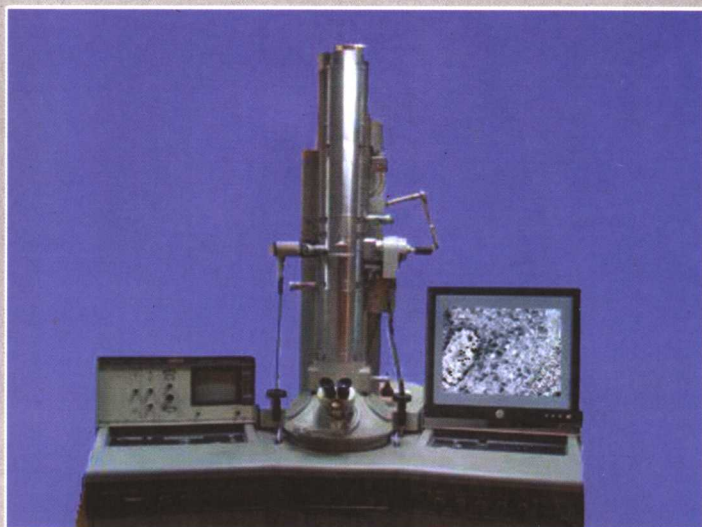


组织胚胎学实验技术

成林 编著



组织胚胎学实验技术

成林 编著

辽宁科学技术出版社

沈 阳

图书在版编目(CIP)数据

组织胚胎学实验技术 / 成林编著. —沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2005. 11

ISBN 7-5381-4590-7

I. 组... II. 成... III. 人体组织学: 人体胚胎学-实验 IV. R329. 1-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 122326 号

出版发行: 辽宁科学技术出版社

(地址: 沈阳市和平区十一纬路 25 号 邮编: 110003)

印刷者: 鞍山市天和印刷有限公司

经销者: 各地新华书店

幅面尺寸: 210mm × 285mm

印 张: 5

字 数: 100 千字

印 数: 1~3000

出版时间: 2005 年 11 月第 1 版

印刷时间: 2005 年 11 月第 1 次印刷

责任编辑: 唐丽萍

封面设计: 郑 红

版式设计: 于 浪

责任校对: 王春和

定 价: 9.00 元

联系电话: 024-23284360

邮购热线: 024-23284502 23284357

E-mail: lkzsb@mail.lnpgc.com.cn

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

前 言

随着现代科学技术的发展,组织胚胎学实验技术也在不断发展和进步。组织胚胎学实验技术综合了光学显微镜技术、电子显微镜技术和生物学技术等学科的实验技术。当代组织胚胎学技术在不断地改良已有的各种技术的同时,又出现了大量新发明的仪器和相关技术。

本书从一个全新的角度展示了现代组织胚胎学的实验技术。从活体组织到固定组织的实验技术,既包括了组织胚胎学的基本实验技术,又展示了组织胚胎学实验技术的前沿领域,如干细胞技术、组织工程和多种新仪器及相关技术(如共聚焦显微技术、扫描隧道显微镜技术、显微操作器技术和图像分析技术)等。

本书的出版旨在为从事医学基础研究的工作者抛砖引玉,同时也为组织胚胎学的实验教学提供必要的资料。由于时间仓促,错误之处敬请指正。

编著者

2005年8月

目 录

第一篇 活体组织实验技术

第一章 组织培养	1
第一节 组织培养基本知识	1
第二节 人体组织培养技术	4
第三节 胚胎体外联合培养	7
第二章 人体组织中干细胞的分离和培养	8
第一节 人体干细胞的生物学基础	8
第二节 干细胞的分离和培养技术	9
第三节 干细胞的诱导分化	11
第三章 组织工程	12
第一节 组织工程的概念	12
第二节 组织工程的内容	12
第三节 组织工程技术	13

第二篇 固定组织实验技术

第一章 标本制作技术	17
第一节 标本制作的基本原理	17
第二节 标本制作技术	19
第二章 显微镜技术	24
第一节 光学显微镜技术	24
第二节 电子显微镜技术	27
第三节 其他技术	29

第三章 组织胚胎的形态观察	31
第一节 显微镜的结构和使用	31
第二节 细 胞	32
第三节 上皮组织	34
第四节 结缔组织	35
第五节 肌组织	37
第六节 神经组织	38
第七节 消化系统微细结构	39
第八节 呼吸系统微细结构	42
第九节 泌尿系统微细结构	44
第十节 生殖系统微细结构	45
第十一节 内分泌系统微细结构	47
第十二节 皮肤微细结构	48
第十三节 心血管系统微细结构	50
第十四节 淋巴器官微细结构	51
第十五节 人体胚胎发育	53
第四章 组织胚胎学绘图	57
参考文献	74

第一篇 活体组织实验技术

第一章 组织培养

第一节 组织培养基本知识

组织培养是生物科学和医学等领域进行科学研究时的一种常用技术。通过组织培养使分离的细胞、组织和器官在体外人为环境下生长、繁殖。组织培养技术的优点是体外培养的细胞、组织和器官不受机体复杂因素的影响, 比较容易进行观察和研究。但是由于组织培养需要无菌环境, 所以准备工作要严格、充分。

一、培养前准备

在培养前应该先对所用器材进行清洗和消毒, 还要准备好细胞生长需要的各种培养基。

(一) 器械的清洗和消毒

1. 未使用过的玻璃器皿

先用清水洗, 再浸入肥皂水, 煮沸后刷洗, 再流水冲洗。除净肥皂后用蒸馏水浸洗, 烘干。用纸包装, 瓶类、试管等要先用棉花塞紧瓶口(管口), 再包装。将包装好的玻璃器皿放入电热干燥消毒箱消毒(120℃, 2h)。

2. 金属器械

先用70%的乙醇擦拭, 干后盛于金属盒内, 再放入电热干燥消毒箱与包装好的玻璃器皿一起消毒。

3. 实验服、橡皮塞和生理盐水等

高压蒸汽消毒, 1.5个大气压, 20~30min。

(二) 工作室的消毒

在进行培养操作前, 用5%的苯酚喷射全室, 再用紫外线照射30min。或使用空气过滤操作间。

工作人员进入工作室前先用肥皂刷洗双手, 穿戴消毒衣、帽和口罩, 换固定干净的拖鞋, 再进入工作室。操作前用70%的酒精棉擦手。

(三) 培养基的制备

培养基是细胞、组织和器官体外培养的主要环境。培养基提供给细胞、组织和器官生长、繁殖所需的营养。培养基的种类繁多, 根据状态不同可分为固体培养基和液体培养

基; 根据来源不同可分为天然培养基和合成培养基。

1. 常用的培养基

- (1) 199培养液 为基础培养液
- (2) MEM (Eagle) 培养液 为基础培养液
- (3) RPMI1640培养基 适合多种细胞培养
- (4) DMEM培养基 是改良的MEM培养基
- (5) F12培养基 适合单细胞培养

2. 培养基的选择

不同的细胞对培养基的要求不同。例如, 培养成纤维细胞可选用MEM培养基或DMEM培养基, 培养软骨细胞可选用F₁₂培养基。

3. 血清的添加

培养基的营养成分主要有各种氨基酸、多种维生素、矿物质、糖类、辅酶、嘌呤、嘧啶、生物素、多种核酸和核苷酸等, 营养齐全。但因为没有天然血浆中的生长因子、黏附因子等, 培养细胞很难繁殖, 也没有贴壁现象, 所以要在培养基中加入适量的血清。

(1) 添加血清的比例 血清可以促进细胞增殖, 使细胞贴壁, 还有一定的解毒作用。根据培养目的的不同, 在培养基中添加适当比例的血清, 以达到培养细胞的目的。

①用于促进细胞生长、增殖的培养基

血清10%~20%, 培养基80%~90%。

②用于维持细胞存活的培养基

血清5%左右, 培养基95%左右。

(2) 血清的选择 一般常用同种血清。来源容易、价格便宜的血清有人胎盘血清、小牛血清和马血清等。

4. 生理盐水

生理盐水的主要成分是无机盐、碳酸氢钠和葡萄糖等。它是用于配制各种培养基的液体, 具有稀释、缓冲和维持一定渗透压等作用。一般常用的有Tyrode氏盐液、Hanks平衡盐溶液、Earle平衡盐溶液、Dulbecco PBSA (CMF) 无钙、镁的平衡液。

二、设备和仪器

工作室最好分为三间: 配液间、准备间和培养间。

配液间设置天平、pH计、磁力搅拌器、蒸馏器、试剂柜和包装台等。准备间设置烤箱、高压锅、贮品柜1 (未消毒) 和贮品柜2 (已消毒) 等。培养间设置紫外线灯、O₃消毒杀菌机。

三、培养方法

(一) 取材

1. 取实验动物组织

常用鼠胚或成体组织、鸡胚等。鼠胚是最常用的培养材料, 鼠胚取材方便。鼠是哺乳

动物，与人类相近，生长效果好。

用引颈法杀死小鼠。一只手捏住鼠颈，另一只手捏住鼠尾，同时向相反方向拉，直至小鼠死亡为止（取脑或脊髓组织用其他方法）。然后把整个小鼠浸入75%的乙醇溶液中，放置2~3s进行体表面灭菌。浸入时间不宜过长，时间过长乙醇会从鼠口或其他孔进入体内，影响组织活性。取出小鼠，控掉乙醇后，放在消毒纱布或纸巾上。用尖剪刀在小鼠的胸部将皮肤环形剪开，用止血钳分别夹住两侧皮肤，向头尾两侧拉，把小鼠翻包起来，露出胸腹部，剖出鼠胚或其他组织，放置于无菌培养皿中备用。

2. 取人体组织

人体皮肤比较容易获得。从自愿者身上取材时先用肥皂水将健康皮肤刷洗干净，再用75%的乙醇擦拭。用消毒刮皮刀刮取直径1cm的表皮，放置于无菌培养皿中备用。术后伤口自然愈合，不会留下显著瘢痕。

取材后最好立即分离培养，如果不能立即分离培养，应放在培养液中，4℃保存，放置时间不宜超过24h。放置时间过长，细胞易死亡。取材过程应在无菌条件下进行。取材的供体情况、组织种类和取材时间等要详细记录下来。

(二) 细胞的分离

1. 将取得的组织小块移入小烧杯内，用消毒剪剪成1mm³碎块，加入4℃的0.25%胰蛋白酶溶液（组织与消化液的比例为1:3）。在0℃的冰箱内消化6~7h，并时常搅动。或用胶原酶（0.1%~0.3%mg/ml）36~37℃，4~48h，不用搅动。

2. 用100目网眼的不锈钢网滤过，去除未消化的组织块。

3. 800r/min离心10min，去除上清液，用4℃的CMF平衡液清洗。

4. 再以600r/min离心2min，去除上清液。加入培养液，用吸管轻轻吹吸，制成细胞悬液。

5. 取一滴细胞悬液移到计数板上，用台盼蓝染色。

6. 镜检、计数。

7. 调节细胞浓度到 10^6 /ml，以备培养。

(三) 培养

1. 原代培养

取分离好的细胞悬液，分别移入多个培养瓶内，塞好瓶塞。倾斜着置放于35℃培养箱中培养。每天镜检一次，2d换新鲜培养基一次，5~7d长成单层细胞，即细胞贴瓶壁增殖、扩展，占满瓶壁。细胞的这种贴瓶壁生长的现象，称为贴壁，贴壁生长的细胞，称为贴壁细胞。

2. 传代培养

原代培养成功后，去除旧培养液，用PBS液清洗，加入消化液。显微镜观察，当细胞间隙增大时，停止消化。吸出消化液，加入新鲜培养液，冲洗净消化液。用吸管轻轻吹吸瓶壁上的细胞，直至成为细胞悬液。移入离心管进行离心。弃上清液，加入培养液吹吸制成悬液。计数细胞，调节细胞浓度，分装培养。

第二节 人体组织培养技术

一、内皮的组织培养

(一) 器械

外科手术刀、剪刀、导管（管径大小可插入注射针头）、止血钳、线绳、烧杯、注射器、吸管、离心机、培养箱、倒置显微镜。

(二) 试剂

1. Hanks液（不含钙和镁）
2. Dulbecco改良磷酸缓冲液（DPBS, Irvine Scientific Santa Anna, Ca）
3. 1%CaCl₂-DPBS滤液
4. 0.2%胶原酶-DPBS滤液
5. L-谷氨酰胺
6. 青链霉素
7. 199培养液
8. 胎牛血清
9. 0.05%胰蛋白酶-Hanks液
10. 肝素
11. 0.2%明胶-DPBS液

(三) 工作室和实验用品消毒

用5%的苯酚喷射全室，再用紫外线照射30min。

对所有实验用品进行常规消毒，备用。

(四) 取材

胎儿脐带可从医院获得，取至少20cm长的脐带，用消毒棉布双层包好，放入塑料袋内。如不能立即使用，可放入冰箱4℃保存，最好不超过2d。

(五) 操作前的消毒

实验人员进入工作室前先用肥皂刷洗双手，穿上消毒衣，戴上消毒帽和口罩，换固定干净的拖鞋，从塑料袋中取出脐带包，剥去外层棉布带入工作室。操作前用70%的酒精棉擦手。

(六) 分离内皮细胞

1. 插管和清洗

(1) 插管 将脐带包置于操作台上，打开。用消毒脱脂棉擦去脐带外的血。从消毒的器械包中取出剪刀，将脐带的一端剪去1cm。从新断面上可见3条血管，其中两条管径较小的是脐动脉，一条管径较大的是脐静脉。立即将导管插进脐静脉，深约3cm。用线绳在有导管处的脐带外扎紧。

(2) 清洗 用注射器通过导管向脐带内注射Hanks液，缓缓冲洗脐带，冲洗物从脐带

的另一端流出,用废液瓶收集,直到流出清澈注射液为止。

2. 分离和采集内皮细胞

(1) 内皮细胞的分离 冲洗脐带后,用注射器通过导管向脐带内缓缓注射0.2%胶原酶溶液,同时观察流出液是否清澈,当流出液清澈时立即用止血钳夹住脐带末端。继续注射,到脐带内灌满胶原酶溶液为止。静置消化30min,同时要防止消化液从注射端流出。

(2) 内皮细胞的采集 在脐带夹止血钳的一端接一个烧杯。消化完成后,松开止血钳,让流出液流入烧杯。同时用注射器通过导管向脐带内注入Hanks液,分两次注入,每次20ml。冲洗剩余的消化液,接入烧杯内。将烧杯内的采集液装入50ml的离心管内,弃掉烧杯底部的残渣。700r/min离心10min。弃掉上清液。加入10ml199-胎牛血清培养液,用吸管反复吹打沉淀,制成悬液。

(七) 培养

1. 原代培养

将制成的悬液全部移入培养瓶中,放入培养箱37℃培养,每天更换一次新鲜的培养液。一般3~4d贴壁内皮细胞汇合。

2. 传代培养

(1) 传代培养基的制备 在0.2%明胶-DPBS液中加入内皮细胞生长素 (biomedical technologies, Stoughton, MA),使内皮细胞生长素的浓度达到0.025mg/ml。再加入肝素,使肝素浓度达到0.09mg/ml。在培养皿内加入此溶液到刚好覆盖培养皿底为止。37℃放置备用。传代培养基要在接种当天制备。

(2) 接种 镜下观察,在贴壁内皮细胞汇合达到75%时,轻轻倒掉培养液,加入DPBS液,再轻轻倒掉。然后加入0.05%胰蛋白酶-Hanks液。镜下观察,当内皮细胞从瓶壁脱离时,加入细胞培养液,摇匀,放入离心管离心。离心后弃上清液,加入培养液,制成悬液,接种到传代培养基上。放入培养箱37℃培养,6~7d贴壁内皮细胞汇合。在内皮细胞汇合达到75%时,可再做传代培养。

二、子宫内膜的组织培养

(一) 器械

外科剪刀、三角烧瓶、250 μ m尼龙网、38 μ m筛网、吸管、多孔培养板、离心机、培养箱、倒置显微镜。

(二) 试剂

1. 生长培养液 (pH值7.2~7.4)

RPM1640 (GIBCO产品),其中HEPES25mol/l,100mg/ml灭活胎牛血清10%~15%,庆大霉素50U/ml,两性霉素3U/ml

2. 细胞消化液 (pH值7.5)

胶原酶 I A (Sigma产品)、DNA酶 I (Boehringer Mannheim产品)。用Hanks液配制成胶原酶 I A 2.5g/l, DNA酶 I 0.2g/l。

3. 雌二醇 (E_2)、孕酮 (P)、睾酮 (T) (Sigma产品)

将上述三种药品溶解于二甲基亚砷 (DM_2SO) 中配成浓缩液。用时加入培养液中稀释100倍。

4. Hanks液

其中庆大霉素100U/ml, 两性霉素B5U/ml。

5. 单克隆抗体角蛋白 (keratin)

6. 丙酮

(三) 工作室和实验用品消毒

用5%的苯酚喷射全室, 再用紫外线照射30min。对所有实验用品进行常规消毒, 备用。

(四) 取材

标本来源于医院妇产科, 育龄妇女因不孕症做诊断性刮宫而获得子宫内膜。在无菌条件下取内膜组织, 立即投入盛有10ml培养液的无菌瓶中, 低温条件下迅速转移到实验室进行分离培养。

(五) 操作前的消毒

实验人员进入工作室前先用肥皂刷洗双手, 穿上消毒衣, 戴上消毒帽和口罩, 换固定干净的拖鞋。

(六) 分离细胞

在无菌操作的条件下将内膜组织用Hanks液冲洗3次, 去除组织血块和黏液, 将内膜剪碎成 1mm^3 小块, 置入三角烧瓶中, 注入10ml细胞消化液, 37°C 水浴中消化约4min, 制成细胞悬液。再用 $250\mu\text{m}$ 尼龙网过滤, 以除去未消化尽的组织。再用 $38\mu\text{m}$ 筛网过滤, 分离间质细胞和腺上皮细胞, $38\mu\text{m}$ 筛网以下主要是间质细胞, $38\mu\text{m}$ 筛网以上主要为腺上皮细胞。用Hanks液将 $38\mu\text{m}$ 筛网以上的腺上皮细胞团冲洗下来, 收集冲洗液, 500r/min 离心5min, 弃上清, 向沉淀物中加入Hanks液漂洗, 再离心。如此漂洗2次, 最后向沉淀物中(主要含腺体细胞)加入培养液, 用吸管吹打, 制成悬液。

(七) 培养

1. 常规的培养方法

将腺上皮细胞按400个/ cm^2 接种于培养瓶中, 放置在 37°C 的5% CO_2 恒温培养箱中培养, 每天更换生长培养液, 以除去未贴壁的腺细胞和血细胞。每天在倒置显微镜下仔细观察每瓶细胞生长情况至少一次, 详细记录细胞变化。培养至贴壁细胞汇合需要3~4d时间。

2. 纯化的培养方法

根据间质细胞与上皮细胞贴壁时间不同, 我们在常规培养的基础上进行纯化培养。细胞接种培养90~120min后, 贴壁的细胞大部分为间质细胞。然后将悬浮的细胞及上皮细胞团吸出转移到另一培养瓶中, 放置在 37°C 下5% CO_2 培养箱内培养, 每天更换培养液一次。贴壁细胞全部汇合需要5~7d时间。培养期间每天在倒置显微镜下观察每瓶细胞生长情况至少一次, 详细记录细胞变化, 必要时用数码照相机及时拍照。

3. 子宫内膜腺上皮细胞鉴定

取少量已分离的腺上皮细胞团作细胞直接涂片, 待自然晾干后用冷丙酮固定10min,

冰箱4℃保存,待作免疫组化分析;在多孔培养板中放入盖玻片,按上述培养条件培养腺上皮细胞。当细胞在上面长满后,取出盖玻片,以Hanks液洗涤3次,用冷丙酮固定10min,晾干,置冰箱4℃过夜,与直接涂片标本一起用单克隆抗体角蛋白(keratin)按1.75倍稀释,用ABC法染色,以鉴定细胞类型。胞质被染成棕黄色的为阳性细胞。

第三节 胚胎体外联合培养

胚胎体外联合培养是指胚胎与体细胞的共同培养。联合培养有利于胚胎细胞的发育。通常是将胚胎细胞与蜕膜,或与子宫腺上皮细胞,或与输卵管上皮细胞等共同培养,其中蜕膜细胞、子宫腺上皮细胞和输卵管上皮细胞分别是胚胎的饲细胞。

在联合培养前,饲细胞的培养基通常用加血清和绒毛膜促性腺激素等。联合培养时培养基常用无血清的基本培养基。

最近的研究发现,人类胚胎体外联合培养可以提高胚胎着床率及妊娠率。Solange等用人自体子宫内膜细胞与受精卵联合培养,结果发现随着培养时间的延长,其着床率及妊娠率明显升高,胚胎存活率也明显高于传统体外受精(IVF)。

联合培养体系的建立,可为胚胎提供良好的营养环境,与常规体外培养相比可使胚胎延长培养2~3d,改善胚胎质量,使子宫内膜发育与胚胎发育同步,为着床作好准备。并且随着培养时间的延长,染色体异常的胚胎停止发育,为筛选出优质胚胎提供了条件。

第二章 人体组织中干细胞的分离和培养

第一节 人体干细胞的生物学基础

个体发育是从受精卵开始的。受精卵通过不同的增殖分化途径,形成由不同特征细胞组成的功能各异的组织和器官。这些构成组织和器官功能各异、形态不同的细胞称为分化细胞。例如,肌肉细胞、神经细胞、血细胞、骨细胞和上皮细胞等。其中红细胞是高度分化细胞,上皮细胞是低度分化细胞。产生分化细胞的过程称为分化。个体的发育实际上是细胞不断增殖和有序分化的结果。干细胞就是具有分裂增殖能力,并具有产生一种以上分化细胞的潜能的细胞(stemcell)。

根据干细胞的分化能力可将干细胞分为全能干细胞、多能干细胞和单能干细胞,也可分为高级干细胞、中级干细胞和低级干细胞。根据干细胞存在机体的阶段可将干细胞分为胚胎干细胞和成体干细胞。

一、胚胎干细胞

(一) 全能干细胞

全能干细胞的特点是分裂繁殖旺盛,具有产生所有分化细胞的潜能。

从人的受精卵开始到三胚层形成和分化初期,即在人体胚胎发育的第1~4周,这个阶段内的细胞都是全能干细胞,也是高级干细胞。受精卵是第一个干细胞,是最高级的干细胞。

(二) 多能干细胞

多能干细胞的特点是分裂繁殖旺盛,具有产生两种以上分化细胞的潜能。多能干细胞也称定向干细胞。

从三胚层分化晚期到胚期结束,即在人体胚胎发育的第5~8周,这个阶段内的细胞大部分是多能干细胞,是中级干细胞。例如,神经管的细胞可分化为脑、脊髓、神经垂体、视网膜和松果体等。多能干细胞在一定条件下能转化成全能干细胞。

(三) 单能干细胞

单能干细胞的特点是分裂繁殖较旺盛,具有产生一种分化细胞的潜能。单能干细胞也称定向干细胞,是中级干细胞。

在胎儿期,即在人体胚胎发育的第9~38周,这个阶段内的各器官、组织中都有单能干细胞或多能干细胞。单能干细胞在一定条件下能转化成多能干细胞。

二、成体干细胞

人体出生后,各器官、组织中也都有单能干细胞或多能干细胞。但是随着年龄增长,

这些单能干细胞或多能干细胞的分裂繁殖能力逐渐减弱,成为低级干细胞。

人体各器官、组织中主要有如下干细胞。

(一) 上皮干细胞

复层扁平上皮的基底层细胞、子宫腺细胞、毛细血管的周细胞等。

(二) 疏松结缔组织的间充质细胞

(三) 软骨和骨组织干细胞

软骨原细胞,位于软骨膜内;骨原细胞,位于骨膜内。

(四) 造血干细胞

造血干细胞起源于胚胎第3周的卵黄囊血岛,主要位于胎儿脾内,出生后主要位于红骨髓。造血干细胞是多能干细胞,可分化为各种造血祖细胞。

(五) 精原细胞

位于睾丸精曲小管中。

(六) 毛发干细胞(毛母质细胞)

(七) 骨髓间质细胞

三、脐带血干细胞

人类脐血含有造血干细胞,而且脐带血干细胞是一种具有分化潜能的原始细胞,具备自我更新和增殖的能力,并能在特定因素的影响或诱导下向各种细胞或组织分化。

第二节 干细胞的分离和培养技术

一、表皮干细胞的分离和培养

(一) 器械

镊子、外科剪刀、三角烧瓶、培养皿、吸管、离心机、培养箱、倒置显微镜。

(二) 试剂

1. 0.6%胰蛋白酶PSBSA (pH值7.4)
2. 0.05%胰蛋白酶
3. Hanks液
4. 无血清角质形成细胞培养基 (GIBCO)
5. 表皮细胞生长因子
6. 牛垂体提取物
7. 小鼠IV型胶原涂被的培养皿 (BD Biosciences)

(三) 工作室和实验用品消毒

用5%的苯酚喷射全室,再用紫外线照射30min。对所有实验用品进行常规消毒,备用。

(四) 取材

从医院获得包皮环切术切除的1cm×2cm儿童包皮。消毒后立即投入盛有培养液的无菌

瓶中, 低温条件下迅速转移到实验室进行分离培养。

(五) 操作前的消毒

实验人员进入工作室前先用肥皂刷洗双手, 穿上消毒衣, 戴上消毒帽和口罩, 换固定干净的拖鞋。操作前用70%的酒精棉擦手。

(六) 操作

1. 将包皮放入0.6%胰蛋白酶PSBSA (pH值7.4) 液中, 在37℃下消化20~30min, 并注意观察。

2. 当见到皮肤材料边缘发生分离时, 将组织块移入培养皿。加入培养基, 振荡。用镊子将表皮和真皮分开。

3. 37℃下将表皮放入0.05%胰蛋白酶中消化10~30min。

4. 500r/min离心5min, 弃上清。向沉淀物中加入Hanks液漂洗, 再离心。如此漂洗两次, 最后向沉淀物中加入无血清角质形成细胞培养基 (GIBCO), 用吸管吹打, 制成悬液。然后添加表皮细胞生长因子和牛垂体提取物。

5. 将角质形成细胞悬液加入小鼠IV型胶原涂被的培养皿 (BD Biosciences) 中, 静置20min。

进行形态学观察, 包括倒置显微镜观察、光学显微镜观察。

6. 将培养皿放置于37℃下5%CO₂恒温培养箱中培养, 每天更换真皮基质 (AlloDerm) 的培养液。每天在倒置显微镜下仔细观察每瓶细胞生长情况至少一次, 详细记录细胞变化。

二、骨髓间质细胞的分离和培养

骨髓间质细胞是有多分化潜能的原始骨髓细胞, 在特定的条件下可向成骨细胞、软骨细胞、肌腱、脂肪细胞、骨髓基质细胞、血管内皮细胞及神经星状细胞分化, 且骨髓间质细胞易于获得及扩增, 是重要的组织工程种子细胞, 也是潜在的基因治疗靶细胞。

(一) 器械

24孔培养板、三角烧瓶、培养皿、吸管、注射器、离心机、培养箱、倒置显微镜。

(二) 试剂

1. 低糖的DMEM液
2. Percoll试剂
3. 新生牛血清
4. 10%浓度的新生牛血清-低糖的DMEM液

(三) 工作室和实验用品消毒

用5%的苯酚喷射全室, 再用紫外线照射30min。对所有实验用品进行常规消毒, 备用。

(四) 取材

骨髓来源于正常献髓者, 按活体取材法取骨髓10~20ml, 然后放入加有低糖的DMEM液的消毒试管中。低温条件下迅速转移到实验室进行分离培养。

(五) 操作前的消毒

实验人员进入工作室前先用肥皂刷洗双手，穿上消毒衣，戴上消毒帽和口罩，换固定干净的拖鞋。操作前用70%的酒精棉擦手。

(六) 操作

1. 用Percoll试剂分离

利用Percoll试剂分离时，先将密度为1.073g/ml的Percoll置于试管的底部，然后按照1:1的比例缓慢滴加低糖的DMEM骨髓悬液。

2. 离心30min。离心后，骨髓间质细胞位于低密度层。

3. 用注射器吸取骨髓间质细胞，注入离心管，加入DMEM液。500r/min离心5min，弃上清液，向沉淀物中加入DMEM液漂洗，再离心。如此漂洗两次。

4. 将获得的分离的骨髓间质细胞接种于24孔培养板内，浓度为 $2.0 \times 10^5/\text{cm}^2$ ，各孔内加入浓度10%的新生牛血清低糖DMEM液。置于37℃下5%CO₂环境中培养。

5. 48h后除去非贴壁细胞，更换新鲜的培养液，37℃下5%CO₂环境中培养。待细胞生长至瓶底90%融合时，加0.05%胰蛋白酶消化，传代培养。

6. 每天在倒置显微镜下仔细观察细胞的生长情况至少一次，详细记录细胞变化。

第三节 干细胞的诱导分化

细胞分化比细胞繁殖更为复杂，在体外诱导细胞分化比培养繁殖细胞更加困难。这是因为细胞增殖和细胞分化是互相限制的，在细胞分化过程中，细胞分裂会消失或大大减少。

近几年来人们在研究中发现，培养干细胞的繁殖比成体内干细胞活跃。在诱导培养细胞分化时，分裂旺盛的细胞会阻碍分化。细胞分化与多种因素的作用有关。如①同种细胞相互作用；②不同细胞作用；③细胞周围基质的作用；④人工诱导物。

现列举部分人工细胞分化诱导物如下：

- a. 胰岛素和催乳素（诱导乳腺上皮细胞）；
- b. 黑色素蛋白（诱导黑色素细胞）；
- c. 甲状蛋白（诱导甲状腺上皮）；
- d. 红细胞蛋白（诱导成红细胞）；
- e. 氢化可的松（诱导肺泡Ⅱ型上皮细胞、肝细胞、胶质、胶质瘤、乳腺上皮细胞、髓性白血病瘤）；
- f. 维甲酸（诱导内皮、气管和支气管上皮、黑色素瘤、神经母细胞瘤、胚胎性癌、髓性白血病瘤）；
- g. 丁酸钠盐（诱导红白血病、结肠癌）。