

少脑组织病理改变,提示其可能通过抑制无氧酵解及降低脑水肿产生保护脑缺血作用。

脑缺血时由于EAA释放增加,作用于其受体,引起受体门控型 Ca^{2+} 通道开放,使 Ca^{2+} 大量内流。此外,线粒体及内质网膜 Ca^{2+} -ATP酶由于能量代谢障碍而不能摄取细胞内过量的 Ca^{2+} 而进一步加重 Ca^{2+} 超载。细胞内超载 Ca^{2+} 可激活磷脂酶C,后者使磷脂酰胆碱(PIP_2)转变为三磷酸肌醇(IP_3)和二酯酰甘油(DAG), IP_3 作用于其受体,导致细胞内 Ca^{2+} 库释放 Ca^{2+} ,各种因素互相交叉促使细胞内 Ca^{2+} 超载。这是最终引起神经元不可逆性坏死的主要原因。因而有效降低脑组织中 Ca^{2+} 水平,可减轻脑细胞的不可逆性坏死^[8]。ASLS能明显降低实验性脑缺血大鼠脑组织 Ca^{2+} 水平,表明其对脑组织的保护作用可能与降低脑组织中 Ca^{2+} 水平有关。

脑缺血时细胞内 Ca^{2+} 超载可激活依赖 Ca^{2+} 蛋白水解酶,使黄嘌呤脱氢酶(XD)变成黄嘌呤氧化酶(XO)。次黄嘌呤(Hpy)在XO作用下生成黄嘌呤(Xan),Xan在XO作用下生成尿酸,这两个过程均产生大量氧自由基,可攻击生物膜中多聚不饱和脂肪酸引起脂质过氧化作用,形成脂质过氧化物,降低膜的流动性,使膜的通透性增加,大量水分离子内流,导致线粒体及细胞肿胀,抑制电子传递和氧化磷酸化,进一步加重能量代谢障碍,溶酶体酶释放引起细胞自身消化,最终导致细胞死亡^[9,10]。ASLS能明显降低实验性脑缺血大鼠脑组织MDA水平,提高SOD活性,提示其可能通过清除氧自由基及提高抗氧化酶活性对脑组织产生保护作用。研究还表明,ASLS能明显降低实验性脑缺血大鼠的全血及血浆

黏度,抑制血小板的黏附物聚集功能^[11],这对于防治缺血性脑血管病也具有重要价值。

References:

- [1] Shao C J, Ryoji K, Xu J D, *et al.* Saponins from leaves of *Acanthopanax senticosus* Harms, Ciwujia. Structures of Ciwujia nosides B, C₁, C₂, C₃, C₄, D₁, D₂ and E [J]. *Chem Pharm Bull*, 1988, 36(2): 601-606.
- [2] Shao C J, Ryoji K, Xu J D, *et al.* Saponins from leaves of *Acanthopanax senticosus* Harms, Ciwujia I. Structures of Ciwujianosides B, A₁, A₂, A₃, A₄ and D₃ [J]. *Chem Pharm Bull*, 1989, 37(1): 42-46.
- [3] Zhang Y H, Han C C, Qu S C, *et al.* Protective effect of ASLS on experimental myocardial infarction in rats [J]. *Chin New Drugs J* (中国新药杂志), 2002, 11(9): 695-697.
- [4] Ma L N, Sui D Y, Lu Z Z, *et al.* Effects of ASLS on hemodynamics and cardiac oxygen metabolism in acute myocardial infarction in dogs [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 1994, 29(11): 654-657.
- [5] Smith M L, Bendek G. Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat [J]. *Acta Neurol Sci*, 1984, 69: 385-401.
- [6] Zhang L X, Zhang T F, Li L Y. *Experimental Method and Technology of Biochemistry* (生物化学实验方法和技术) [M]. Beijing: Higher Education Press, 1981.
- [7] Tang G, Zhang J T. Research advance on mechanism with cerebral ischemic injury and therapeutic policy [J]. *Chin New Drugs J* (中国新药杂志), 2000, 9(12): 809-812.
- [8] Zeng G Y, Feng Y P. *Cardiovascular Pharmacology* (心血管药理学) [M]. 2nd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 1997.
- [9] Slater T F. Free-radical mechanism in tissue injury [J]. *Biochem J*, 1984, 222: 1-3.
- [10] Dormandy T L. Free radical oxidation and antioxidants [J]. *Lancet*, 1978 (1): 647-651.
- [11] Jiang H Y, Sui D Y, Yu X F, *et al.* Effect of ASLS on hemorrheology and platelet function in experimental cerebral ischemia rats [J]. *J Jilin Univ—Med Ed* (吉林大学学报·医学版), 1978.

麻黄汤拆方对过敏性炎症的抑制作用

刘永刚,罗佳波,吴忠,贺丰

(第一军医大学 中药制剂重点实验室,广东 广州 510515)

摘要:目的 通过对麻黄汤各拆方配伍组合对嗜酸性粒细胞和肥大细胞的抑制作用探讨其配伍规律。方法 采用在体试验观察致敏小鼠抗原攻击后肺灌洗液(BALF)和外周血中的嗜酸性粒细胞聚集反应,采用离体试验观察致敏大鼠抗原攻击后腹腔肥大细胞脱颗粒反应。结果 麻黄汤及拆方减少BALF和外周血中嗜酸性粒细胞的浸润不完全相同;麻黄汤及拆方也不同程度抑制致敏大鼠腹腔肥大细胞脱颗粒反应。结论 麻黄汤对嗜酸性粒细胞和肥大细胞具有抑制作用,拆方分析显示麻黄汤全方效果最佳,并初步验证了麻黄汤组方的科学性和合理性。

收稿日期:2004-09-03

基金项目:国家自然科学基金重点项目(300301500)

作者简介:刘永刚(1971—),男,湖北天门人,主管药师,中药学博士,现于武警广东总队医院从事中药新药与临床药理研究工作。

Tel: (020) 61648265

关键词:麻黄汤;嗜酸性粒细胞;肥大细胞

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)04-0563-04

Inhibitory effects of Mahuang Decoction compositions on allergic inflammation

LIU Yong-gang, LUO Jia-bo, WU Zhong, HE Feng

(Key Laboratory of Chinese Materia Medica Pharmaceuticals, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

Key words: Mahuang Decoction (MHD); eosinophils; mast cells

麻黄汤源于《伤寒论》,药味不多,配伍精当,是历代中医学家倍为推崇的著名方剂,为了阐明麻黄汤的配伍规律,进一步解释君臣佐使的配伍规律,本课题组结合麻黄汤组方理论,采用叠加法对麻黄汤进行拆方分组,进行了一系列的药理学、药化研究。本实验观察麻黄汤及其不同配伍对小鼠嗜酸性粒细胞聚集反应和大鼠肥大细胞脱颗粒反应的影响,旨在从抗炎及抗过敏的角度来探讨麻黄汤组方的合理性和配伍规律。

1 材料与方法

1.1 动物:昆明种小鼠,清洁级,雌雄各半,体重18~25 g;SD大鼠,清洁级,雄性,体重180~250 g;均由第一军医大学动物实验中心提供。

1.2 药品与试剂:麻黄为麻黄科植物草麻黄 *Ephedra sinica* Stapf 的干燥草质茎,桂枝为樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl 的干燥嫩枝,杏仁为蔷薇科植物山杏 *Prunus armeniaca* L. var. *ansu* Maxim. 的干燥成熟种子,甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根及根茎。饮片购自广东省药材公司中药饮片厂,经第一军医大学中药鉴定学教研室鉴定。各配伍组合:1号全方:麻黄、桂枝、甘草、杏仁;2号方:麻黄、桂枝、杏仁;3号方:麻黄、桂枝、甘草;4号方:麻黄、桂枝;5号方:麻黄、杏仁;6号方:麻黄、甘草;7号方:麻黄。制备各方水煎液^[1]:加水将饮片分别浸泡30 min,先煎麻黄20 min,去沫,再和余药共煎30 min,纱布粗滤去渣,各配伍煎液中生药量同原方,煎法相同,煎后均浓缩,使各配伍组合中各组成生药质量浓度与全方中各相应生药质量浓度相同(各方均以含麻黄生药0.5 g/mL为标准),调pH值为7.4~7.8,备用;色甘酸钠(武汉五景药业有限公司,批号:20020912);卵白蛋白(OVA, Sigma公司)。

1.3 仪器:RE-52A 旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂;XDS-1B 相差显微镜,重庆光学仪器厂;8453紫外分光光度计,美国惠普公司。

1.4 分组与造模:将昆明种小鼠随机分组,即对照组、模型组、1~7号拆方组(10 mg/kg)、地塞米松

(2 mg/kg)阳性对照组。哮喘模型的制备参照文献方法^[2]。除对照组外其余各组在0、7、14 d ip 含OVA 10 μ g 及 Al(OH)₃ 4 mg 的 PBS 0.5 mL。从第15天开始,对照组除外,每天用5% OVA 密闭钟罩下雾化30 min,各组在激发前1 h ig 给药,一直到第22天。1~7号各组均以麻黄生药剂量5 g/kg ig 给药。

1.5 肺灌洗液(BALF)和外周血中嗜酸性粒细胞测定^[3]:末次给药1 h后,尾静脉取外周血,涂片, Wright-Giemsa 染色,高倍镜下白细胞分类计数。用25% 乌拉坦 1 mL/kg 麻醉小鼠,分离气管,行气管插管,用注射器吸取1 mL 含5 U/mL 肝素钠的 Hanks 液注入气道,来回灌洗2次,回收率为80%以上。用计数板计数白细胞数目,其余 BALF 1 500 r/min 离心10 min,弃去上清液,取沉淀部分涂片,用嗜酸性粒细胞特殊染色法染色,在显微镜油镜下分类计数200个细胞,嗜酸性粒细胞呈伊红色,其余部分按单核淋巴细胞计数(中性粒细胞极少,忽略不计)。

1.6 腹腔肥大细胞脱颗粒测定^[4]:将OVA(10% Al(OH)₃凝胶为佐剂)配制成2%溶液,每只大鼠脚掌 sc 1 mg OVA 致敏,3周后股动脉放血处死大鼠,ip Hanks 液 10 mL,轻揉腹部1 min,剖腹收集腹腔内的液体,置10 mL 塑料试管内,室温1 200 r/min 离心10 min,去上清液,加适量 Hanks 液悬浮细胞,分装于1.0 mL 塑料试管内,每管0.2 mL,随即分10组,对照组和模型组分别加0.4、0.2 mL Hanks 液,色甘酸钠组和麻黄汤拆方组分别加1.0 mg/L 色甘酸钠溶液和麻黄汤及拆方0.2 mL。37℃水浴孵育5 min,对照组除外,其余各组加0.01 g/L OVA 0.2 mL 抗原攻击,37℃水浴孵育10 min,取出,置于冰浴中。肥大细胞脱颗粒计数:将中性红染色液滴于载玻片上,待玻片干燥,分别取各管细胞悬液2~3滴于片上,在显微镜高倍镜下观察肥大细胞脱颗粒的情况,计数200个细胞,计算出净脱颗粒率和抑制率。

净脱颗粒率=实验组脱颗粒率-对照组脱颗粒率

抑制率=(模型组净脱颗粒率-用药组净脱颗粒率)/模型组净脱颗粒率 $\times 100\%$

1.7 数据处理:数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS10.0 软件用 on-way-ANOVA 进行处理,组间比较采用 SNK 进行。

2 结果

2.1 麻黄汤及配伍拆方对致敏小鼠抗原攻击后 BALF 中炎症细胞的影响:见表 1。模型组致敏小鼠抗原攻击后 BALF 中的白细胞总数较对照组升高;分类计数中,模型组的嗜酸性粒细胞比率高于对照组 23 倍,中性粒细胞的比率极低($<5\%$),故忽略不计。麻黄汤及拆方能够不同程度抑制 BALF 中白细胞总数和嗜酸性粒细胞的增加;但 5~7 号方与模型组比较差异不显著,1~4 号方相互比较差异不显著。

表 1 麻黄汤及拆方配伍对致敏小鼠抗原攻击后 BALF 中炎症细胞的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of MHD and its composition on inflammatory corpuscle in BALF of sensitized mice after challenged with antigen ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物 /只	白细胞总数 /($1 \times 10^8 \cdot L^{-1}$)	嗜酸性粒细胞 /%	淋巴单核细胞 /%
对照	10	1.72 $\pm$ 0.36	0.46 $\pm$ 0.12	99.54 $\pm$ 0.12
模型	10	10.40 $\pm$ 2.54 ^{##}	10.78 $\pm$ 2.24 ^{##}	89.22 $\pm$ 2.24 ^{##}
地塞米松	10	5.91 $\pm$ 1.22 ^{**}	5.52 $\pm$ 1.49 ^{**}	94.48 $\pm$ 1.49 ^{**}
1 号方	8	7.37 $\pm$ 1.78 ^{**}	7.07 $\pm$ 1.56 ^{**}	92.93 $\pm$ 1.56 ^{**}
2 号方	8	8.22 $\pm$ 1.59 ^{**}	7.60 $\pm$ 1.63 ^{**}	92.40 $\pm$ 1.63 ^{**}
3 号方	8	8.46 $\pm$ 1.26 ^{**}	8.08 $\pm$ 1.53 ^{**}	91.92 $\pm$ 1.53 ^{**}
4 号方	8	9.01 $\pm$ 1.41 ^{**}	7.84 $\pm$ 1.81 ^{**}	92.16 $\pm$ 1.81 ^{**}
5 号方	8	9.36 $\pm$ 1.49	9.23 $\pm$ 1.44	90.77 $\pm$ 1.44
6 号方	8	9.49 $\pm$ 1.68	9.43 $\pm$ 1.78	90.57 $\pm$ 1.78
7 号方	8	9.82 $\pm$ 1.39	9.62 $\pm$ 2.05	90.38 $\pm$ 2.05

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$

与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

^{##} $P < 0.01$ vs control group

^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

2.2 麻黄汤及其拆方对致敏小鼠抗原攻击后外周血白细胞分类的影响:见表 2。模型组致敏小鼠抗原攻击后外周血嗜酸性粒细胞比对照组明显升高,中性粒细胞和淋巴单核细胞无明显变化。麻黄汤及其拆方和地塞米松均能不同程度抑制外周血嗜酸性粒细胞升高反应。但 4~7 号方与模型组比较差异不明显,1~3 号方相互比较差异不显著。

2.3 麻黄汤及其拆方对致敏大鼠抗原攻击后腹腔肥大细胞脱颗粒的影响:见表 3。致敏大鼠腹腔肥大细胞无抗原攻击时脱颗粒数目仅占 18.8%,抗原攻击后脱颗粒数目明显增加,麻黄汤及其拆方和色甘酸钠能不同程度地抑制肥大细胞脱颗粒反应,5~7 号方与模型组比较差异不显著。

表 2 麻黄汤及拆方配伍对致敏小鼠抗原攻击后外周血白细胞分类的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of MHD and its composition on leucocytic grouping in peripheral blood of sensitized mice after challenged with antigen ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物 /只	嗜酸性粒细胞 /%	中性粒细胞 /%	淋巴单核细胞 /%
对照	10	0.48 $\pm$ 0.13	14.41 $\pm$ 4.45	85.21 $\pm$ 4.36
模型	10	3.28 $\pm$ 1.46 ^{##}	28.32 $\pm$ 7.93	68.40 $\pm$ 7.98
地塞米松	10	0.40 $\pm$ 0.15 ^{**}	29.59 $\pm$ 7.47	70.01 $\pm$ 7.16
1 号方	8	1.75 $\pm$ 0.77 ^{**}	32.48 $\pm$ 6.48	65.77 $\pm$ 6.47
2 号方	8	1.98 $\pm$ 0.86 ^{**}	33.40 $\pm$ 6.78	64.68 $\pm$ 6.28
3 号方	8	2.32 $\pm$ 0.73 [*]	34.76 $\pm$ 9.05	63.92 $\pm$ 9.09
4 号方	8	3.28 $\pm$ 1.05	35.68 $\pm$ 12.76	61.04 $\pm$ 12.42
5 号方	8	3.14 $\pm$ 1.26	33.98 $\pm$ 9.83	62.88 $\pm$ 15.49
6 号方	8	3.51 $\pm$ 0.97	34.66 $\pm$ 8.58	61.83 $\pm$ 8.84
7 号方	8	3.69 $\pm$ 1.45	35.43 $\pm$ 10.66	60.88 $\pm$ 11.27

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$

与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

^{##} $P < 0.01$ vs control group

^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

表 3 麻黄汤及拆方配伍对致敏大鼠抗原攻击后腹腔肥大细胞脱颗粒的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 3 Effects of MHD and its composition on degradation of peritoneal mast cells in sensitized rats after challenged with antigen ($\bar{x} \pm s$)

组别	脱颗粒肥大细胞/%	净脱颗粒率/%	抑制率/%
对照	18.8 $\pm$ 3.49	—	—
模型	47.4 $\pm$ 5.13 ^{##}	28.6	—
地塞米松	29.6 $\pm$ 5.98 ^{**}	10.8	62.2
1 号方	30.8 $\pm$ 4.60 ^{**}	12.0	58.0
2 号方	35.4 $\pm$ 3.51 ^{**}	16.6	34.3
3 号方	39.2 $\pm$ 6.50 [*]	20.4	28.7
4 号方	40.2 $\pm$ 5.45 [*]	21.4	25.2
5 号方	44.7 $\pm$ 4.39	26.1	8.7
6 号方	43.4 $\pm$ 4.83	24.6	13.9
7 号方	45.4 $\pm$ 7.13	26.6	7.0

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$

与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

^{##} $P < 0.01$ vs control group

^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

3 讨论

中药配伍以七情合和为纲,目前对方剂配伍规律的研究主要是用药理或化学的方法研究中药配伍与药理效应或化学变化之间的关系。本实验主要通过不同配伍对嗜酸性粒细胞和肥大细胞的抑制作用来探讨配伍-药理效应改变的相互关系。

麻黄汤由君药麻黄,臣药桂枝,佐药杏仁,使药甘草组成,在本实验中,麻黄汤全方在对嗜酸性粒细胞和肥大细胞的抑制作用方面明显高于其拆方组合,并且有麻黄、桂枝的组合对嗜酸性粒细胞和肥大

细胞的抑制作用要强于其他组,初步说明麻黄汤中麻黄、桂枝作为君臣药味的合理性,但是麻黄汤全方和有麻黄、桂枝的配伍组间的抑制作用差异不显著。其配伍规律的合理性有待进一步验证。

References:

- [1] Wei F H, Luo J B, Shen Q, et al. Pharmacokinetics of ephedrine and pseudoephedrine from *Herba Ephedrae* Decoctio and *Herba Ephedrae* in mice tissues [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(7): 781-784.
- [2] Mark A B, Cliff H B, Paul W, et al. Dissociation by steroids of eosinophilic inflammation from airway hyperresponsiveness in murine airways [J]. *Respir Res*, 2003, 4: 3-13.
- [3] Jin S H, Xie M Q, Shen W H, et al. Inhibitory effect of Chuanning Soft Capsule on eosinophils and mast cells [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(3): 242-245.
- [4] Xu S Y, Bian R L. *Methodology in Pharmacological Experiment* (药理实验方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1994.
- [1] Wei F H, Luo J B, Shen Q, et al. Pharmacokinetics of ephedrine and pseudoephedrine from *Herba Ephedrae* Decoctio and *Herba Ephedrae* in mice tissues [J]. *Chin Tradit*

毛茛提取液含药血清对家兔子宫平滑肌细胞的影响

蔡 颀¹, 江 涛¹, 李淑芳², 吴春高²

(1. 广东药学院药理学系, 广东 广州 510224; 2. 贵阳医学院 药理教研室, 贵州 贵阳 550004)

毛茛为毛茛科植物毛茛 *Ranunculus japonicus* Thunb. 的全草及根, 味辛、性湿。全草含原白头翁素 (protoanemonin) 和其二聚体白头翁素 (anemonin)。研究发现毛茛 70% 乙醇提取物对乙酰胆碱、催产素和 5-羟色胺所致的非妊娠大鼠子宫的收缩有明显的松弛作用, 并有剂量依赖性^[1], 但未对此作用深入研究。笔者在前期工作中, 已利用离体和在家兔子宫平滑肌实验明确毛茛乙醇提取液 (RJTE) 对子宫平滑肌 (USMC) 的舒张作用, 本实验采用体外细胞培养技术及血清药理学方法从细胞水平探索其作用机制。

1 材料

1.1 动物: 家兔由贵阳医学院实验动物中心提供, 合格证号为 SCXK (黔) 2002-0001。

1.2 药品与试剂: RJTE, 由暨南大学医药生物技术研究开发中心提供。制备方法: 取干品毛茛全草 100 g, 加 70% 乙醇 300 mL, 浸泡 1 h, 回流提取 2 h, 滤过, 滤渣再加 70% 乙醇 200 mL 回流提取 1 h。滤过, 合并滤液, 回收乙醇, 并浓缩至含生药 1 g/mL, 经定性定量鉴定其主要成分为生物碱类 (>15 mg/mL)、不饱和甾醇 (>10 mg/mL)。DMEM 培养基 (Gibco 公司, 美国); 台盼蓝 (购自北京环亚泰克生物工程公司, 用生理盐水配成 0.4% 台盼蓝溶液); INDO-1-AM (美国 Sigma 公司, 用 DMSO 溶解 INDO 粉配成浓度为 $1 \times 10^3 \mu\text{mol/L}$ 的母液 I; 用 Hepes 液将母液 I 配成浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ 的母液 II, -20°C 冻存备用)。

1.3 仪器: SW-CJ-2FD 净化工作台 (苏州净化

设备有限公司); CK30 细胞培养用显微镜 (日本 Olympus 公司); CO₂ 培养箱 (美国 Forma 公司); 960MC/960CRT 型荧光分光光度计 (上海分析仪器总厂)。

2 方法

2.1 含药血清的制备: 取家兔 4 只, 体重为 (2.5 ± 0.5) kg, 3 只分别每日给予 RJTE (用蒸馏水配制) 20.8、10.4、5.2 g/kg, 以 5 mL/kg 分 2 次 ig (间隔约 8 h), 另一只每日 ig 等量生理盐水作为对照。连续给药 3 d。于末次给药后 1、2、3 h (给药前禁食不禁水 8 h), 心脏采血各 6 mL, 无菌分离血清, 经 56 °C、30 min 灭活处理后, -20°C 冰箱保存备用。

2.2 USMC 的培养

2.2.1 原代细胞培养: 取雌性家兔, 体重 (2.0 ± 0.5) kg, 迅速打击头部致死, 无菌条件下取子宫。剔除外层浆膜层, 无菌棉签刮去内层黏膜层, 将中间平滑肌剪切成 3~4 mm³ 组织小块。采用贴壁组织块法和酶消化法结合的培养方法, 向组织块中加入 0.15% 胰酶作用 20 min, 2 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 重复 3 次。再加入含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液 (约可淹没组织块而不致使其漂浮), 并将培养瓶直立放置于 CO₂ 培养箱 (持续通入 95% O₂ 和 5% CO₂ 混合气体, 37 °C 恒温, 湿度保持在 85%~95%) 中 2 h 待组织块贴壁, 将培养瓶倒转平放。根据瓶中培养液颜色变化情况进行换液。当细胞占瓶底面积约 50%, 去掉组织块, 在 1~2 周出现致密细胞层后 (即细胞占瓶底面积 95% 以上), 加入消化液消化传代。