、定稿和出版工作付出了大量精力。在此,我谨向所有参加翻译、校对、编辑和出版的同志们表示由衷的敬佩和感谢。

最后,我要特别感谢我的老师程天民院士亲自为这本书作序,黄文华教授和赵雄飞教授为这本书逐字逐句审校,他们的关怀、指导与帮助给了我无尽的信心和勇气。此外,这本书的出版还得到国家高技术研究发展计划项目(“863”计划)(2006AA02A121)、国家重点基础研究发展计划项目(“973”计划)(2005CB522605)、国家重点实验室自主研究 I 类课题(SKLZZ200904)的大力支持,在此深表谢意。由于这本书的专业面广、翻译量大、时间紧,加之译者的知识、能力、精力和水平有限,因此书中难免存在错漏和不当之处,敬请专家和读者批评指正。

彭代智

2010年6月16日于重庆

前 言

自从二十多年前 Howard Green 和同事们第一次成功地在体外培养了表皮细胞并使其持续生长，我们对这种细胞的了解和操作能力得到惊人的提高。然而，多年来在某些范围内一直有一种近乎神秘观念，那就是表皮细胞的研究工作较难开展。尽管和成纤维细胞相比，这种观念通常是正确的，但该领域还是在建立这种细胞类型的许多方法学方面取得了特别的进展。因此，我感到现在正是收集一些有用的实验方案的时候，这些实验方案涵盖了培养表皮细胞、富集很早期表皮祖细胞以及研究表皮细胞在体内和体外定向分化的不同方法和模型。《表皮细胞实验指南》一书并不意味着广泛收集所有操作表皮细胞的实验方案，而是面向有经验的和初学的表皮生物学者收集他们很容易在自己实验室重复的又十分有价值的实验方案。我能完成这本书，与那些非常忠诚的撰稿者是分不开的，他们乐意无私分享他们“来之不易”的方法。我感谢他们所有的人。

我也想借此机会来感谢我多年来的好导师 Jane Aubin 博士，特别是他在我作为细胞培养和分化的初学者时灌输给我的极大的热情和严谨。我同样感谢 Elaine Fuchs 博士给了我自己动手操作表皮细胞和小鼠模型进行研究的机会。没有他们的支持和给我的机会，我不可能在令人兴奋的科学研究领域得以成长。

John Walker 博士在我所选择的科研项目上对我一直的支持和帮助也非常重要。此外，我感谢所有在 Humana Press 给过我热心支持的人，特别是 Craig Adams。

我非常感谢 N. Urfe 与我进行的启发性讨论。

最后，我感谢我伟大的合作者——Tammy Troy，她无尽的爽朗和热情的帮助与支持使我很愉快地完成了这本书。

库尔萨德·图尔克森 (Kursad Turksen)

(彭代智 译)

目 录

中译本序
译者的话
前言

第一部分 角质形成细胞和器官培养

第 1 章	小鼠角质形成细胞的原代培养	2
第 2 章	原代成年小鼠角质形成细胞的连续培养	15
第 3 章	无基质贴附下的角质形成细胞培养	23
第 4 章	基因修饰的饲养细胞在角质形成细胞培养中的应用	29
第 5 章	胎鼠皮的器官培养及其在形态发生分子机制研究中的应用	39
第 6 章	分析培养的角质形成细胞体外和体内分化功能的实验模型	46
第 7 章	工程化人体皮肤的体外构建	59

第二部分 表皮干细胞

第 8 章	表皮干细胞的体内标记和分析	70
第 9 章	体外形成克隆的小鼠角质形成干细胞的收集和检测方法	76
第 10 章	人角质形成干细胞的 FACS 富集	85
第 11 章	上皮干细胞的分离、鉴定与培养	94
第 12 章	角蛋白 19 作为体内和体外干细胞的标志	101

第三部分 表皮分化的分析

第 13 章	免疫定位技术在表皮研究中的应用	111
第 14 章	以逆转录聚合酶链反应分析表皮细胞	119
第 15 章	表皮发育过程中基因诱导和屏障形成的全组织包埋分析	126
第 16 章	斑马鱼早期表皮发育的分析	137
第 17 章	E2F 因子在表皮细胞分化中的作用	146
第 18 章	表皮中 HOX 同源盒结构域蛋白和基因转录物的分析	157
第 19 章	表皮的凋亡	171
第 20 章	桥粒蛋白在凋亡表皮细胞中的命运	176
第 21 章	角质形成细胞表达间隙连接蛋白 43 的流式细胞术分析	194
第 22 章	角质形成细胞培养物内间质金属蛋白酶-9 和金属蛋白酶组织抑制剂-1 的检测	201
第 23 章	毛囊上皮细胞表达 S100 蛋白的特征	209
第 24 章	角质化细胞包膜的免疫电子显微镜分析和抗原修复	223

第四部分 表皮功能分析的方法及途径

第 25 章	用免疫化学方法进行人工皮肤的细胞动力学分析	229
第 26 章	多参数流式细胞术分析正常及过度增生性皮肤的增殖、分化和炎症	239
第 27 章	细胞数目的 DNA 荧光测定法	251
第 28 章	角质形成细胞的瞬时转染技术	263
第 29 章	四环素调控下表皮角质形成细胞的基因表达	273
第 30 章	角质形成细胞中寡核苷酸介导的基因打靶	287
第 31 章	人 SPRR 基因家族启动子分析	303
第 32 章	大片段 PAC 重组载体在角质形成细胞中的稳定整合	314
第 33 章	小鼠表皮的定向体细胞突变	328
第 34 章	蛋白质相互作用的研究方法	340
第 35 章	识别皮肤角质形成细胞的重组噬菌体展示抗体的分离	355
第 36 章	发育过程中组织特异性 DNA 甲基化模式的分析	367
第 37 章	人角质形成细胞和表皮的基因表达系列分析	380
第 38 章	DermArray [®] 尼龙膜 DNA 微阵列应用于皮肤病基因表达谱的研究方法	397
第 39 章	表皮内双光子荧光成像及活性氧检测	410

第五部分 移植与基因治疗

第 40 章	人组织工程皮肤的体内移植	420
第 41 章	利用活体电穿孔进行表皮定向的基因转移	425
第 42 章	毛囊的基因及干细胞治疗	431

索引	443
----------	-----

彩图

第一部分 角质形成细胞和器官培养

第 1 章 小鼠角质形成细胞的原代培养

Annalisa Pirrone, Barbara Hager, Philip Fleckman

摘 要：小鼠表皮角质形成细胞通常难以在体外生长。在这一章，我们介绍从新生小鼠单一个体分离出的表皮角质形成细胞用于长期培养的一种方法。我们描述的实验方案对于从转基因或基因敲除小鼠收集细胞进行分离和分析尤其有用；解释了怎样利用添加成纤维细胞条件培养基和包被小鼠 IV 型胶原的培养皿来培养这些需要复杂营养成分的细胞并使其能够多次传代；叙述了怎样诱导培养细胞表达表皮分化后期阶段的标记，如果需要的话，可从小鼠取样现场运送全部小鼠皮肤用于培养。本章还介绍了一种用液氮长时间储存后仍能确保细胞高活力的深低温保存方法。目前从事表皮缺陷转基因小鼠或裸鼠生产的研究者应该关注本章详细描述的这些技术。

关键词：角质形成细胞；转基因；基因敲除；表皮分化；细胞培养；皮肤

1 导言

体外研究可以加强对表皮缺损转基因或基因敲除小鼠的分析。从转基因或基因敲除幼龄小鼠的单一个体分离出小鼠表皮角质形成细胞用于长期培养是这些研究的一个重要工具。为了成功地维持细胞生长和传代，小鼠角质形成细胞的培养需要添加成纤维细胞条件培养基、低钙环境及包被小鼠 IV 型胶原附着物的培养皿。在这一章中，我们描述了怎样制备小鼠角质形成细胞生长所必需的小鼠成纤维细胞条件培养基，以及怎样从新生小鼠个体的皮肤分离和培养细胞；介绍了用包被胶原的培养皿进行有效传代培养和诱导表皮分化晚期标记表达的技巧；提出了一种从小鼠取皮现场转运小鼠皮肤用于培养的方法和一个保持培养角质形成细胞储存物活性的低温保存方案。通过制作小鼠模型来寻求增加表皮分化研究手段的生物学家应该对本章所概括的各种操作方法有极大的兴趣。

2 材料

2.1 螯合处理的胎牛血清 (cFBS)

(1) Chelex 100 树脂 [钠, 200~400 目 (干燥), 75~150 μm 颗粒 (湿润); Bio-Rad, Hercules, CA, cat. no. 142-2842]; 每升 PBS 配制 200 g Chelex 100 树脂^[1]。

(2) Whatman Grade No. 1 滤纸 (Whatman, UK, cat. no. 1093-111) 和布氏漏斗 [备选, 见注意事项 (1)]。

(3) 无内毒素的 Milli-Q 去离子水 (18M Ω ·cm 的电阻率, 来自 Milli-Q Plus-UF 水系统或来自类似于 I 型水过滤系统的无内毒素水; Millipore, Bedford, MA)。当螯

合 1 L 的血清时, 每次洗涤可用 1.30 L 的无内毒素 Milli-Q 去离子水 (见 3.1.1)。

(4) Dulbecco 磷酸盐缓冲盐溶液 (D-PBS)^[2]: 0.2 g KCl, 0.2 g KH_2PO_4 , 8 g NaCl, 2.16 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 配制 1 L 的 1×D-PBS, 可将所有的干燥化学试剂加入 600 ml 的无内毒素去离子水中; 调节 pH 到 7.4, 加水定容到 1 L; 在层流通风橱中将溶液无菌过滤 (0.22 μm) 到无菌瓶中; 保存在 4℃。当整合的血清为 1 L 时, 每次漂洗可用 1.30 L 的 D-PBS (见 3.1.1)。

(5) FBS: 所有批次的血清都经过新生儿包皮角质形成细胞和大鼠表皮角质形成细胞系的最佳生长和分化检验 (文中所用批号为 “Premium”, 未热灭活; Atlanta Biologicals, Norcross, GA; cat. no. S11150)。

(6) 500 ml 的瓶顶过滤器: 直径 70 mm 的滤膜、初次过滤的滤膜孔径为 0.45 μm 和无菌过滤的滤膜孔径为 0.22 μm (Corning, Harrodsburg, KY, cat. no. 430512、no. 430521)。

2.2 原代成纤维细胞的条件培养基 (CM1)

(1) 新生小鼠 (0~2 d) [见注意事项 (2)]。

(2) 1 mol/L CaCl_2 溶液: 于无内毒素 Milli-Q 去离子水中溶解 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (FW 147.02); 0.22 μm 的无菌滤器过滤。

(3) 100 mm×15 mm 的细菌学培养皿 (BD Falcon Optilux™ 或类似型号; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ; cat. no. 351001)。

(4) Whatman Grade No. 1 滤纸 [见 2.1 第 (2) 条]: 剪成适合 100 mm 的培养皿; 用铝箔包在外面, 使用前高压灭菌。

(5) 70% 乙醇。

(6) D-PBS [见 2.1 第 (4) 条]。

(7) 加有 2% 抗生素/抗真菌素 (V/V) 的 D-PBS (抗生素/抗真菌素包括 10 000 U/ml 青霉素 G 钠、10 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 硫酸链霉素和 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 两性霉素 B; Invitrogen/GIBCO, Carlsbad, CA; cat. no. 15140-022)。

(8) 高钙培养基 (HCM): 100 ml 无氯化钙的 Eagle's 最低必需培养基 (EMEM) (含 Earles 平衡盐溶液、非必需氨基酸和 L-谷氨酰胺; Cambrex Biosciences, Walkersville, MD; cat. no. 06-174G), 8 ml FBS, 1 ml 抗生素/抗真菌素; 将 1 mol/L 的 CaCl_2 溶液加入到培养基中使其 Ca^{2+} 浓度为 0.6 mmol/L [见注意事项 (3)]。HCM 避光储藏在 4℃, 可达 1 个月之久。

(9) 低钙培养基 (EMEM.06): 100 ml 无氯化钙的 EMEM; 8 ml cFBS; 1 ml 的抗生素/抗真菌素; 将 1 mol/L CaCl_2 溶液加到培养基中使其 Ca^{2+} 浓度为 0.06 mmol/L [见注意事项 (4)]。于 4℃ 避光储藏, 可达 1 个月之久。

(10) 胶原酶溶液: 0.175 g 胶原酶 (粗制, I 型, 用于组织培养; Invitrogen/GIBCO; cat. no. 17100-017); 50 ml 199 培养基 (Invitrogen/GIBCO, cat. no. 12340030)。需要时新鲜配制, 用前应预热到 37℃。

(11) 0.25% 胰蛋白酶 (Invitrogen/GIBCO, cat. no. 15050-057): 需要使用的当天, 可解冻一个新鲜的分装量并保存在 4℃。