

· 药理 ·

## 人肾小管上皮细胞 HK-2 的培养及生长曲线测定

杨丽霞<sup>1</sup>, 黄宗涛<sup>2</sup>, 刘铜华<sup>3\*</sup>, 李晓东<sup>1</sup>, 薛世萍<sup>1</sup>

(1. 甘肃省中医药研究院中药研究所, 兰州 730050; 2. 甘肃省中医院神经外科, 兰州 730050;  
3. 北京中医药大学科技处, 北京 100029)

[摘要] 目的: 通过细胞计数法绘制人肾小管上皮细胞株 HK-2 细胞的生长曲线, 了解 HK-2 细胞的生长特性, 为相关实验研究提供参考。方法: 将 HK-2 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM / F12(1:1) 培养基培养, 每隔 24 h 在倒置显微镜下观察细胞生长范围, 并进行计数, 连续观察 7 d 后, 以存活细胞数(万/mL) 对培养时间(h 或 d) 作图, 即得生长曲线。结果: 细胞呈立方形铺路石样贴壁生长, 细胞间连接紧密。细胞数目在培养第 2 d 开始增加, 但在第 1~3 d 增加缓慢, 第 3~6 d 细胞数目急剧增加, 并进入指数生长期, 在第 6 d 时细胞达到饱和密度(100%), 在第 7 d 时细胞数目显著下降。结论: 在 1~3 d 细胞生长在潜伏期, 3~6 d 细胞进入大量分裂的指数生长期, 第 6 d 达到饱和后, 细胞生长则进入衰退期。

[关键词] 人肾小管上皮细胞; 细胞培养; 细胞生长曲线

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)10-0100-03

## Culturing of Human Tubular Epithelial Cells and Measuring Cell Growth Curve

YANG Li-xia<sup>1</sup>, HUANG Zong-tao<sup>2</sup>, LIU Tong-hua<sup>3\*</sup>, LI Xiao-dong<sup>1</sup>, XUE Shi-ping<sup>1</sup>

(1. Institute of Traditional Chinese Medicine Research, GanSu Province Academy of Chinese Medicine, Lanzhou 730050, China; 2. Neurosurgery, GanSu Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050, China; 3. Agency of Science and Technology, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate growth feature of human tubular epithelial cells(HK-2) through cell growth curve. **Method:** The HK-2 cells were cultured by DMEM / F12(1:1) with 10% fetal bovine serum. The cells morphology was observed through the microscope, and cells were counted per 24 hours. After observing 7 days the cell growth curve was drawn based on day and amount. **Result:** We found that HK-2 cells crawling like stone road on the bottle surface. The cell amount began increased on the second day, but the speed was slower during the first day to the third day. The amount increased rapidly from the third day to the sixth day, and the cells were in the exponential phase of growth. On the sixth day, the cells were in saturation density(100%). However, the amount decreased rapidly on the seventh day. **Conclusion:** The cells were in the incubation period from the first day to the third day, and in the exponential phase of growth from the third day to the sixth day, and in the decline phase on the

[收稿日期] 20100312(005)

[基金项目] 科技部国际科技合作项目(2009DFA31520)

[第一作者] 杨丽霞, 博士, 从事中医药防治糖尿病及其并发症的临床与作用机制研究, Tel: 0931-2687224, E-mail: yanglixia-415@163.com

[通讯作者] \* 刘铜华, 博士、博士后, 教授, 从事中医药防治糖尿病及其并发症的临床与作用机制研究, Tel: 010-64286642, E-mail: thliu@tom.com

seventh day.

**[Key words]** human tubular epithelial cells; cell culture; cell growth curve

人肾小管上皮细胞 (human tubular epithelial cell) 株 HK-2 是研究肾间质纤维化病变的主要细胞株之一, 现被广泛应用于实验研究<sup>[1]</sup>。本实验拟对体外培养的 HK-2 细胞进行形态观察, 并绘制细胞生长曲线, 以便了解 HK-2 细胞的生长特性, 为其药物干预实验研究提供科学依据。

## 1 材料

**1.1 细胞株** 人近端 TECs (HK-2) 细胞株, 购自协和医科大学细胞中心。

**1.2 药品与试剂** DMEM/F12 (1:1) 细胞培养基 (Gibco); 胎牛血清 (Hyclon); EDTA、胰蛋白酶 (Amresco)。

**1.3 主要仪器** 细胞培养瓶、超净工作台、二氧化碳培养箱、倒置显微镜、酶标仪、细胞计数板等。

## 2 方法

**2.1 细胞培养、传代、冻存、复苏、培养:** HK-2 细胞用含 10% 胎牛血清、100 U·mL<sup>-1</sup>青霉素、100 mg·L<sup>-1</sup>链霉素 DMEM/F12 (1:1) 完全培养基, 于 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养。每隔 2~3 d 换新鲜培养基 1 次, 培养融合至 80% 以上, 用含 0.25% 胰蛋白酶、0.05% EDTA 的消化液消化, 用完全培养基终止消化后, 离心 5 min (1 000 r·min<sup>-1</sup>)。用新鲜培养基将细胞重悬后进行传代培养或冻存。实验前细胞先用无血清培养基培养 24 h, 使细胞同步化后进行实验<sup>[2]</sup>。冻存: 细胞消化后用冻存液 (无血清培养液-血清-DMSO 7:2:1) 重悬后以 5×10<sup>5</sup> 个/mL 密度冻存, 每冻存管 1 mL。然后依次放置于 4℃ 冰箱 20 min - 20℃ 冰箱 2 h - 86℃ 冰箱 3~6 个月。从 -86℃ 冰箱取出冻存细胞迅速投入 37℃ 恒温水浴箱中, 摇动使其尽快解冻后接种于细胞培养瓶, 培养过夜后换上新鲜培养基继续培养。

**2.2 细胞形态观察** 倒置显微镜下观察细胞形态。

**2.3 生长曲线测定** 细胞以 3×10<sup>4</sup> 个/mL 密度接种于 25 T 细胞培养瓶, 每瓶 5 mL, 共 14 瓶。在 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 孵箱培养。每隔 24 h 取出 2 瓶, 先在倒置显微镜下观察细胞生长范围, 然后用含 0.25% 胰蛋白酶、0.05% EDTA 的消化液消化, 用完全培养基终止消化后, 离心 5 min (1 000 r·min<sup>-1</sup>), 用 5 mL 培养基调成细胞悬液, 每瓶计数 3 次, 取平均值。

连续计数 7 d。最后根据细胞计数结果, 以单位细胞数 (万/mL) 为纵坐标, 以时间 (d) 为横坐标绘制生长曲线<sup>[3]</sup>。

## 3 结果

**3.1 生长形态** 倒置显微镜下观察发现, 细胞呈立方形铺路石样贴壁生长, 细胞间连接紧密, 边缘清晰, 核居中, 培养液清亮无沉渣, 细胞生长状态良好。随着培养天数的增加, 细胞密度逐渐增大, 并且出现漂浮的死细胞。

**3.2 生长曲线** 计数结果显示, 细胞数目在培养第 2 d 开始增加, 但在第 1~3 d 增加缓慢, 第 3~6 d 细胞数目急剧增加, 进入指数生长期, 在 6 d 时细胞长满整个培养瓶底, 达到饱和密度, 在第 7 d 细胞数却陡然下降, 培养液中有大量的漂浮细胞。结果见表 1。

表 1 倒置显微镜下 HK-2 细胞计数及生长范围观察 (n=6)

t/d	平均单位细胞数/万/mL	生长范围/%
1	2.20	10
2	4.47	15
3	6.48	30
4	11.47	60
5	17.32	90
6	22.38	100
7	16.03	100

注: 生长范围即细胞在培养瓶底生长的面积占培养瓶底总面积的百分比

## 4 讨论

细胞生长曲线是测定细胞绝对生长数的常用方法, 也是判定细胞活力的重要指标, 是细胞生物学特性的基本参数之一<sup>[4]</sup>。一般细胞传代之后, 经过短暂的悬浮然后贴壁, 随后度过长短不同的潜伏期, 即进入大量分裂的指数生长期。在细胞达到饱和密度后, 停止生长, 进入平顶期, 然后退化衰亡。为了准确描述整个过程中细胞数目的动态变化, 需连续对细胞进行计数。通常计数 7 d。以存活细胞数 (万/mL) 对培养时间 (h 或 d) 作图, 即得生长曲线。生长曲线常用于测定药物等外来因素对细胞生长的影响。一般在指数生长期的 1/3~1/2 处加药<sup>[5]</sup>。

(下转第 105 页)

## 2 种品系大鼠被动皮肤过敏反应的差异性比较

李秀芳, 金若敏\*, 符胜光, 姚广涛, 谭梦晖  
(上海中医药大学药物安全性评价研究中心, 上海 201203)

[摘要] 目的: 比较 SD, Wistar 2 种品系大鼠对卵蛋白(OVA)、天花粉蛋白(TCS)诱导的被动皮肤过敏(passive cutaneous anaphylaxis, PCA)反应的差异性。方法: 选用 SD, Wistar 2 种品系大鼠, 以 OVA, TCS 为致敏原, PCA 反应时出现蓝斑的直径及阳性反应率作为判别标准, 进行大鼠同种或小鼠异种 PCA 试验, 并考查佐剂的应用与否对试验结果产生影响。结果: 大鼠同种 PCA 加或不加佐剂的 TCS 反应均为阳性, 蓝斑直径大小 SD 大鼠 > Wistar 大鼠; 加入氢氧化铝凝胶佐剂可提高两品系大鼠对 OVA 的过敏反应阳性率, 且 Wistar 大鼠的敏感性高于 SD 大鼠; 小鼠异种 PCA 试验显示: 耳廓皮内分别注射两种品系大鼠不加佐剂致敏的 OVA 抗血清时均呈阴性反应, 注射 SD 大鼠天花粉蛋白抗血清后, 呈阳性反应; 分别注射加入佐剂致敏的 OVA, TCS 抗血清, 则小鼠异种 PCA 反应均呈阳性。结论: 2 种品系大鼠对 OVA, TCS 的敏感性存在较大差异, SD 大鼠对 TCS 较敏感, 而 Wistar 大鼠对 OVA 的敏感性较强; 加入佐剂可提高两种品系大鼠对 OVA 的过敏反应阳性率。

[关键词] 大鼠; 品系; 卵蛋白; 天花粉蛋白; 被动皮肤过敏; 差异

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)10-0102-04

## Difference of Passive Cutaneous Anaphylaxis between SD and Wistar Rats

LI Xiu-fang, JIN Ruo-min\*, FU Sheng-guang, YAO Guang-tao, TAN Meng-hui  
(Research Center for Drug Safety Evaluation of Shang Hai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

**[Abstract] Objective:** To compare the different sensitivity passive cutaneous anaphylaxis(PCA) caused by OVA and TCS between Sprague Dawley(SD) and Wistar rats. **Method:** PCA was performed by using SD and Wistar rats, and xenogenic PCA by using KM mice. OVA and TCS were taken as allergens. The diameter of dermal evan's blue spot and the positive reaction rate were measured to discriminate severity of PCA. **Result:** Homologous PCA revealed that after injecting with 0.9 mg/rat TCS with or without adjuvant, two rat strains showed positive reaction. According to the diameter evan's blue spots, the degree of response was as follows: SD rat > Wistar rat. The allergic positive reaction rate of two rat strains would be improved by adding aluminium hydroxide into OVA(5 mg/rat), and the sensitivity of OVA of Wistar rat was more than SD rat. Xenogeneic PCA showed that after auricular intradermally injecting with OVA antiserum without aluminium hydroxide of two different rat strains, the mice demonstrated negative reaction. But the positive reaction was showed by injecting with TCS antiserum without adjuvant of SD rat. The mice showed positive reaction after auricular intradermally injecting with OVA or TCS with adjuvant of two rat strains. **Conclusion:** There are differences in sensitivity of OVA and TCS between SD and Wistar rat strains, and SD rat is the more sensitive of TCS than Wistar rat. Otherwise, Wistar rat is more sensitive of OVA. The allergic positive reaction rate will be improved by adding aluminium hydroxide into OVA.

[收稿日期] 20100402(001)

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAI06A03-02); 国家“重大新药创制”科技重大专项项目(2009ZX0902-002)

[第一作者] 李秀芳, 讲师, 博士, 从事中药药理与毒理研究, Tel: 021-51323053, 15921740121, E-mail: itislxf@163.com

[通讯作者] \* 金若敏, Tel: 021-51322649, E-mail: rmj801@126.com