

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.08.002

一种基于 EdU 的体外癌细胞与小鼠体内组织细胞标记方法的研究*

于雪^{1#} 王栋^{1#} 高阔¹ 张雨婷² 张迪¹ 黄凯¹
刘燕¹ 张淑静¹ 王淑艳^{1Δ}

(1 北京中医药大学中医学院 北京 102488; 2 北京中医药大学北京中医药研究院 北京 102488)

摘要 目的:比较 EdU 标记对三种癌细胞和小鼠对细胞增殖的影响,为 EdU 作为标记开展相关细胞增殖实验和临床研究提供依据。**方法:**本研究使用不同剂量 EdU 对人非小细胞肺癌 A549 细胞、人宫颈癌 Hela 细胞、人肝癌 Huh7 进行标记 2 h,然后使用荧光显微镜观测 EdU 在细胞中的标记效率,并使用多波长荧光酶标仪检测这三种癌细胞系标记后的荧光强度;使用流式细胞仪检测小鼠经不同剂量的 EdU 干预 12 h 后,体内肺、肝、肾组织标记的荧光强度。**结果:**与对照组相比,经 EdU 处理后,A549 和 Hela 细胞系的荧光强度,三个剂量组均有显著性差异($P<0.01$),Huh7 细胞系的荧光强度,50 $\mu\text{mol/L}$ 有显著性差异($P<0.05$);EdU 在小鼠体内组织肺、肝、肾组织中均有分布,且在肝组织中分布比肺组织和肾组织高。**结论:**EdU 的体外癌细胞与小鼠体内组织细胞的标记效率各不相同,建立的 EdU 体外标记癌细胞和小鼠体内组织的方法简单,易操作。

关键词:细胞增殖;EdU 细胞标记;细胞系;体内组织

中图分类号:R-33;R730.231 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2023)08-1405-05

An EdU-based Method for in vitro Cancer Cells and Mouse in vivo Tissues Cells Labeling*

YU Xue^{1#}, WANG Dong^{1#}, GAO Kuo¹, ZHANG Yu-ting², ZHANG Di¹, HUANG Kai¹,
LIU Yan¹, ZHANG Shu-jing¹, WANG Shu-yan^{1Δ}

(1 School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 102488, China;

2 Beijing Institute of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 102488, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of EdU on cell proliferation after in vivo tissue labeling of three types of cancer cells and mice, and to provide basis for EdU as a marker for relevant cell proliferation experiments and clinical studies. **Methods:** In this study, human non-small cell lung cancer A549 cells, human cervical cancer Hela cells and human liver cancer Huh7 cells were labeled with different doses of EdU for 2 h. The labeling efficiency of EdU in the cells was observed by using fluorescence microscopy, and the fluorescence intensity of the three cancer cell lines were measured by using a multi-wavelength fluorescence enzyme standard. The fluorescence intensity of lung, liver and kidney tissue markers in vivo were measured by using flow cytometry in mice after 12 h of intervention with different doses of EdU. **Results:** Compared with that in the control group, the fluorescence intensities of A549 and Hela cell lines after EdU treatment were significantly different in all three dose groups ($P<0.01$), and the fluorescence intensity of Huh7 cell line was significantly different at 50 $\mu\text{mol/L}$ ($P<0.05$); EdU distributed in lung, liver and kidney tissues in mice in vivo, and the distribution was higher in liver tissues than in lung and kidney. The distribution of EdU was higher in liver tissues than that in lung and kidney tissues. **Conclusions:** The labeling efficiency of EdU varies between cancer cells and mouse in vivo tissue cells. The labeling efficiency of EdU in cancer cells in vitro and mouse in vivo tissues are different. The established method for in vitro labeling of cancer cells and mouse in vivo tissues with EdU is simple and easy to operate.

Key words: Cellular value-add; EdU cell labeling; Cell lines; In vivo tissues

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R730.231 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2023)08-1405-05

前言

5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷(EdU)是一种胸腺嘧啶核苷

类似物,能够在 DNA 复制 S 期替代胸腺嘧啶渗入正在合成的 DNA 中,并与显色剂发生共轭反应,被逐渐用于检测细胞增殖^[1,2]。Sallic 等^[2]首次研究了通过使用 EdU 标记后哺乳动物增

* 基金项目:中央高校基本科研业务费自主选题(2019-XJ-SYJJ-006;2022-SYJS-02);国家自然科学基金项目(81903950)

为共同第一作者

作者简介:于雪(1988-),女,硕士研究生,实验师,E-mail: yuxue_bucm@163.com;

王栋(1996-),男,博士研究生,E-mail: 17862987109@163.com

Δ 通讯作者:王淑艳(1968-),女,本科,高级实验师,E-mail: shuyanwang1968@163.com

(收稿日期:2022-11-23 接受日期:2022-12-18)

殖细胞 DNA 合成情况, 随后的研究将其应用于检测多种病理状态下骨髓基质干细胞、神经干细胞、耳蜗细胞等, 或者通过使用 EdU 检测细胞的线粒体 DNA 状态, 以进一步分析其生成、复制过程^[3-7]。这些研究结果表明, 在细胞标记方面, EdU 的使用表现出对细胞的温和作用, 在研究相关疾病、药物毒性或者癌变等方面具有巨大潜力。近年来, 使用 EdU 标记细胞反映细胞的增殖活性的研究逐渐增多^[8,10], 其对细胞的标记水平与细胞活性相关, 细胞活性高、分裂增殖快, 相同时间内细胞标记的染色率高^[11,12]。EdU 法无需使用抗体, 操作便捷、检测灵敏度高, 是一种在 BrdU 法基础上升级换代的新方法。胸腺嘧啶核苷类似物掺入复制 DNA 后的检测是研究细胞 DNA 合成、细胞周期进展、细胞增殖动力学、细胞分裂和细胞活力的有力工具。

本实验通过设置不同浓度 EdU 标记不同癌细胞与小鼠, 使用荧光酶标仪与流式细胞术检测标记水平, 探求最佳标记浓度与标记时间, 得到最佳标记方法, 以期为通过研究细胞 DNA 合成、细胞周期进展等评价药物毒性、癌变等相关疾病实验研究提供方法学参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

胎牛血清 (Gibco)、RPMI 1640 (Gibco)、DMEM 培养基 (Gibco)、0.25%胰酶 (Gibco)、青霉素-链霉素溶液 (10000 U/mL, 索莱宝)、胶原酶 I (索莱宝)、EdU 检测试剂盒购自碧云天 (C0078S)、其他细胞培养相关试剂与耗材均购于北京索莱宝公司; 人非小细胞肺癌 A549 细胞、人宫颈癌 Hela 细胞、人肝癌 Huh7 细胞购于国家实验细胞资源共享平台 (北京总部); 24 只 SPF 级 ICR 小鼠, 雄性, 6~8 周龄, 18~20 g, 购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司, 合格证号 SCXK (京) 2019-0010。本实验经北京中医药大学实验动物伦理委员会批准并通过 (动物伦理编号: BUCM-4-2020100805-4199), 所用实验动物均符合伦理委员会规定; HERAcell vios 160i CO₂ 培养箱 (美国 Thermo Scientific 公司); Spectra Max M3 荧光酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司); Revolve 正倒置一体荧光显微镜 (美国 ECHO 公司); FACSCelesta 流式细胞仪 (美国 BD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 A549 细胞、Hela 细胞和 Huh7 培养与分组 取冻存细胞并复苏, 用含 10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素溶液的 RPMI 1640 培养基培养 A549 细胞, 用含 10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素溶液的 DMEM 培养基培养 Hela 细胞、Huh7 细胞 (37℃、5% CO₂)。当传代至 2-3 代时, 观察到细胞的培养状态良好, 将细胞按照 5×10^4 个/mL, 分别接种于 96 孔板, 当细胞生长至 80%饱和度时, 24 h 后换液, 分为正常组和 EdU 低剂量组 (12.5 μ mol/L)、EdU 中剂量组 (25 μ mol/L)、EdU 高剂量组 (50 μ mol/L)。

1.2.2 荧光染色检测不同 Edu 浓度对不同来源癌细胞细胞的标记效率 使用 EdU 分组处理细胞后, 孵育 2 h, 4%多聚甲醛 30 min 固定, 0.5% TritonX-100 通透 10 min, 每孔 1 mL 洗涤液洗涤 1-2 次后加入 0.5 mL Click 反应液, 轻摇培养板以确保均匀, 孵育 30 min (室温、避光), 弃液后洗涤液洗 3 次, 荧光酶标仪检测荧光强度, 并使用荧光显微镜观察标记情况。

1.2.3 小鼠分组及腹腔注射 EdU 24 只小鼠随机分为 4 组, 每组 6 只, 给药组 EdU (12.5 mg/kg、25 mg/kg、50 mg/kg) 腹腔注射、对照组给予同体积的生理盐水, 所有小鼠均在一次给药 12 h 后取材, 收集小鼠右肺中叶、肝脏右叶前端、左肾上半部进行 EdU 的标记观察。

1.2.4 肺组织总细胞悬液的制备与流式细胞术检测肺组织标记效率 持眼科镊将小鼠肺组织剪碎 (1 mm³), 使用小鼠肺组织固定位置 (右肺中叶), PBS 轻混悬, 4℃、1000 r/min 离心 5 min 弃上清, 2-3 次后, 上清澄清状态, 加入 3 mL 0.1%胶原酶 I 消化液溶液, 培养箱 37℃、5% CO₂ 中 15-20 min, 期间轻振荡, 使主要肺组织块消化成单细胞悬液, 筛网 (100 μ m) 过滤细胞悬液, 滤液中主要为肺上皮细胞和肺成纤维细胞, 1000 r/min 离心 5 min, 去上清 (直接倒), 加入冰冷的 PBS 重悬沉淀, 用血细胞计数仪或全自动细胞计数仪进行细胞计数, 调整细胞浓度 (1×10^7 个/mL)。使用 EdU 染色试剂盒说明书操作要求染色细胞后, 通过流式细胞仪检测 EdU 阳性细胞数。

1.2.5 可用于流式细胞术的肾组织总细胞悬液的制备与流式细胞术检测肾组织标记效率 持眼科剪将小鼠的左肾上半部剪成 1 mm³ 大小的组织块, 然后用预冷的 PBS 溶液轻轻混悬后, 4℃、1000 r/min 离心 5 min, 轻轻倒掉上清, 重复 2-3 次至上清澄清状态, 加入 3 mL 0.1%胶原酶 I 消化液, 于 37℃、5% CO₂ 培养箱中消化 15-20 min, 期间轻轻地振荡使大部分肾组织块被消化为单细胞悬液, 轻柔并充分吹打均匀, 100 μ m 筛网过滤细胞悬液, 去除组织块, 滤液为总细胞, 主要为肾足细胞和上皮细胞。1000 r/min 离心 5 min, 去上清 (直接倒), 加入 5 mL 红细胞裂解液 ($1 \times$), 冰上孵育 4-5 min, 轻轻摇晃 (混匀), 10 mL 冰冷的 PBS 终止裂解, 之后以 4℃ 450 $\times$ g 离心 10 min, 去上清。加入冰冷的 PBS 重悬沉淀, 用血细胞计数仪或全自动细胞计数仪进行细胞计数, 调整细胞浓度 (1×10^7 个/mL)。使用 EdU 染色试剂盒说明书操作要求染色细胞后, 通过流式细胞仪检测 EdU 阳性细胞数。

1.2.6 可用于流式细胞术的肝组织总细胞悬液的制备与流式细胞术检测肝组织标记效率 持眼科剪将小鼠肝组织剪碎 (1 mm³), PBS 溶液轻轻混悬后, 4℃、1000 r/min 离心 5 min, 轻轻倒掉上清, 重复 2-3 次至上清澄清状态, 加入 3 mL 0.1%胶原酶 I 消化液, 于 37℃、5% CO₂ 培养箱中消化 15-20 min, 期间轻轻地振荡使大部分肾组织块被消化为单细胞悬液, 轻柔并充分吹打均匀, 100 μ m 筛网过滤细胞悬液, 去除组织块, 滤液为总细胞如: 肝实质细胞, 肝窦内皮细胞等 1000 r/min 离心 5 min, 去上清 (直接倒), 5 mL 红细胞裂解液 ($1 \times$) 冰上孵育 4-5 min, 轻轻摇晃 (混匀), 10 mL PBS 终止裂解, 之后以 4℃ 450 $\times$ g 离心 10 min, 去上清。加入冰冷的 PBS 重悬沉淀, 用血细胞计数仪或全自动细胞计数仪进行细胞计数, 调整细胞浓度 (1×10^7 个/mL)。使用 EdU 染色试剂盒说明书操作要求染色细胞后, 通过流式细胞仪检测 EdU 阳性细胞数。

1.2.7 统计学分析 所有实验数据经过 SPSS 22.0 软件分析, 所得结果使用 " $\bar{x} \pm s$ " 表示, 组别之间差异分析方法采用 One-Way-Anova, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 荧光酶标仪检测 EdU 对不同来源癌细胞的荧光标记

EdU 标记三种不同来源癌细胞, 使用荧光酶标仪检测发现, 与正常组相比, 经 EdU 处理后, 随着 EdU 浓度增加, A549

细胞和 Hela 细胞荧光强度显著增加, 三个剂量组均有显著性差异 ($P < 0.01$); 与正常组相比, Huh7 细胞 EdU 低剂量组和中剂量组无显著增加, 高剂量组有显著性差异 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 不同浓度 EdU 对不同来源癌细胞标记的荧光强度 (N=6)

Table 1 Fluorescence intensity of cancer cells labeled with different concentrations of EdU (N=6)

Groups	A549	Hela	Huh7
Control	11234.29± 6411.70	8273.17± 1170.25	3608.13± 406.65
EdU LD	25417.58± 3380.21**	30685.16± 2455.26**	3756.09± 148.33
EdU MD	26381.53± 4633.35**	33607.26± 1179.12**	4187.97± 310.08
EdU HD	33396.96± 4555.05**	37139.55± 2134.53**	4695.90± 781.18*

Note: compared with the control group, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$; EdU LD: EdU low dose group, EdU MD: EdU medium dose group, EdU HD: EdU high dose group.

2.2 荧光显微镜观察 EdU 对不同来源癌细胞的荧光标记

EdU 标记三种不同来源癌细胞, 使用正倒置一体荧光显微镜观察发现, 与正常组相比, 经 EdU 处理后, 随着 EdU 浓度增

加, A549 细胞和 Hela 细胞荧光强度显著增加; 与正常组相比, Huh7 细胞 EdU 高剂量组荧光强度有显著增强, 见图 1。

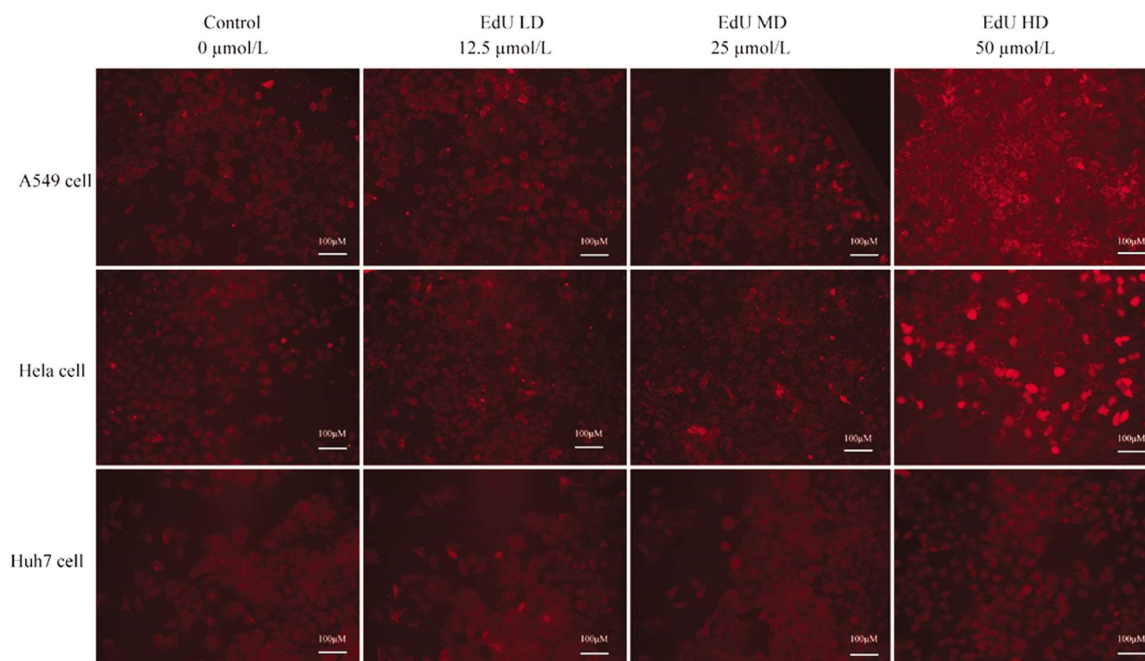


图 1 不同浓度 EdU 对 A549 细胞、HeLa 细胞、Huh7 细胞标记的荧光染色 (10× 10)

Fig.1 Fluorescence of A549 cells, HeLa cells, Huh7 cells labeled with Different concentrations of EdU (10× 10)

注: EdU LD: EdU 低剂量组, EdU MD: EdU 中剂量组, EdU HD: EdU 高剂量组。

Note: EdU LD: EdU low dose group, EdU MD: EdU medium dose group, EdU HD: EdU high dose group.

2.3 小鼠肺、肝和肾单组织单细胞悬液的检测

使用流式细胞仪检测小鼠肺、肝、肾组织总细胞的情况。结果显示, 从小鼠肺、肝、肾组织中获得了足量的单细胞悬液, 细胞的分群比较明显 (图 2)。

2.4 不同浓度 EdU 标记后小鼠体内主要组织分布

使用流式细胞仪检测小鼠经不同浓度 EdU 标记后肺、肝、肾组织的分布情况。结果显示, 不同浓度 EdU 在小鼠肺、肝、肾组织中均有分布, 并且呈现出剂量依赖性, 随着 EdU 标记浓度的降低而降低。另一方面, 同一浓度 EdU 标记小鼠在不同组织中分布有所区别, 三种主要组织中, 在肝组织中分布较肺组织

和肾组织高, 肾组织分布相对较低 (图 3)。

3 讨论

随着细胞生物学的发展, 对细胞的存活、迁徙、分布和转归等研究, 发展出不同的示踪技术以进行识别的监测, 其中对细胞进行核标记是最常用的方法之一。细胞的增殖能力是细胞的一个重要功能, 目前经常使用的 MTT 检测法、CCK-8 检测法等都是基于细胞活性检测细胞增殖和细胞毒性实验常用的检测方法, 能检测细胞整体增殖效果, 但很难实现单细胞检测而受到限制。最精确的检测检测细胞 DNA 的复制和细胞的增殖

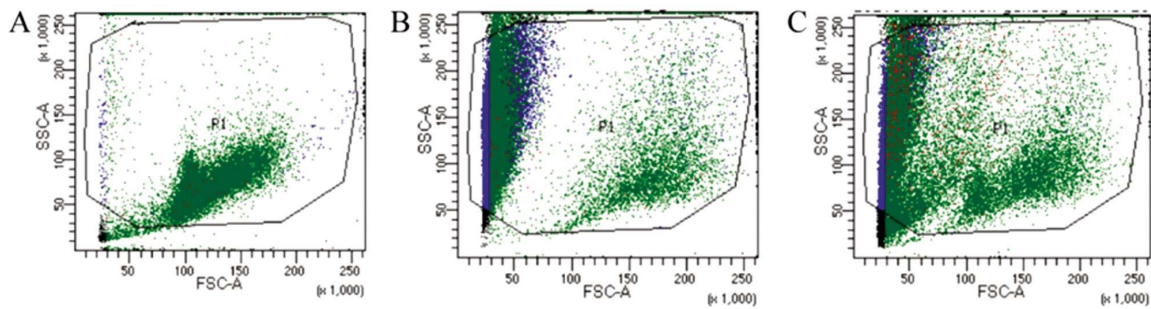


图2 小鼠肺、肝、肾组织单细胞悬液总细胞检测

Fig. 2 Mouse pulmonary, liver and kidney tissue single cell suspension total cell assay

注: A. 小鼠肺组织单细胞悬液细胞情况; B. 小鼠肝组织单细胞悬液细胞情况; C. 小鼠肾组织单细胞悬液细胞情况

Note: A. Cellular profile of single cell suspensions of mouse pulmonary tissue; B. Cellular profile of single cell suspensions of mouse liver tissue; C. Cellular profile of single cell suspensions of mouse kidney tissue.

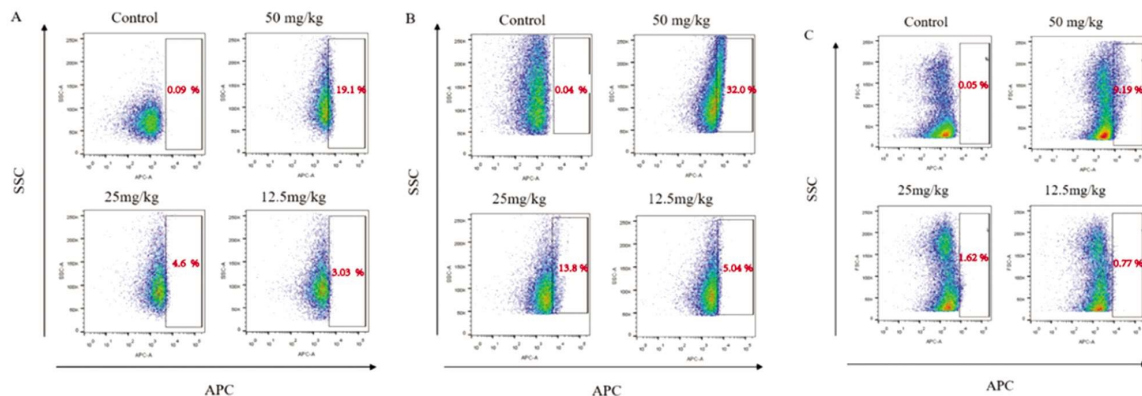


图3 不同浓度 EdU 对小鼠肺、肝、肾组织标记的影响

Fig. 3 Effects of different concentrations of EdU on pulmonary, liver and kidney tissues of mice

注: A. 不同浓度 EdU 对小鼠肺组织的标记; B. 不同浓度 EdU 对小鼠肝组织的标记; C. 不同浓度 EdU 对小鼠肾组织的标记

Note: A. Mouse pulmonary were labeled with different concentrations of EdU; B. Mouse liver were labeled with different concentrations of EdU; C. Mouse kidney were labeled with different concentrations of EdU.

方法是检测细胞中 DNA 的合成, 如最初广泛使用的氚标记胸腺嘧啶脱氧核苷([³H]thymidine)掺入法, 但是该方法由于有放射性, 检测耗费的时间长达数天甚至数月, 随后逐渐被基于抗体检测的 BrdU (bromo-deoxyuridine) 法所替代, BrdU 法适用于体内检测目标细胞的增殖, 但是 BrdU 掺入法有一个不容忽视的缺点, 抗 BrdU 抗体分子太大, 双链 DNA 中配对的碱基会对阻碍掺入的 BrdU 与抗 BrdU 抗体的结合, 同时, BrdU 抗体分子较大导致穿透大块组织标本需要较长的时间, 延长抗体的孵育时间, 又造成工作效率降低。BrdU 法步骤较多, 且需要使用 BrdU 抗体, 稳定性比较差, 成本比较高^[13-15]。EdU 掺入法作为近年来发展起来的一种检测细胞 DNA 复制和增殖方法, 体内和体外增殖反应中都可以利用 EdU 掺入法检测细胞的增殖, 其分子量仅为 252.22, 易透过细胞膜, 可以有效并快速的扩散, 其标记原理是基于其结构中的乙炔基与荧光标记小分子叠氮化合物探针反应, 形成三唑环结构, 复杂且稳定, 使得检测灵敏度更高^[16-18]。

近年来, 作为新型细胞核标记物之一的 EdU, 逐步被用于标记细胞的 DNA 复制、增殖等检测。有研究者使用 EdU 介导的增殖细胞周期进行标记, 研究 VEGF-B 诱导的心脏血管的发育和功能^[19]; 有研究发现^[20], 在小鼠心脏组织细胞增殖的检测过程中, 使用 EdU 能够在不同时期、不同状态下强烈且敏感的标

记心肌组织细胞, 故 EdU 标记可作为检测心脏再生的新方法。有研究者使用荧光原位杂交实验检测干细胞样细胞, 再使用 EdU 进行标记识别增殖的细胞, 结合双标记的结果鉴定活跃增殖的干细胞样细胞^[21]; 有研究者, 使用 EdU 标记乳腺癌细胞, 研究功能获得性突变体 p53 R273H 与复制 DNA 和 PARP1 相互作用^[22]; 有研究者使用 EdU 标记实验分析评估异种移植细胞的细胞周期动力学, 从而在稳态、LGR5 消融和 5- 氟尿嘧啶诱导的粘膜损伤的背景下分析了慢循环人类干细胞或分化细胞的克隆形成能力^[23]。另有研究者^[24,25]在脂肪干细胞进行体外标记后体内示踪的实验中发现, EdU 的使用可以用于标记与示踪体内脂肪干细胞。有研究者^[26-29]对 A549 细胞、神经干细胞、骨髓细胞、肺动脉平滑肌细胞等使用 EdU 掺入法进行检测, 发现 EdU 标记细胞能力可能反映出细胞的增殖活性, 其对细胞的标记水平与细胞活性相关, 具体表现为活性细胞分裂增殖较快而具有更高的染色率, 细胞活性降低或平台期的细胞具有分裂增殖减慢的特点而导致低染色率。因此, 使用 EdU 检测细胞增殖活性实验应注意细胞状态, 细胞状态优良且处于对数期的检测结果相对可靠。另一方面, 高浓度或者长时间的 EdU 标记细胞也将会对其代谢、增殖等生物学过程产生不良影响, 故 EdU 的使用浓度需要确定, 过高浓度的使用易导致细胞死亡, 在 EdU 标记骨髓间充质干细胞实验中发现, 10⁻⁸ mol/L 浓度下 EdU 标

记没有细胞毒性,标记后对干细胞的分化、细胞因子分泌等没有显著作用^[30]。通过使用 EdU 对 T 淋巴细胞亚群进行标记后发现细胞数量在 10^6 时,EdU 标记的最佳浓度为 $10\text{--}50\ \mu\text{M}$,最适培养时间为 $8\text{--}12\ \text{h}$ ^[31],掺入 EdU 的淋巴细胞可在 4°C 、 -80°C 和液氮中保存长达 21 天,该研究以通过 EdU 掺入和流式细胞术检测体外 T 淋巴细胞亚群的增殖并优化了检测条件。

尽管 EdU 较传统细胞核标记物具有一定优势,但是也存在一定的局限性。EdU 标记受细胞增殖速度影响,细胞不活跃影响 EdU 标记的效率,通过提高浓度和延长孵育时间增加 EdU 标记的效率,又存在增加细胞毒性的风险。因此,EdU 标记癌细胞与小鼠体内主要组织分布,作用浓度以及作用时间,值得我们进行研究。本研究初步建立了 EdU 标记不同来源癌细胞的检测方法,即细胞浓度为 5×10^4 个/mL 接种于细胞培养板 24 h 后换液,A549 细胞和 HeLa 细胞使用 $12.5\ \mu\text{mol/L}$ EdU 处理,孵育 2 h 后标记效果更佳,Huh7 细胞使用 $50\ \mu\text{mol/L}$ EdU 处理,孵育 2 h 后标记效果更佳;同时发现 EdU 能迅速灵敏的标记正常的肝、肺和肾脏细胞,其中在小鼠肝组织中标记水平较高,标记数量呈现剂量依赖性,因这一技术具有更加简单、快速、准确的特点,同时表现出对细胞生长、分化等过程影响较小的温和特性,所以 EdU 的使用具备良好的应用与发展前景,本实验为后续通过研究细胞 DNA 合成、细胞周期进展等评价药物毒性、癌变等相关疾病实验研究提供方法学参考。

参考文献(References)

- [1] Buck SB, Bradford J, Gee KR, et al. Detection of S-phase cell cycle progression using 5-ethynyl-2'-deoxyuridine incorporation with click chemistry, an alternative to using 5-bromo-2'-deoxyuridine antibodies [J]. *Biotechniques*, 2008, 44(7): 927-929
- [2] Salic A, Mitchison TJ. A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(7): 2415-2420
- [3] 马孟杰,彭小忠,舒鹏程. COMPASS 核心成员 Ash2l 通过调控细胞周期影响神经祖细胞增殖 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2022, 38(06): 742-748
- [4] Giannelli M, Chellini F, Sassoli C, et al. Photoactivation of bone marrow mesenchymal stromal cells with diode laser: effects and mechanisms of action[J]. *J Cell Physiol*, 2013, 228(1): 172-181
- [5] 韦娟,徐楚帆,朱晓燕,等. 小鼠 II 型肺泡上皮细胞类器官三维培养体系的建立[J/OL]. *生理学报*: 1-21 [2022-07-26]
- [6] Kotogány E, Dudits D, Horváth GV, et al. A rapid and robust assay for detection of S-phase cell cycle progression in plant cells and tissues by using ethynyl deoxyuridine[J]. *Plant Methods*, 2010, 6(1): 5
- [7] Zhao H, Dobrucki J, Rybak P, et al. Induction of DNA damage signaling by oxidative stress in relation to DNA replication as detected using "click chemistry" [J]. *Cytometry A*, 2011, 79 (11): 897-902
- [8] Chippalkatti R, Suter B. 5-Ethynyl-2'-Deoxyuridine/Phospho-Histone H3 Dual-Labeling Protocol for Cell Cycle Progression Analysis in *Drosophila* Neural Stem Cells[J]. *J Vis Exp*, 2021, 4: 171
- [9] Correll MH, Crouzet E, Gain P, et al. In Vivo Labeling and Tracking of Proliferating Corneal Endothelial Cells by 5-Ethynyl-2'-Deoxyuridine in Rabbits[J]. *Transl Vis Sci Technol*, 2021, 10(11): 7
- [10] Manska S, Octaviano R, Rossetto CC. 5-Ethynyl-2'-deoxycytidine and 5-ethynyl-2'-deoxyuridine are differentially incorporated in cells infected with HSV-1, HCMV, and KSHV viruses [J]. *J Biol Chem*, 2020, 295(18): 5871-5890
- [11] Kaiser CL, Kamien AJ, Shah PA, et al. 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine labeling detects proliferating cells in the regenerating avian cochlea [J]. *Laryngoscope*, 2009, 119(9): 1770-1775
- [12] Zeng C, Pan F, Jones LA, et al. Evaluation of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine staining as a sensitive and reliable method for studying cell proliferation in the adult nervous system [J]. *Brain Res*, 2010, 1319: 21-32
- [13] Solius GM, Maltsev DI, Belousov VV, et al. Recent advances in nucleotide analogue-based techniques for tracking dividing stem cells: An overview[J]. *J Biol Chem*, 2021, 297(5): 101345
- [14] 刘子双一,王德利,阮狄克. 细胞核标记物 5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷的研究及应用进展[J]. *北京医学*, 2014, 36(06): 474-477
- [15] Bradford JA, Clarke ST. Dual -pulse labeling using 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) and 5-bromo-2'-deoxyuridine(BrdU) in flow cytometry[J]. *Curr Protoc Cytom*, 2011, 7: 7-38
- [16] Diermeier-Daucher S, Clarke ST, Hill D, et al. Cell type specific applicability of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) for dynamic proliferation assessment in flow cytometry[J]. *Cytometry A*, 2009, 75 (6): 535-546
- [17] 陈挑调,柏建安,叶木杰,等. 奥曲肽联合黄芩素抑制胰腺神经内分泌肿瘤细胞增殖和迁移 [J]. *现代生物医学进展*, 2022, 22(12): 2201-2207
- [18] Zessin PJ, Finan K, Heilemann M. Super-resolution fluorescence imaging of chromosomal DNA [J]. *J Struct Biol*, 2012, 177: 344-348
- [19] Fujita S, Kuranaga E, Miura M, et al. Fluorescent In Situ Hybridization and 5-Ethynyl-2'-Deoxyuridine Labeling for Stem-like Cells in the Hydrozoan Jellyfish *Cladonema pacificum*[J]. *J Vis Exp*, 2022, 8: 186
- [20] 曾彬,唐艳红,王艾丽. EdU 标记心脏细胞增殖: 一种检测心脏再生的新方法[J]. *武汉大学学报*, 2014, 35(12): 862-866
- [21] Räsänen M, Sultan I, Paech J, et al. VEGF-B Promotes Endocardium-Derived Coronary Vessel Development and Cardiac Regeneration[J]. *Circulation*, 2021, 143(1): 65-77
- [22] Xiao G, Lundine D, Annor GK, et al. Gain-of-Function Mutant p53 R273H Interacts with Replicating DNA and PARP1 in Breast Cancer[J]. *Cancer Res*, 2020, 80(3): 394-405
- [23] Ishikawa K, Sugimoto S, Oda M, Fujii M, et al. identification of Quiescent LGR5+ Stem Cells in the Human Colon[J]. *Gastroenterology*, 2022, 163(5): 1391-1406
- [24] Huang YC, Ning H, Shindel AW, et al. The effect of intracavernous injection of adipose tissue-derived stem cells on hyperlipidemia-associated erectile dysfunction in a rat model[J]. *J Sex Med*, 2010, 7(4 Pt 1): 1391-1400
- [25] 转黎,王涛,李明超,等. 氯甲基苯甲酰氨和 5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷标记示踪大鼠脂肪干细胞的研究[J]. *中华实验外科杂志*, 2013, 30(08): 1701-1703
- [26] Zhao H, Dobrucki J, Rybak P, et al. Induction of DNA damage signaling by oxidative stress in relation to DNA replication as detected using "click chemistry" [J]. *Cytometry A*, 2011, 79 (11): 897-902

- [12] Xiao L, Liu C, Wang B, et al. Targeting Discoidin Domain Receptor 2 for the Development of Disease-Modifying Osteoarthritis Drugs[J]. *Cartilage*, 2021, 13(2_suppl): 1285S-1291S
- [13] 闫晓彤,朱婷,章晓乐,等.补肾活血方联合补佳乐对宫腔粘连大鼠 YAP1/TGF- β _1 信号通路的影响 [J]. *陕西中医*, 2022, 43(8): 987-991
- [14] 段华,甘露.宫腔粘连子宫腔整复手术质量控制[J].*中国实用妇科与产科杂志*, 2022, 38(1): 36-40
- [15] 许秀秀,王静.自拟祛瘀益肾汤对中重度宫腔粘连 TCRA 术后患者子宫动脉血流及内膜修复因子的影响[J].*广西中医药*, 2021, 44(6): 23-25
- [16] Kislal S, Jin W, Maesner C, et al. Mismatch between obesogenic intrauterine environment and low-fat postnatal diet may confer offspring metabolic advantage[J]. *Obes Sci Pract*, 2021, 7(4): 450-461
- [17] Mao X, Tao Y, Cai R, et al Cross-linked hyaluronan gel to improve pregnancy rate of women patients with moderate to severe intrauterine adhesion treated with IVF: a randomized controlled trial [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2020, 301(1): 199-205
- [18] Pan LZ, Wang Y, Chen X. A randomized controlled study on an integrated approach to prevent and treat re-adhesion after transcervical resection of moderate-to-severe intrauterine adhesions [J]. *Clinics (Sao Paulo)*, 2021, 76(2): e1987
- [19] Mohamed HA, Said RS. Coenzyme Q10 attenuates inflammation and fibrosis implicated in radiation enteropathy through suppression of NF- κ B/TGF- β /MMP-9 pathways[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 92(2): 107347
- [20] Diaz-Cueto L, Dominguez-Lopez P, Paniagua L, et al. Cadmium exposure reduces invasion of the human trophoblast-derived HTR-8/SVneo cells by inhibiting cell adhesion and matrix metalloproteinase-9 secretion [J]. *Reprod Toxicol*, 2021, 100 (2): 68-73
- [21] Chen JX, Yi XJ, Gu PL, et al. The role of KDR in intrauterine adhesions may involve the TGF- β 1/Smads signaling pathway[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2019, 52(10): e8324
- [22] Malcor JD, Juskaite V, Gavrilidou D, et al. Coupling of a specific photoreactive triple-helical peptide to crosslinked collagen films restores binding and activation of DDR2 and VWF [J]. *Biomaterials*, 2018, 182(5): 21-34
- [23] Mu N, Gu JT, Huang TL, et al. Blockade of Discoidin Domain Receptor 2 as a Strategy for Reducing Inflammation and Joint Destruction in Rheumatoid Arthritis Via Altered Interleukin-15 and Dkk-1 Signaling in Fibroblast-Like Synoviocytes [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2020, 72(6): 943-956
- [24] Xin L, Lin X, Zhou F, et al. A scaffold laden with mesenchymal stem cell-derived exosomes for promoting endometrium regeneration and fertility restoration through macrophage immunomodulation [J]. *Acta Biomater*, 2020, 113(11): 252-266
- [25] Tukia E, Wagner B, Vainio K, et al. The Effect of Uterine Lavage on Soluble CD14, Chemokine Ligand 2, and Interleukin 10 Levels in Mares With Postpartum Metritis [J]. *J Equine Vet Sci*, 2021, 98(5): 103365
- [26] 朱端荣,周秋明,胡玉利,等.宫腔镜下冷刀分离术与电切术治疗宫腔粘连的疗效及对宫腔形态恢复和血清白细胞介素的影响 [J].*现代生物医学进展*, 2021, 21(24): 4786-4790
- [27] 黄丹,尤共平,张晓蕾,等.血清妊娠相关血浆蛋白 -A、白介素 -8 与输卵管妊娠患者保守治疗效果的相关性[J].*中国性科学*, 2022, 31 (8): 114-117
- [28] Ediriweera MK, Tennekoon KH, Samarakoon SR. Role of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in ovarian cancer: Biological and therapeutic significance [J]. *Semin Cancer Biol*, 2019, 59 (5): 147-160
- [29] Xu XX, Zhang SS, Lin HL, et al. Metformin Promotes Regeneration of the Injured Endometrium Via Inhibition of Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis[J]. *Reprod Sci*, 2019, 26(4): 560-568
- [30] Liu S, Huang X, Liu Y, et al. Functional analysis of miRNAs combined with TGF- β 1/Smad3 inhibitor in an intrauterine rat adhesion cell model[J]. *Mol Cell Biochem*, 2020, 470(1-2): 15-28

(上接第 1409 页)

- [27] Culley DJ, Boyd JD, Palanisamy A, et al. Isoflurane decreases self-renewal capacity of rat cultured neural stem cells [J]. *Anesthesiology*, 2011, 115(4): 754-763
- [28] 史贵秀,孙丽华,张跃新. 5-乙炔基-2'脱氧尿嘧啶核苷标记大鼠骨髓间充质干细胞的有效性[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(01): 17-21
- [29] 宋正阳,施晓倩,田云娜,等.基于 AMPK/mTOR 信号通路的细胞自噬对大鼠肺动脉平滑肌细胞增殖和凋亡的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2022, 38(08): 1416-1423
- [30] Ning H, Albersen M, Lin G, et al. Effects of EdU labeling on mesenchymal stem cells[J]. *Cytotherapy*, 2013, 15(1): 57-63
- [31] Sun Y, Sun Y, Lin G, et al. Multicolor flow cytometry analysis of the proliferations of T-lymphocyte subsets in vitro by EdU incorporation [J]. *Cytometry A*, 2012, 81(10): 901-909