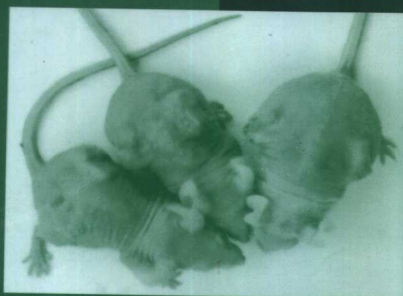
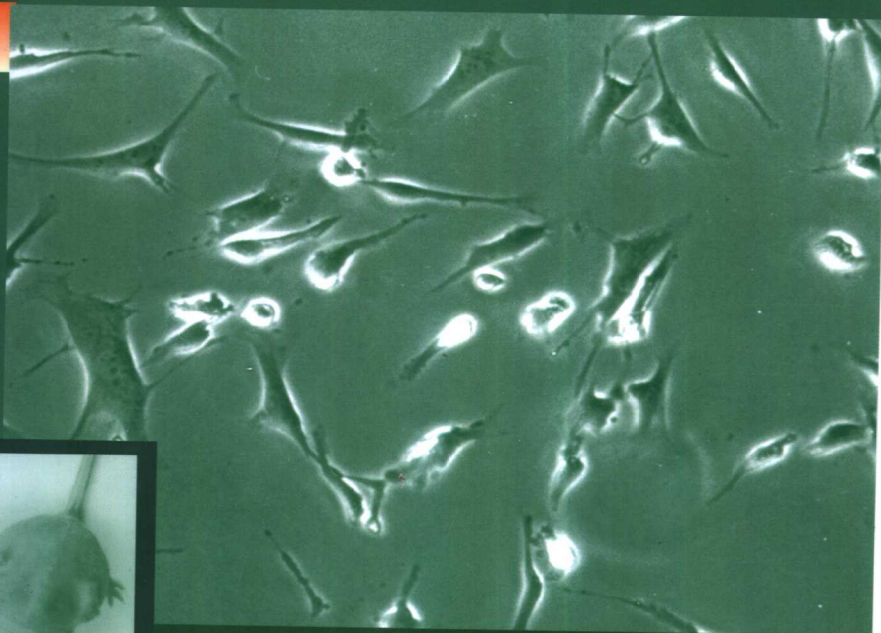


“十五”国家重点图书

现代生物技术丛书

组织工程

杨志明 主编



化学工业出版社

现代生物技术与医药科技出版中心

“十五”国家重点图书

现代生物技术丛书

组 织 工 程

杨志明 主编

化 学 工 业 出 版 社

现代生物技术与医药科技出版中心

·北 京·

(京)新登字 039 号

图书在版编目(CIP)数据

组织工程/杨志明主编. —北京:化学工业出版社,
2002.9

(现代生物技术丛书)

ISBN 7-5025-3965-4

I. 组… II. 杨… III. 人体组织学 IV. R329

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2002)第 051052 号

现代生物技术丛书

组 织 工 程

杨志明 主编

责任编辑:杨燕玲

责任校对:李 林

封面设计:于 兵

*

化 学 工 业 出 版 社 出版发行
现代生物技术与医药科技出版中心

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

发行电话:(010) 64982530

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

化学工业出版社印刷厂印刷

三河市延风装订厂装订

开本 787 毫米×1092 毫米 1/16 印张 23 $\frac{3}{4}$ 字数 563 千字

2002 年 9 月第 1 版 2002 年 9 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-3965-4/Q·25

定 价: 48.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者,本社发行部负责退换

“现代生物技术丛书”编委会

编委会主任 焦瑞身

编委会成员 (以姓氏汉语拼音为序)

郭礼和 中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所 研究员

贾士荣 中国农业科学院生物技术中心 研究员

焦瑞身 中国科学院上海植物生理生态研究所 研究员

伦世仪 江南大学 中国工程院院士 教授

俞俊棠 华东理工大学 教授

张树政 中国科学院微生物研究所 中国科学院院士 研究员

朱宝泉 上海医药工业研究院 研究员

本册主编与编写人员

主 编 杨志明

编写人员 (以姓氏汉语拼音为序)

Myron Spector 美国哈佛大学医学院骨科研究所 教授

蔡 晴 中国科学院北京化学研究所 博士

陈健琳 军事医学科学院 博士

郭子宽 军事医学科学院 博士

江飞子 军事医学科学院 博士

林 凡 四川大学华西医院组织工程实验室 讲师

刘晓丹 军事医学科学院 博士

罗静聪 四川大学华西医院组织工程实验室 讲师

吕双红 军事医学科学院 博士

秦廷武 四川大学华西医院组织工程实验室 副研究员

屈 艺 四川大学华西医学中心分子生物学研究室 博士

孙玉波 军事医学科学院 博士

王常勇 军事医学科学院 教授

王 浩 美国麻省理工学院材料科学与工程系 博士

王身国 中国科学院北京化学研究所 教授

夏庆杰 四川大学华西医院医学遗传学教研室 博士

项 舟 美国哈佛大学医学院骨科研究所 博士

解慧琪 四川大学华西医院组织工程实验室 博士

姚康德 天津大学 教授

杨志明 四川大学华西医院组织工程实验室 教授

张明伟 军事医学科学院 博士

序

建立在分子生物学、分子遗传学、生物化学、微生物学、细胞学以及化工、计算技术等基础之上的现代生物技术(生物工程),是20世纪后半期国际上突飞猛进的技术领域之一,它为人类保健、农牧业、食品工业、环境保护以及精细化工等产业的发展提供了前所未有的动力。展望新世纪,可以预料生物技术的前景更为光辉灿烂。本丛书将就该领域的研究动态逐个进行详细介绍,这里我们仅概述其突出进展与读者分享。鉴于各领域发展迅速和编者水平有限,丛书定有遗漏和不足之处,敬请读者指正。

一、基因组和后基因组学

人类基因组计划(HGP)正式启动于1990年,这是一个跨世纪、跨国界的最伟大的生命科学工程,经美、英、法、德、日、中6国的合作和努力,已于2001年完成全部序列测定。这一成就可以与原子弹计划和登月计划相媲美。它将对生命科学和人类健康产生巨大影响。应用各种技术,上千个与疾病相关的基因已被定位,并有近百个疾病基因被克隆。毫无疑问,这将为新药研究设计和疫苗制备提供依据,且已有多个物质进入临床试验。

与此同时,小家鼠、果蝇、线虫、拟南芥、水稻、啤酒酵母,以及多种真菌、细菌的基因组研究相继开展,其中拟南芥基因组的全序列测定业已完成。由于微生物的基因组远小于多细胞真核生物,且细菌和酵母基因中不存在内含子,因而便于分析,迄今已在酵母基因组中发现了一些与人类疾病基因同源的基因,研究这些基因在酵母中的生理功能,将有助于了解相关疾病的发病机理。

今天,一个崭新的领域——生物信息学迅速发展,它将基因的结构、蛋白质功能以及物种的进化在基因信息的基础上统一起来。这一学科的发展,对基因组和后基因组学研究及对人类健康和农业发展将产生深远的影响。

二、基因工程(重组DNA技术)

体外DNA重组技术始于1972年,首先在大肠杆菌中获得成功,继而扩展到其他微生物,生产出多种新型发酵产品。美国批准上市的基因工程产品有人类胰岛素、人类生长因子、白介素、干扰素、牛型生长激素疫苗等,并不断有新的品种进入临床应用。重组微生物的应用,也为高等生物作为表达外源基因的宿主提供了技术和经验,如哺乳动物细胞株、昆虫细胞株、转基因动物、转基因植物,都有可能作为生产需要糖基化的重组蛋白质的宿主。

我国基因工程研究起步较晚,自1986年“863”计划实施以来,生物技术药物的研究和产业化获得迅猛发展,至1998年已有14种基因工程药物、3个基因工程疫苗和数十个重组诊断试剂投放市场。

三、转基因作物及其他农业生物工程

农业生物技术中最重要的是转基因作物 (GMC)。近十年间 GMC 发展速度极快, 1996~2001 年全球 GMC 的种植面积增长了 30 倍。2000 年达 4 420 万公顷, 比 1999 年增长 11%, 2001 年又在 2000 年的基础上增长 19%, 达 5 260 万公顷。GMC 种植面积占相关作物全球种植面积的比例依次为: 大豆 46%、棉花 20%、油菜 11%、玉米 7%。

我国 GMC 的种植面积在 13 个国家中居第四位。国产转基因 Bt 抗虫棉的育成和推广, 开创了国内基因工程农业应用的成功范例, 仅 2001 年种植面积达 60 万公顷。抗虫棉的杀虫性强, 农药用量可减少 70%~80%, 既降低了用工成本, 又保护了环境。

继获得第一代 GMC (抗除草剂、抗虫、抗病等) 之后, 第二代转基因作物已呼之欲出, 重点是进一步改良作物品质, 提高其营养水平 (如“金稻米”等), 或以植物作为生物反应器生产医疗保健产品 (如口服疫苗等)。同时, 针对旱、涝、盐碱、低温等恶劣自然环境, 培育各类抗逆作物。

此外重组根瘤菌、重组联合固氮菌, 抗病杀虫重组微生物的开发和应用也取得了明显的成效。

四、克隆动物及转基因动物

动物体细胞克隆技术的发展为生产蛋白质类药物、器官移植、挽救珍稀濒危动物以及培育优良品种等奠定了基础。最近, Wilmut 等用山羊胚胎的核转入去核未受精的卵母细胞, 产生了克隆动物——Dolly 羊, 成为科学上的重大突破, 并在多种动物中得到重复。

转基因动物的成功引导了一种新型制药工业, 即利用转基因山羊、绵羊和乳牛的乳汁来生产治疗人类疾病的蛋白类药物。转基因动物发展的另一动向是克隆修饰的猪, 为人体器官移植提供外源器官, 以缓解临床上对人体器官的迫切需求。

体细胞克隆山羊在我国的上海市转基因研究中心及陕西的中国杨凌克隆动物基地都获得了成功。

五、细胞工程和组织工程

多年来我国植物组织培养和细胞工程研究在国际上是领先的。我国学者通过花药和花粉单细胞培养培育出烟草、水稻、小麦、大麦、油菜、甘蔗等作物的新品种、新品系, 种植面积逾 100 万公顷。脱病毒快速繁殖的主要作物有香蕉、马铃薯、甘蔗、木薯、香草兰、草莓、柑橘、苹果、葡萄、花卉和观赏植物。紫草、三七等植物细胞已可在发酵罐中大量培养。我国的传统中药涉及 5 000 种左右植物, 细胞培养是中药资源开发的一个重要方面。

我国学者在动物细胞工程方面也作出了重要贡献。例如亲缘关系远近不同的鱼类可进行各种核质组合, 在变种间、属间及科间都获得了具有独特性状的

核质重组鱼。

动物发育工程中另一重大进展是干细胞株的建立，这已成为国际上研究的热点。干细胞是指未充分分化、但具有再生为各种组织器官和个体潜在功能的细胞。血液干细胞能够分化、生成整个血液系统，用造血干细胞移植来治疗白血病和一些遗传血液病，是医学界正在探索的课题。最近，以色列科学家首次从胚胎干细胞培养出人类心脏组织，它可以正常跳动，并且有新生心脏组织的电特性和机械特性。波兰科学家用脐血干细胞成功地培育出了脑细胞，有可能被用于帕金森病、脑震荡等疾病的治疗和脑部损伤的修复。美国科学家最近成功地将胚胎干细胞分化成人类骨髓中的造血先驱细胞，并进一步培养成红血球、白血球和血小板。这些结果预示着人类有可能获得取之不尽的血源。我国科学家已成功地将干细胞体外培养成胃和肠黏膜组织，这是继利用干细胞原位培养皮肤组织全能修复之后，人类再生组织器官方面的又一重大成果。

六、环境生物工程

我国是环境污染较严重的国家，环境生物工程在防治各种污染中将起重要作用。众所周知，油轮海上倾油可引起大面积海域污染，国外虽采用“超级细菌”（含有多个降解烃类的质粒）进行海面浮油处理，但其效果尚有待改进。化学农药对土壤的污染虽可用具专一性降解能力的特种细菌处理，但作用也甚缓慢。相对而言，较为先进的方法是采用可被降解的生物农药。此外，河流、湖泊水体的污染防治、酸雨危害以及城市垃圾的处理等，也都是亟待解决的问题。

七、酶工程

酶工程是现代生物技术的重要组成部分，其特点是利用酶、含酶细胞器或细胞（微生物、植物、动物）作为生物催化剂来完成某些重要的化学反应。应用范围包括医药、食品、化学工业，诊断分析和生物传感器等。涉及的品种不少，诸如糖化酶、淀粉酶、洗涤用酶以及与 β -内酰胺抗生素生产有关的青霉素酰化酶、7-ACA酰化酶等，其市场需求、生产规模和产值均很可观，并已产生巨大的经济效益。随着酶的大量应用，各种酶反应器和固定化技术应运而生，更进一步地推动了酶工程的发展。

当代酶工程发展的趋势之一是寻找耐极端条件的酶，如耐高温、耐酸碱、耐盐等。这些酶存在于嗜高温、嗜酸碱、嗜高盐的细菌中。近年来对这些细菌的研究进展迅速，这将为酶工业提供源源不断的新型酶类。

八、新型能源和清洁能源的开拓

随着化石能源逐年减少，再生能源的研制开发已备受国际关注。虽然我国石油和煤炭储量丰富，但从长远考虑，还需对这一课题予以重视。展望未来，新型能源，特别是清洁能源的开发很有必要。

氢气是无污染的清洁能源，燃烧后不产生二氧化碳、硫、氮氧化物等有害物质，国外的燃氢汽车已研制成功。产氢的微生物甚多，值得重视的是光合细

菌，该菌可利用工业废水产氢，同时具有农用肥效的作用。

巴西和美国是燃料乙醇生产技术和商业应用比较成熟的国家。作物秸秆、废报纸等生物材料是生产再生能源的最廉价原料，所生产的燃料乙醇成本可低到每加仑 1.10 美元，虽然仍高于每加仑 0.80~0.90 美元的汽油批发价，但随着技术的改进，生产成本将会逐步降低。

九、新型生物传感器的研制

要研制新型生物传感器，需要新型的酶和生物材料，这些酶需能耐高温、酸、碱或低温。已发现的这类特殊生物材料有嗜盐细菌的紫膜，这是一种光敏材料，可转化光子为 ATP。另一个例子是磁细菌细胞中的微小磁石 (Fe_3O_4)，对细胞起导航作用。当代正竞相研制 DNA 芯片，以色列学者已用其建成简单的计算机。

生物传感器应用范围广泛，包括临床检测、免疫反应、反应罐过程检测、环保毒物检测等，不胜枚举。

十、生化工程

包括发酵工艺、过程检测与控制、反应模型建立、反应器的设计和应用，以及包括产品提取纯化、包装在内的下游加工工艺等方面，这是生物技术产业化的最后重要过程。

本丛书以应用生物技术为主，包括必要的基础知识和前景展望。丛书包括 15 个分册，即基因工程、蛋白质工程、酶工程、生物信息学、植物细胞工程、动物细胞工程、微生物工程、生物制药技术、高级生物传感器、环境生物工程、农业生物工程、糖生物工程、生物技术与疾病诊断——兼论基因治疗、组织工程、生物工程下游技术。

每册均由工作在第一线的专家撰写，概要阐述了国内外生物技术的进展和趋势。期望本丛书的出版能够对推动我国生物技术的研究开发及产业化作出微薄的贡献。

编者衷心寄语青年朋友，认识生物技术的光辉前景，祝愿你们以聪明才智为我国的生物技术作出创新贡献。

焦瑞身 曾士学

2002 年 1 月

本书序

“组织工程学”是20世纪80年代后期提出的一个新概念，它是在分子生物学、移植免疫学、细胞生物学、新型医学材料、临床医学等学科及基因技术、分子克隆技术、免疫隔离技术、大规模细胞扩增技术、体外组织构建技术等高技术迅速发展以后出现的新兴分支学科。其最终目标是将功能细胞与可降解三维支架材料（人工细胞外基质）在体外联合培养，构建成为有生命的组织或器官，然后植入体内，替代病损的组织，恢复其形态、结构和功能；或构建一个有生命的体外装置，用于暂时替代病损器官的一部分或全部功能；或以某些生物活性物质如生物活性因子、干细胞等植入体内，引导或诱导自身组织再生，达到修复组织结构，恢复组织、器官功能的目的。这是继20世纪科学家们解读人类基因密码之后，具有重大科学意义的又一事件，将会对生命科学、人类健康起到十分重要的作用，因此被认为“是一场意义深远的医学革命”。如果体外复制的人体组织、器官用于治疗病人，它将标志着“生物科技人体时代”的到来。在世界各国科学家的努力下，用体外构建的组织、器官、干细胞、生物活性因子治疗疾病的日子已经不太遥远了。20世纪90年代，美国FDA已批准组织工程皮肤及自体软骨细胞移植修复关节软骨部分缺损用于临床，并已达到产业化生产。还有一些产品已进入临床试用或临床前研究阶段，预计在21世纪的第一个十年中，将会有更多的产品被批准上市。

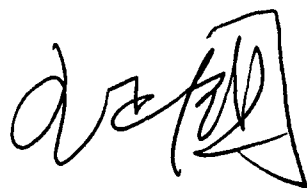
我国的组织工程研究与国外相比，在时间上的差距并不明显。由于我国政府的高度重视及科学家们的努力，除在深入的基础研究方面与国外相比存在一定差距外，在应用基础研究及临床研究方面与国外基本同步，在部分项目有领先于国际先进水平的成果。然而组织工程研究在我国毕竟只有10年左右历史，在形成具有中国特色的研究体系中，除了借鉴国外的研究经验之外，还急需符合中国国情、与国际接轨的参考书。在化学工业出版社的积极推动、组织和大力支持下，《组织工程》作为“现代生物技术丛书”的一个分册出版了，这是生物技术及相关专业的一件大喜事，也是该领域“与时俱进”的一项重大举措。

《组织工程》是我国第一部系统介绍组织工程研究、应用技术的著作，它由长期从事组织工程及相关研究的国内著名专家杨志明教授任主编，并由国内多年在第一线从事组织工程研究和应用的专家以及美国哈佛大学医学院和麻省理工学院的专家联合编写而成。全书共分20章，它以组织工程基本技术为主线，系统全面地介绍了组织工程细胞培养技术、细胞培养与生长因子的关系、细胞的基因改造、干细胞的定向分化培养技术、细胞形态和功能的检测技术、细胞包埋技术、生长因子的控制释放技术、细胞示踪技术、天然细胞外基质制作技术、人工合成细胞外基质技术、复合型人工细胞外基质制作技术、细胞与细胞外基质的联合培养技术、动物体内植入技术、植入体内的测试技术、组织工程的分子生物学技术、组织工程化组织的临床应用技术等方面的内容，最后还对组织工程今后的发展和需要研究的问题作了分析讨论。

全书具有以下特点：(1) 首次在国内系统地介绍组织工程各个领域的技术操作。(2) 作者均为第一线从事组织工程的研究者，以他们的实践经验，结合国内外新技术，使本书不仅具备可读性，更具有可操作性。(3) 由于组织工程学是多学科交叉，多种高新技术的综合应

用的产物，首次尝试不同学科专家的交叉与结合，尽量做到知识的融合。(4) 在国内外首次介绍了以下新技术①用转基因技术建立组织工程用标准细胞系的技术，使研究工作更具可比性、科学性，并具有产业化前景；②强调在不同组织构建中，应采用不同的支架材料，首先应用生物衍生材料作为组织工程的人工细胞外基质，不仅用于研究，也用于临床；③首次用短串联重复位点基因检测技术，对植入人体的组织进行了基因检测，在国内外首次证明植入人体的同种异体细胞能长期成活，并发挥生理功能；④首次系统地介绍了临床应用技术，临床评价技术及数 10 例临床应用的结果。正如主编杨志明教授所说，由他主编的另一本专著《组织工程基础与临床》主要阐述有关组织工程的基础理论和临床应用的基础知识，可称为“基础篇”；而本书以实用为主，主要介绍有关组织工程的操作技术，可称为“技术篇”，两本专著相辅相成，相得益彰，由此使得组织工程学的内容更加丰富完整。我深信，它对推动我国组织工程学的发展将会起到积极的作用，同时，对组织工程研究人员和临床医生也会有很大帮助。专业人员阅读此书后一定会和我一样受益匪浅。

中国工程院院士



二〇〇二年四月七日

前 言

组织工程是在 20 世纪 80 年代正式提出来的一个新概念。其基本内涵是综合应用工程学和生命科学的基本原理、基本理论和基本技术，将分离培养的高密度功能细胞，接种在可降解三维支架材料上。支架材料作为人工细胞外基质，为细胞的停泊、生长、繁殖提供生存空间及获取营养、进行新陈代谢的场所，细胞则为支架材料提供生命源泉。经过体外培养后植入体内组织缺损，在支架材料降解过程中，细胞所分泌的基质逐渐替代支架材料，形成新的细胞外基质。在体内正常的营养环境及生物力学条件下，逐渐发育成为成熟的组织，达到修复缺损、替代组织、器官的一部分或全部功能的目的；或作为一种有生命的体外装置，暂时替代器官的部分功能，达到提高生存质量、延长生命活动的目的。由于组织工程学的内涵极为丰富，涉及到生命科学的一些重大问题，是在体外“复制”生命，因此具有十分重要的科学意义，被誉为“再生医学的新时代”。

我国的组织工程学研究始于 20 世纪 90 年代初，与国外相比，在起步时间上的差距只有 3~4 年，以国家基金资助进行研究。在 10 多年时间里，发展极为迅速，已涉及人体各个组织、器官的工程化制造。有的正在进行深入的基础研究，有的已进入临床试验阶段。这是因为组织工程学的研究目标是为病人提供一种在体外构建的有生命的种植体，植入体内后，能与受体组织融为一体，参与新陈代谢，修复组织缺损，重建组织、器官功能。这种治疗方法不同于任何人工材料替代，因为它是一种有生命的组织，同时也避免了切取自体组织修复的附加损伤，因此受到广大临床医生及伤病员的极大欢迎。这一新技术的应用有可能成为外科治疗的一种新模式。然而有关组织工程研究，应用技术的专著极少。为了将组织工程学的基本原理、基本技术介绍给广大科学工作者及临床医生，在化学工业出版社的组织下编写了《组织工程》，作为“现代生物技术丛书”中的一个分册出版。

《组织工程》与我们在 2000 年编写的《组织工程基础与临床》一书不同，《组织工程基础与临床》主要阐述组织工程研究的一些基础理论，临床应用基础知识，可以称为“基础篇”。而本书以实用技术为主，主要介绍组织工程研究技术及临床应用技术及其相关知识，可以称为“技术篇”。全书包括了组织工程研究的主要技术，如细胞培养技术、人工细胞外基质制作技术、组织构建技术、分子生物学技术、各种检测技术等。虽然有些技术在别的参考书中也可以见到，但本书是从组织工程学的角度撰写，具有新颖性。

参加编写这部书的作者来自美国的哈佛大学医学院、麻省理工大学及国内多个单位，各章节的作者如下：第一章由美国哈佛大学医学院骨科研究所 Myron Spector 教授编写；第二、三章由四川大学华西医院组织工程实验室解慧琪博士编写；第四章是由四川大学华西医院组织工程实验室秦廷武副研究员编写；第五章由军事医学科学院王常勇教授、吕双红、孙玉波博士编写；第六章由四川大学华西医学中心分子生物学研究室屈艺博士编写；第七章由军事医学科学院郭子宽博士及刘晓丹、张明伟、陈健琳、江飞子博士编写；第八章由四川大学华西医院组织工程实验室林凡讲师编写；第九、十章由中国科学院化学研究所王身国教授、蔡晴博士编写；第十一章由四川大学华西医院组织工程实验室罗静聪讲师编写；第十二章由美国麻省理工学院材料科学与工程系王浩博士编写；第十三、十四章由天津大学姚康德

教授编写；第十五、十六、十九及二十章由四川大学华西医院组织工程实验室杨志明教授编写；第十七章由美国哈佛大学医学院骨科研究所项舟博士编写；第十八章由四川大学华西医院医学遗传教研室夏庆杰博士编写。这些作者都是长期在第一线从事组织工程研究的专家，编写这部书是将他们多年的研究经验总结而成，有些资料尚未在杂志上发表，因此这部书的内容有很大创新性，相信这部书的出版会对我国组织工程学的深入研究起到“推波助澜”的作用。由于参加编写的作者来自国内外多个单位，对组织工程技术的应用体会、经验一定存在差异，因此难免出现诸多缺点、错误，恳请读者指出，以便再版时改正。

在这本书的编写过程中，得到中国工程院院士、重庆第三军医大学野战外科研究所王正国院士的大力支持和指导，在书稿完成之后，又请王院士审阅，提出了十分中肯的意见。根据王院士的意见，又再次进行了修改补充，在此表示衷心感谢。

本书能够顺利出版，除了各位作者的辛勤劳动以外，还得到四川大学华西医院领导的关怀和指导以及《中国修复重建外科杂志》编辑部和四川大学华西医院修复重建外科研究室、组织工程实验室全体人员的大力支持和热情参与，特致衷心感谢！

杨志明

2002年3月于四川大学华西医院

内 容 提 要

“现代生物技术丛书”是化学工业出版社重点策划、隆重推出的一套精品图书，已被新闻出版总署列为“十五”国家重点图书。该套书由我国著名生物技术专家焦瑞身先生担任编委会主任，各相关领域科研、教学、产业一线具有权威性的专家学者共同撰写。

《组织工程》是我国第一部组织工程研究、应用技术的专著。由国内多年在第一线从事组织工程研究与应用的专家以及美国哈佛大学、麻省理工学院的专家联合编写而成。本书是将他们多年的研究经验和成果总结而成，书中有些资料尚未在杂志上发表，因此本书的内容有很多创新性。全书围绕组织工程的基本技术，深入介绍了种子细胞的培养、细胞的基因改造、细胞与生长因子、细胞的检测、人工细胞外基质的制作和改性处理、工程化组织的体外构建、体内植入技术以及临床应用等技术，从这点上看本书是一部理论联系实际、以实用技术为主的著作。

本书可供医学、组织工程、相关生物技术研究领域和理工科的研究人员，临床医师及有关专业的大专院校师生阅读和参考。

目 录

第一章 概述	1
第一节 组织工程学的基本概念	1
第二节 组织工程的内容及发展.....	2
一、发展.....	2
二、组织工程和再生医学.....	2
三、组织工程支架材料.....	3
四、弹性模量在促进骨再生的生物材料中的作用.....	3
五、支架材料对拮抗细胞引发的收缩的作用.....	4
六、添加基因的支架材料.....	4
第三节 组织工程展望.....	5
一、组织工程,再生医学和基因治疗所用材料的未来.....	5
二、力学负载对细胞功能的影响.....	5
三、组织工程的未来.....	5
参考文献.....	5
第二章 组织工程细胞培养基本知识	7
第一节 细胞培养实验室的建立.....	7
一、细胞培养室的功能划分.....	7
二、细胞培养的设备 and 器具.....	8
第二节 培养用液	11
一、水、缓冲溶液与平衡盐溶液	11
二、培养液	13
三、体外培养的其他常用液	16
第三节 原代培养和传代培养	18
一、原代培养的过程	18
二、传代培养的过程	22
第四节 细胞培养的基本方法和技术	23
一、二倍体细胞培养法	23
二、中空纤维细胞培养技术	24
三、微载体细胞培养法	24
四、微囊培养技术	27
第五节 培养物的冻存与复苏	27
一、原理	27
二、冷冻保存方法	28
三、冻存细胞的复苏	29
第六节 培养物的污染	30

一、微生物污染的判断	30
二、污染的预防	31
三、污染的排除	32
参考文献	32
第三章 常用组织细胞的培养技术	34
第一节 上皮组织的细胞培养	34
一、上皮组织细胞体外生长的特殊条件	34
二、表皮细胞的体外培养	35
三、血管内皮细胞的体外培养	37
四、食管黏膜上皮细胞的培养	39
五、肠黏膜上皮细胞的培养	40
第二节 结缔组织的体外培养	41
一、成纤维细胞的体外培养	41
二、前脂肪细胞的培养	43
三、骨髓间充质干细胞的体外培养	44
第三节 骨与软骨组织的体外培养	45
一、成骨细胞的培养	46
二、破骨细胞的培养	49
三、软骨细胞的培养	51
四、滑膜细胞的培养	53
第四节 肌肉组织的体外培养	55
一、骨骼肌细胞培养所需主要材料	55
二、啮齿类动物骨骼肌细胞原代培养方法	56
三、从啮齿类动物肌肉中获取高纯度肌源性细胞的方法	59
第五节 神经组织的体外培养	60
一、大鼠小脑皮质神经元的体外培养	60
二、大鼠星形胶质细胞的体外培养	62
三、大鼠雪旺细胞的体外培养	64
参考文献	66
第四章 应力场与细胞生长	69
第一节 概述	69
第二节 微重力细胞培养	69
第三节 可变应力场细胞培养	70
一、应力场细胞培养方法	70
二、应力场对细胞结构和功能的影响	71
三、应力场三维细胞培养实例	73
第四节 旋转培养系统	77
一、旋转培养系统及其特点	77
二、旋转培养系统的分类	78
三、旋转培养系统的应用范围	80

四、旋转培养系统应用的局限性	81
参考文献	81
第五章 细胞培养与生长因子	82
第一节 概述	82
一、骨形成蛋白	83
二、表皮生长因子	83
三、成纤维细胞生长因子	83
四、转化生长因子- β	83
第二节 IGF-I 与细胞生长	84
一、概述	84
二、IGF-I 及 IGF-IR 的生物学功能	85
第三节 bFGF 与细胞生长	86
一、基本概况	86
二、bFGF 的生物活性	87
第四节 BMP 与细胞生长	89
一、概述	89
二、BMP 成熟蛋白分子结构的研究	90
三、BMP 的理化特性	91
四、BMP 与细胞生长相关的生物活性	91
五、BMP 的靶细胞	93
第五节 TGF- β 与细胞生长	94
一、概述	94
二、TGF- β 膜受体	94
三、TGF- β 的生物学作用	95
第六节 VEGF 与细胞生长	97
一、概述	97
二、VEGF 表达及生成的调节相关因素	97
三、VEGF 的生物学特性	99
四、VEGF 对机体的作用	99
第七节 EGF 与细胞生长	100
一、EGF 的分离纯化	101
二、EGF 受体与基因	101
三、EGF 的生物学作用	101
第八节 生长因子促细胞生长的调控	104
一、磷脂酶 C 的磷酸化及活化	105
二、PKC 的活化	105
三、对其他活性蛋白的磷酸化和活化	105
参考文献	106
第六章 细胞的基因改造	107
第一节 概述	107

第二节 细胞寿命与细胞周期调控	108
一、CDKs、cyclin、CKIs 三家族	108
二、细胞周期的其他调控因素	109
三、正常细胞的限制点与 G/S 转换	111
四、S 期和 M 期的检控点	112
第三节 细胞增殖寿命的延长	112
一、导入病毒癌基因延长细胞寿命	112
二、端粒酶与细胞寿命	114
三、恶性表型的控制	116
第四节 种子细胞的功能基因转染	117
一、皮肤细胞功能的改造	117
二、肌细胞基因改造	117
三、神经细胞功能基因转染	118
第五节 细胞基因改造常用技术	118
一、基因转移系统	118
二、端粒酶活性测定	121
参考文献	121
第七章 干细胞培养技术	123
第一节 几种研究热点干细胞概述	123
第二节 人骨髓间充质干细胞的分离培养	126
一、人骨髓间充质干细胞的分离培养	126
二、人骨髓间充质干细胞鉴定	127
第三节 小鼠肌肉干细胞的分离培养及分化技术	130
一、成肌细胞的分离培养	130
二、肌肉源间充质干细胞的分离培养及鉴定	131
第四节 神经干细胞的分离培养及鉴定	132
一、小鼠室管膜细胞源神经干细胞的分离培养	132
二、分离、培养星形胶质细胞来源的神经干细胞	132
三、神经干细胞的鉴定	133
第五节 造血干细胞的分离纯化、体外培养及多向分化	133
一、造血干细胞的识别及分离原则	133
二、免疫磁珠阳性分选法	134
三、造血干/祖细胞的体外测定	134
第六节 小鼠胚胎干细胞的体外培养及分化实验技术	138
一、小鼠 ES 细胞的培养	138
二、ES 细胞多向分化的基本原则	139
三、ES 细胞向造血细胞的分化诱导技术	140
四、ES 培养及分化实验过程中常见的问题及处理方法	141
五、ES 细胞向其他细胞分化常用的诱导剂	141
参考文献	142