PneumaCult™-Ex Plus

延长传代代数，生成更多的呼吸道上皮细胞

当前扩增培养基的局限性

目前，用于培养原代人体呼吸道上皮细胞的无饲养层扩增培养基在保持良好的黏膜纤毛分化潜能的前提下只能支持有限代数的传代。这种局限性限制了研究人员可以使用原代细胞进行实验的数量和规模。

PneumaCult™-Ex Plus是一种不依赖饲养层，不含血清及牛垂体提取物（BPE）的培养基，从而彻底解决了这个问题：在扩增培养期间，研究人员可以扩增细胞至更高的代数，并且在随后的气-液 界面（ALI）培养期间，保持黏膜纤毛分化的潜能（见图1）。因此，PneumaCult™-Ex Plus帮助研究人员从一个病人的微量呼吸道样本生成更多细胞从而进行更多的实验。

PneumaCult™-Ex Plus的优势

与其他市售的扩增培养基相比：

扩增更多。每代细胞的扩增倍数变高。

维持ALI分化潜能。即便在延长传代代数之后，仍然能保持形态学和电生理学特征。

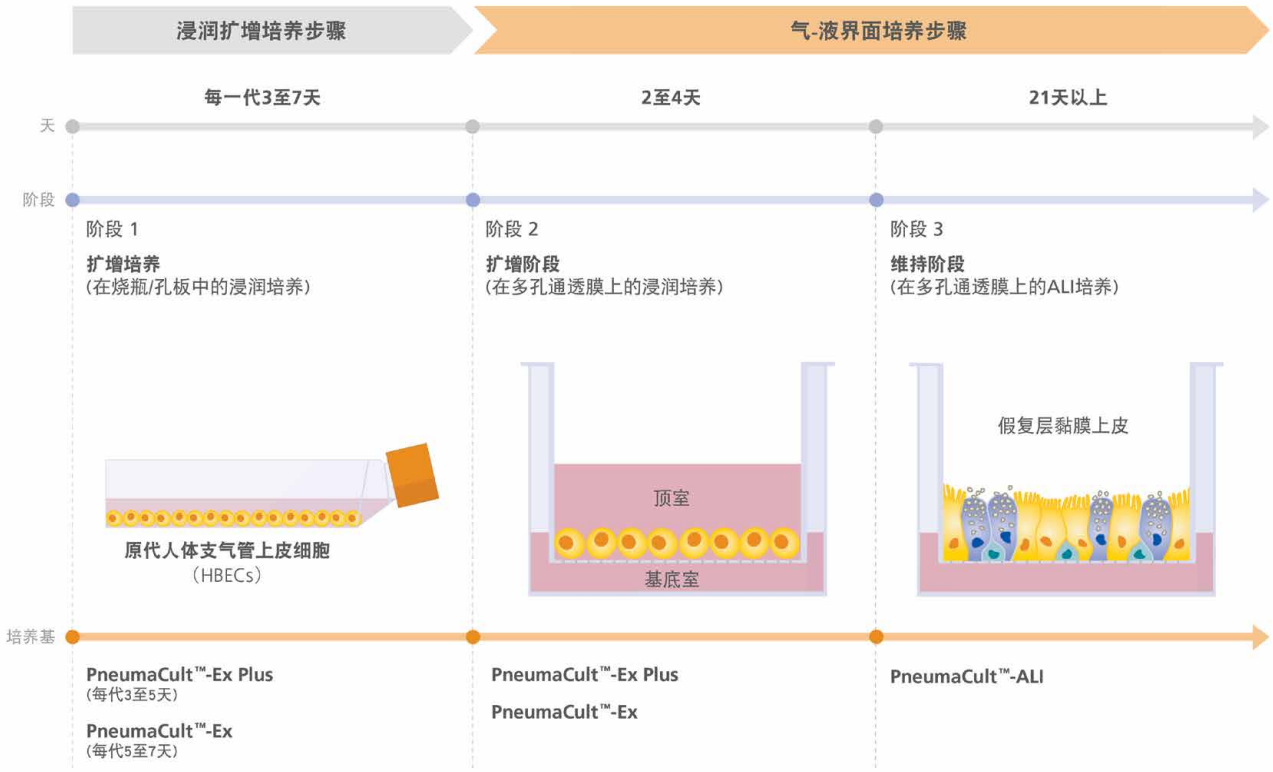

图1. PneumaCult™培养体系概述

使用PneumaCult™-Ex Plus 或 PneumaCult™-Ex对HBECs进行浸润培养扩增。在ALI培养过程的早期"扩增阶段"，在顶室和基底室加入PneumaCult™-Ex Plus 或 PneumaCult™-Ex。当细胞数量接近满板时，去除顶室和基底室里的培养基，将新鲜的PneumaCult™-ALI只加入到基底室里，细胞顶层接触空气。21-28天后，HBECs分化为假复层的黏膜纤毛上皮细胞，且可以维持培养一年以上。

PneumaCult™-Ex Plus与其他市售的扩增培养基相比?

研究设计

将市售的第1代（P1）原代人体支气管上皮细胞（HBECs）进行解冻，并接种到含有PneumaCult™-Ex Plus、PneumaCult™-Ex、或支气管上皮细胞生长培养基（BEGM）的T-25 cm^2的培养瓶中。每代培养至汇合率大约50-70%，采用酶解法对这些细胞进行消化传代，然后使用PneumaCult™ - ALI进行ALI培养分化。

扩增：每代细胞的扩增倍数变高

与PneumaCult™-Ex或BEGM相比，在PneumaCult™-Ex Plus里进行培养的HBECs具有至少多两次以上的细胞分裂扩增（Population Doubling，PD）（图2）。在Pneumacult™-Ex Plus中培养的细胞形态更小，排列也更紧凑（图3），成克隆生长形态. 基底细胞标记物CD49f和CD271的表达水平也更高（图4和图5）。在PneumaCult™-Ex Plus里维持培养的类似干细胞的基底细胞，即使在延长传代代数之后，仍然具有更好的ALI分化潜能。

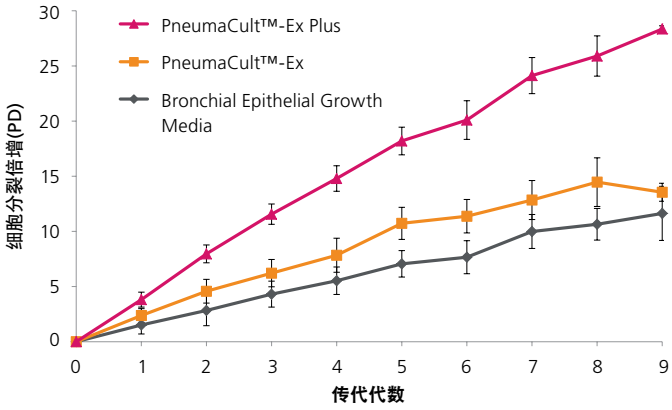

图2. 与PneumaCult™-Ex或Bronchial Epithelial Growth Media相比，在PneumaCult™-Ex Plus里培养的HBECs扩增速率更快

将市售的冷冻保存的P1 HBECs接种到PneumaCult™-Ex Plus、PneumaCult™-Ex、或Bronchial Epithelial Growth Media中。与任何一种对照培养基相比，在PneumaCult™-Ex Plus中培养的细胞经过9个传代后具有显著的更高的增殖速率（n = 9）。

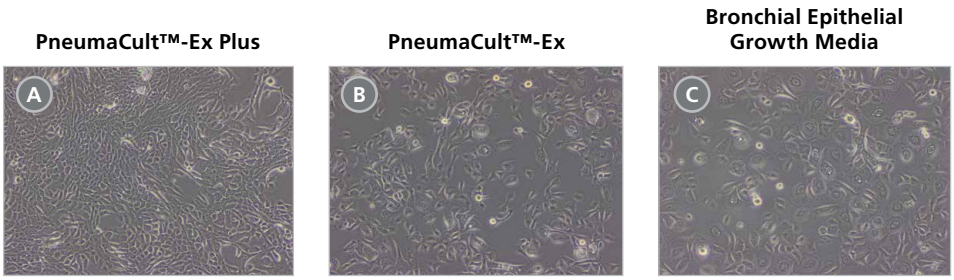

图3. 人体支气管上皮细胞（HBECs）的代表性形态

在PneumaCult™-Ex Plus、PneumaCult™-Ex、或Bronchial Epithelial Growth Media:里培养的P4 HBECs的代表性的细胞培养图像。与PneumaCult™-Ex（B）Bronchial Epithelial Growth Media（C）相比，在Pneumacult™-Ex Plus（A）里培养的细胞形态更小、排列更紧密。所有的图像均使用10倍物镜拍摄。

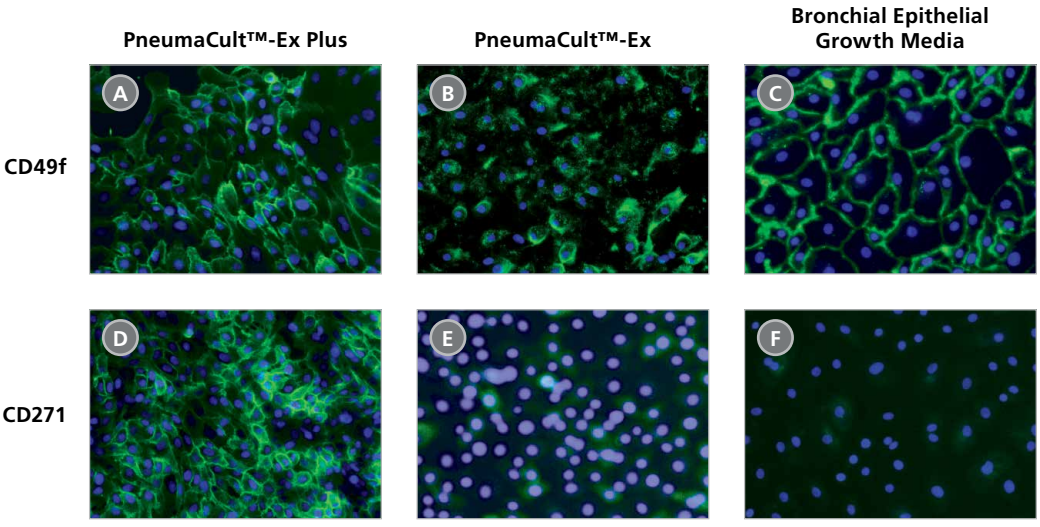

图4. 在PneumaCult™-Ex Plus中培养的HBECs能够保持基底细胞标记物CD49f和CD271的广泛表达

在PneumaCult™-Ex Plus（A和D）、PneumaCult™-Ex（B和E）、以及Bronchial Epithelial Growth Media（C和F）里进行培养的P4 HBECs的基底细胞标记物-CD49f（A、B、C）以及CD271（D、E、F）的免疫荧光检测。所有的图像均使用10倍物镜拍摄。

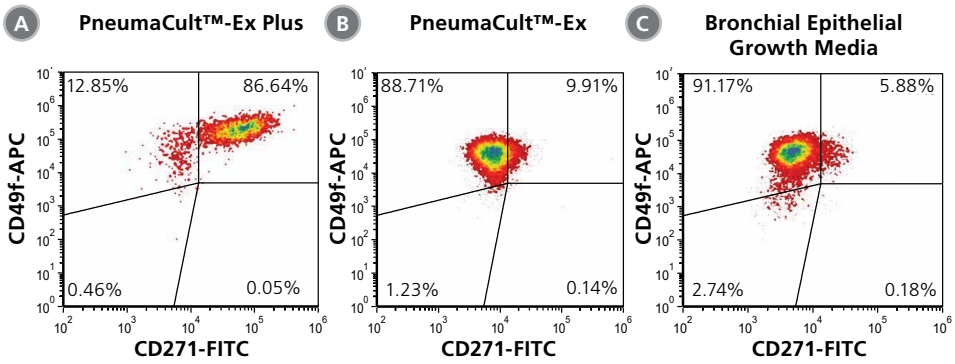

图5. 在PneumaCult™-Ex Plus里培养的HBECs具有更高比例的CD271⁺ CD49f⁺细胞

对在PneumaCult™-Ex Plus（A）、PneumaCult™-Ex（B）、以及Bronchial Epithelial Growth Media:（C）里进行培养的P4 HBECs进行流式检测，检测具有基底细胞标记物CD49f和CD271的表达水平。与PneumaCult™-Ex（B）和Bronchial Epithelial Growth Media（C）相比，在PneumaCult™-Ex Plus（A）培养的HBECs具有更高比例的CD49f和CD271双阳性表达。

分化：即便在延长传代后，仍然能够维持ALI分化潜能

在PneumaCult™-ALI中对来源于不同的扩增培养基扩增的HBECs进行ALI分化，评估其分化潜能。

形态学

无论使用何种扩增培养基，早期的HBECs形态都非常类似。从P5开始，与对照培养基相比，在PneumaCult™-Ex Plus中培养的HBECs具有明显的优势，表现出更好的假复层黏膜纤毛分化，和更高水平的纤毛标记物AC-微管蛋白（红色）和杯状细胞标记物Muc5AC（绿色）表达（图6）。

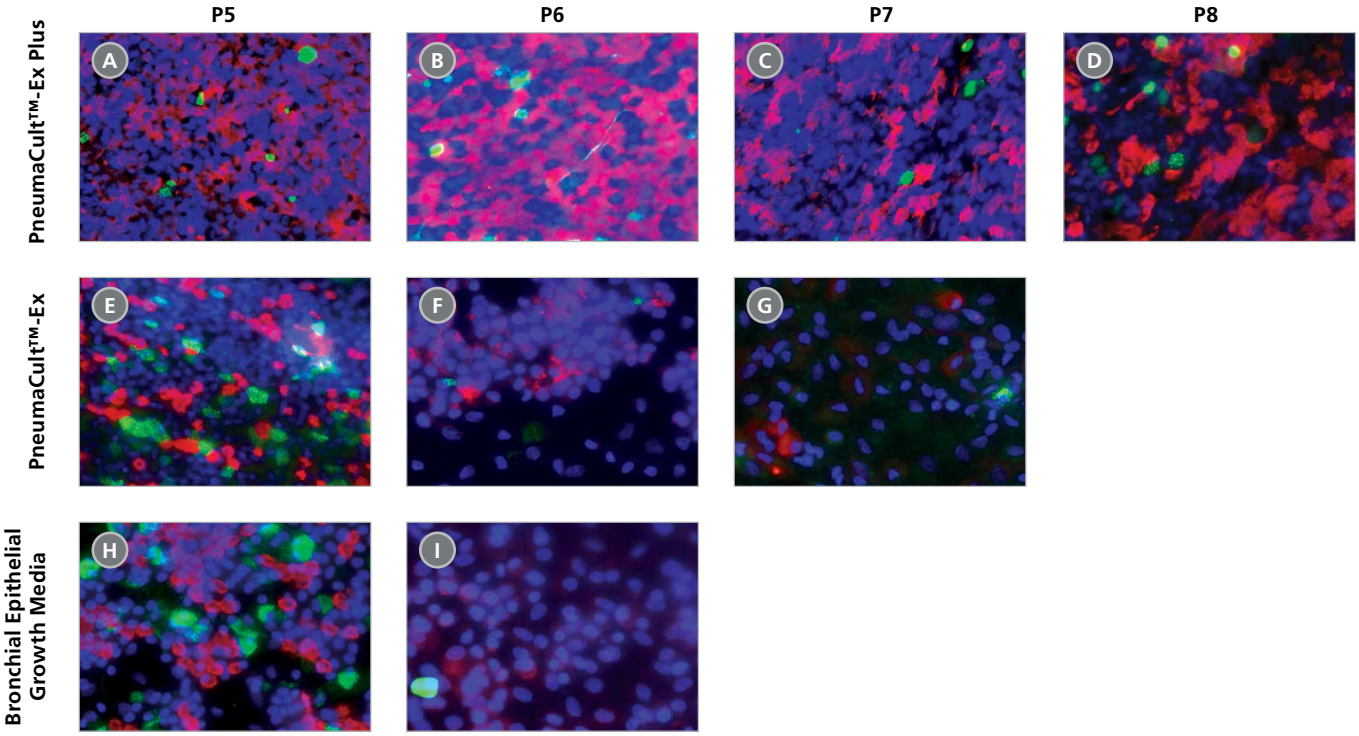

图6. 在PneumaCult™ - Ex Plus中培养的HBECs在传代后期使用Pneumacult™- ALI分化为假复层黏膜纤毛上皮细胞

将P4 HBECs进行接种入PneumaCult™-Ex Plus、PneumaCult™-Ex、或Bronchial Epithelial Growth Media进行传代，然后使用Pneumacult™-ALI，在每代（P5至P8）进行ALI分化。接触空气后的28天，进行纤毛标记物AC-微管蛋白（红色）和杯状细胞标记物Muc5AC（绿色）的抗体染色。细胞核使用DAPI（蓝色）进行标记。所有的图像均使用20倍物镜拍摄。

电生理学功能

检测在不同的扩增培养基扩增的HBECs的电生理学功能，使用尤斯灌流室检测跨膜电阻（TEER）和短路电流（ISC）。跨膜电阻（TEER）代表了融合的上皮细胞层的完整性和健康状况，而短路电流（ISC）测量了整个上皮细胞层的所有离子的主动运输。经过ALI分化之后的28天，与对照培养基相比，最初在PneumaCult™-Ex Plus中培养的HBECs，具有更高的TEER，也就是屏障完整性更好（图7A）。在整个上皮细胞层，它们的药物灵敏程度更高，例如上皮钠通道（ENaC）和囊性纤维化跨膜转导调节因子（CFTR）通道（图7B），表现出更好的离子运输活性。

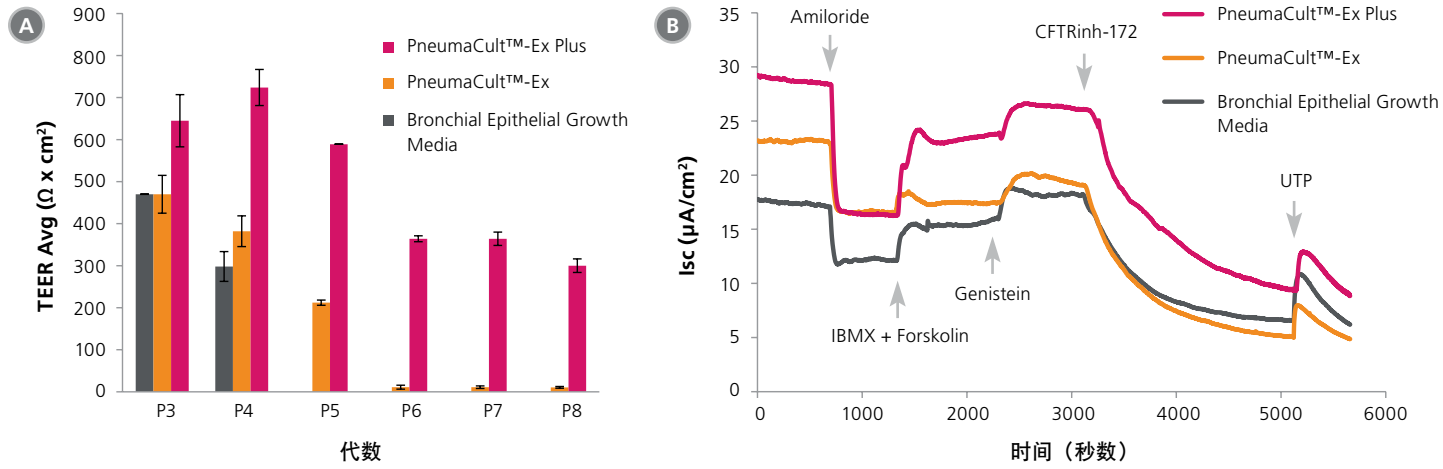

图7. 在PneumaCult™-Ex Plus、PneumaCult™-Ex、以及支气管上皮细胞生长培养基中扩增的HBECs（P4）分化后的电生理学表征。

在PneumaCult™-Ex Plus、PneumaCult™-Ex或Bronchial Epithelial Growth Media中扩增的HBECs，接触空气28天的ALI培养，检测TEER（A）和代表离子通道活性（B）。Amiloride：上皮钠通道（ENaC）抑制剂。IBMX 和 Forskolin：囊性纤维化跨膜转导调节因子（CFTR）活化素。Genistein：CFTR增效剂。CFTRinh-172：CFTR抑制剂。UTP：钙离子激活的氯离子通道（CaCCs）。所有的ALI分化培养都使用PneumaCult™-ALI。

参考文献

1. Rock JR et al. (2009) Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. PNAS (106): 12771-12775.

版权所有© STEMCELL Technologies Inc. 2019。保留一切权利,包括图形和图像。STEMCELL Technologies和其设计及徽标,以及Scientists Helping Scientists, IntestiCult均是STEMCELL Technologies Canada Inc.的注册商标。其他注册商标为各自持有人的产权。 尽管STEMCELL尽一切努力保证STEMCELL及其供应商提供的信息正确，我们免除此类信息准确性或完整性的 声明及保证。本产品是在ISO 13485，医学设备体系下生产的原型。稳定性还未建立。

STEMCELL Technologies Inc.的质量管理体系已经过ISO 13485医疗器械标准认证。产品仅供研究使用。除非另行说明，不可用于人或动物的诊断或治疗。

微信ID: STEMCELLTech

STEMCELL™ TECHNOLOGIES

STEMCELL Technologies China Co. Ltd.

电话：400 885 9050　E-MAIL: INFO.CN@STEMCELL.COM　网站：WWW.STEMCELL.COM

文档号 #27061CN　版本 1.0.0　2019年09月