

· 综 述 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.32.042

EdU 与 BrdU 在检测细胞增殖中的特点及应用进展*

罗 涛 综述,王彤敏,李力燕[△] 审校

(昆明医科大学神经科学研究所,昆明 650500)

[关键词] EdU;BrdU;细胞增殖

[中图分类号] R-1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)32-4581-03

细胞增殖是细胞在周期调控因子的作用下,通过 DNA 复制、RNA 转录和蛋白质合成等一系列复杂反应而进行的分裂过程,是生物体生长、发育、繁殖和遗传的基础^[1]。细胞增殖检测广泛应用于分子生物学、免疫学、肿瘤生物学、药理学等研究领域,是评价细胞代谢、生理和病理状况的重要方法^[2]。目前,常用的方法包括胸腺嘧啶核苷渗入法、MTT 检测法、羟基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺脂(CFSE)检测法等。但最直接精确的就是利用胸腺嘧啶核苷酸类似物检测新合成的 DNA,即 5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷(5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU)和 5-溴-2'-脱氧尿嘧啶核苷(5-bromo-2'-deoxyuridine, BrdU)标记^[3]。

1 EdU 检测增殖细胞的特点及原理

EdU 是一种胸腺嘧啶核苷的类似物,其化学结构特点是脱氧胸腺嘧啶环上与 5 位 C 原子相连的甲基被乙炔基取代,在 S 期细胞增殖时可作为底物掺入到正在复制的 DNA 链中,通过与染料的共轭反应可以进行高效快速的细胞增殖检测^[4-5],其中,乙炔基能够与一种荧光标记的小分子叠氮化合物探针反应,形成稳定的三唑环,该反应是一种被称作“click”化学作用的 Cu⁺催化的环加成作用^[6-7]。EdU 的[3+2]环加成作用由 Cu⁺催化完成,由于 Cu⁺盐的低溶解度,Cu⁺通常以配基的形式引入到[3+2]环加成作用之中^[8]。与传统的免疫荧光染色比较,EdU 反应非常快速,能在几分钟内完成,且不需要进行 DNA 变性处理,只需简单的几个步骤,使得组织成像更简单易行^[4],因此也适用于高通量筛选试验,尤其适合进行 siRNA、miRNA、小分子化合物及其他药物的筛选实验^[9-10]。

2 EdU 标记技术在细胞增殖检测中的应用进展

近年来,EdU 标记技术在检测细胞增殖的实验中发挥了重要作用,使用范围越来越广泛。有学者^[11]将 EdU 作为细胞增殖的分子探针,应用于高含量的 siRNA (high-content siRNA, HCS)筛选试验,对细胞增殖进行评估。Ohno 等^[12]首次并成功利用噬菌体荧光标记与 EdU 来评估噬菌体的宿主范围,并揭示 EdU 可能会应用于各种类型的噬菌体。Guo 等^[13]通过腹腔注射 EdU,检测 GK 及 Wistar 大鼠导管球囊损伤后新生内膜形成的 DNA 合成情况,验证了 EdU 掺入和染色是血管内膜检测 DNA 合成快速、有效的手段。Wiebusch 等^[14]使用 EdU 和流式细胞仪研究人巨细胞病毒细胞周期的基因表达。Sun 等^[15]发现,EdU 阳性细胞数与 EdU 浓度、孵育时间,以及“click”反应溶液的体积相关,最佳的 EdU 浓度 10~50 μmol/L,最佳孵育时间为 8~12 h。Hoshi 等^[16]通过把 EdU 掺入到 DNA 中,产生复制带,分析复制带染色体结构,对染色体高级结构的功能意义提出了新的见解。Zhao 等^[17]发现 EdU 与 DNA 的结合会诱导 DNA 损伤,并通过细胞周期扰乱细胞的进展,随后诱导细胞凋亡,此外,在非小细胞肺腺癌

A549 细胞上进行了测试^[18-19]。Andersen 等^[20]的研究发现,EdU 在体外和体内都对细胞存活具有很高的冲击,从体内移植到再生肌肉,EDU 标记的干细胞难以存活,即使在低 EdU 浓度下,细胞存活和表型都大幅受损,肌分化潜能也受到抑制。Kohlmeier 等^[21]使用 EdU 标记小鼠胚胎干细胞后得出结论,EdU 的使用对 DNA 标记是有限的,因为长时间的培养将发生一定程度的 EdU 依赖性细胞周期扰动和细胞死亡,不同细胞系中细胞死亡的程度与 EdU 的掺入量有关,减少标记过程中 EdU 使用浓度很可能会限制其对细胞增殖的影响。

3 BrdU 检测增殖细胞的特点及原理

BrdU 是另一种嘧啶类似物,其化学结构特点是溴替代了胸腺嘧啶环与 5 位 C 原子连接的甲基,可竞争性掺入到 S 期新合成的 DNA 中,利用免疫荧光技术标记增殖细胞^[22],如同时结合其他细胞标记物进行双重染色,可判断细胞种类及增值速度,对研究细胞动力学有重要意义。目前,BrdU 标记新合成 DNA 的方法在动物细胞组织的肿瘤生物学、遗传学、分子生物学等领域得到广泛应用^[23]。

4 BrdU 标记技术在细胞增殖检测中的应用进展

80 年代以来,国外对 BrdU 标记方法进行了大量研究,其作为 DNA 前体类似物替代掺入 S 期细胞,阳性结果表达了 S 期细胞新合成 DNA 的水平。研究发现,BrdU 用于神经前体细胞的研究,克服了以往实验方法无法对原位标记新生细胞的增殖及分化进行观察的缺点,用于原位标记齿状回神经前体细胞可以准确地反映成年脑组织神经发生水平^[24-26]。Tanaka 等^[27]用 BrdU 和 Ki67 抗体通过荧光双标染色和过氧化物酶免疫组化,准确测定增殖细胞中 S 期分数。Ogawa 等^[28]则通过对孕鼠进行腹腔注射 BrdU,清楚地观察到新生鼠嗅觉系统相关的大脑区域 c-Fos 蛋白阳性细胞数明显增加。Schmuck 等^[29]通过用 BrdU 掺入标记新生成的神经干细胞,快速地追踪到其最终位置,并量化 BrdU 阳性细胞的密度。Bonvicini 等^[30]利用 BrdU 标记准确定位微小病毒 B19 感染的细胞,并在增殖细胞体外感染的过程中测定 DNA 含量,发现 BrdU 剂量不受细胞和病毒复制的干扰,是研究病毒-宿主之间相互作用及不同疾病病因作用的有价值的工具。Vermeulen 等^[31]用 BrdU 标记技术检测和鉴定特异性猫 T 淋巴细胞病毒抗原体外增殖反应。Ivashkina 等^[32]通过 BrdU 标记技术发现,在训练的影响下,小鼠大脑中各种结构的 BrdU 阳性细胞数增加,表明 DNA 合成增加。Portugal 等^[33]利用 BrdU 和绿色荧光蛋白表达,隔离了非洲猪瘟病毒重组体,进一步为野生型病毒基因组的处理提供了有效方法。然而,细胞的生长特性也会受到 BrdU 的影响,导致细胞出现分化异常、毒性反应、增殖抑制、DNA 突变及细胞周期延长等变化^[34-35]。值得注意的是,BrdU

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(31260253,81160370);云南省应用基础研究-昆医联合专项(2011FB219)。 作者简介:罗涛(1989-),硕士,主要从事人体解剖与组织胚胎学研究。 [△] 通讯作者,E-mail:kmllyanl@163.com。

的标记率不高且对标记细胞具有一定的毒性,毒性作用将随着标记时间的延长而增强,在体外应用时毒性较大,而应用于体内时,毒性明显减轻^[34-36]。

5 EdU 标记与 BrdU 标记方法的比较

首先,相比于 BrdU 检测方法,EdU 在 DNA 合成的过程中引入快速“click”化学反应,并且不需要苛刻的、化学性的或 DNA 结构酶的破坏^[37]。而 BrdU 抗体分子大,掺入双链 DNA 内的 BrdU,以氢键与腺嘌呤结合,不能直接与 BrdU 抗体反应,需经解链暴露出 DNA 双链中的 BrdU 方能被染色。DNA 内部较难变性,如需在测定细胞增殖能力的同时检测细胞的总 DNA 含量,变性条件下的 DNA 双链结构受到严重破坏,其他核酸标记探针就不容易识别 DNA,因而也无法准确统计新合成 DNA 总量。DNA 变性可能破坏细胞内蛋白的抗原识别位点,限制了 BrdU 检测法中同时检测其他蛋白的应用^[38-39]。其次,EdU 只有 BrdU 抗体大小的 1/500,在细胞内更容易扩散,不需要严格的样品变性处理,有效地避免了样品损伤,有助于在组织、器官的整体水平上观测细胞增殖的真实情况,具有更高的灵敏度和更快的检测速度^[40]。但是,与 BrdU 一样,EdU 也有毒性,EdU 的掺入会对裂殖的 DNA 产生损伤,影响细胞的连续繁殖^[41]。同样类似的毒害效应也发生在 EdU 标记动物细胞基因组 DNA 时,表明 EdU 只能用于短时期和单细胞周期的实验标记,而 BrdU 则适用于连续标记多个细胞周期^[5]。

6 结 语

EdU 与 BrdU 标记作为两种胸苷类似物掺入到新合成的 DNA 链中来检测细胞增殖,是一种新型的非放射性同位素细胞增殖检测方法,在细胞培养、实体组织及临床研究均得到了广泛的应用。但两种方法都各有长短,所以,在具体的实验中,应结合实验目的与实验要求,使用多种检测手段,以便更加简单、快速、准确地反映实验结果,双重或多重标记往往会达到事半功倍的效果。在未来的科研进程中,EdU 和 BrdU 标记肯定会继续发挥其突出的作用,当然,新的细胞增殖检测手段也必然会随之产生。

参考文献

- [1] Immenschuh S, Baumgart-Vogt E. Peroxiredoxins, oxidative stress, and cell proliferation[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2005, 7(5/6): 768-777.
- [2] Chiu J, Dawes IW. Redox control of cell proliferation[J]. *Trends Cell Biol*, 2012, 22(11): 592-601.
- [3] Weizman H, Tor Y. Redox-active metal-containing nucleotides: synthesis, tunability, and enzymatic incorporation into DNA[J]. *J Am Chem Soc*, 2002, 124(8): 1558-1569.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] Torne CW, Christensen C, Meldal M. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regioselective copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides[J]. *J Org Chem*, 2002, 67(9): 3057-3064.
- [7] Rostovtsev VV, Green LG, Fokin VV, et al. A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2002, 41(14): 2596-2599.
- [8] Chan TR, Hilgraf R, Sharpless KB, et al. Polytriazoles as copper (I)-stabilizing ligands in catalysis[J]. *Org Lett*, 2004, 6(17): 2853-2855.
- [9] Wang QQ, Zhang ZY, Xiao JY, et al. Knockdown of nucleophosmin induces S-phase arrest in HepG2 cells[J]. *Chin J Cancer*, 2011, 30(12): 853-860.
- [10] Jiang B, Li Z, Zhang W, et al. miR-874 Inhibits cell proliferation, migration and invasion through targeting aquaporin-3 in gastric cancer[J]. *J Gastroenterol*, 2014, 49(6): 1011-1025.
- [11] Miao Juan C, DeZhong Q, WeiLin C, et al. 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine as a molecular probe of cell proliferation for high-content siRNA screening assay by "click" chemistry [J]. *Science China (Chemistry)*, 2011, 54(11): 1702-1710.
- [12] Ohno S, Okano H, Tanji Y, et al. A method for evaluating the host range of bacteriophages using phages fluorescently labeled with 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU)[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 95(3): 777-788.
- [13] Guo J, Li D, Bai S, et al. Detecting DNA synthesis of neointimal formation after catheter balloon injury in GK and in Wistar rats: using 5-ethynyl-2'-deoxyuridine[J]. *Card Diabetol*, 2012, 11(1): 150.
- [14] Wiebusch L, Hagemeyer C. Use of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine labelling and flow cytometry to study cell cycle-dependent regulation of human cytomegalovirus gene expression[J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1119: 123-132.
- [15] 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.
- [16] Hoshi O, Ushiki T. Replication banding patterns in human chromosomes detected using 5-ethynyl-2'-deoxyuridine incorporation[J]. *Acta Histochem Cytochem*, 2011, 44(5): 233-237.
- [17] Zhao H, Halicka HD, Li J, et al. DNA damage signaling, impairment of cell cycle progression, and apoptosis triggered by 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine incorporated into DNA[J]. *Cytometry A*, 2013, 83(11): 979-988.
- [18] Zhao H, Dobrucki J, Rybak P, et al. Induction of DNA damage signaling by oxidative stress in relation to DNA replication as detected using the "Click Chemistry"[J]. *Cytometry A*, 2011, 79(11): 897-902.
- [19] Zhao H, Dobrucki J, Rybak P, et al. Relationship of DNA damage signaling induced by DNA topoisomerase inhibitors camptothecin/topotecan, mitoxantrone or etoposide and DNA replication[J]. *Cytometry A*, 2012, 81(1): 45-51.
- [20] Andersen DC, Skovrind I, Christensen ML, et al. Stem cell survival is severely compromised by the thymidine analog EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine), an alternative to BrdU for proliferation assays and stem cell tracing [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405(29): 9585-9591.
- [21] Kohlmeier F, Maya-Mendoza A, Jackson DA. EdU induces DNA damage response and cell death in mESC in

- culture[J]. *Chromosome Res*, 2013, 21(1):87-100.
- [22] Taupin P. BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation [J]. *Brain Res Rev*, 2007, 53(1):198-214.
- [23] Liu H, Liu YQ, Xu AH, et al. A novel anticancer agent, retigeric acid B, displays proliferation inhibition, S phase arrest and apoptosis activation in human prostate cancer cells[J]. *Chem Biol Interact*, 2010, 188(3):598-606.
- [24] Novikova LN, Brohlin M, Kingham PJ, et al. Neuroprotective and growth-promoting effects of bone marrow stromal cells after cervical spinal cord injury in adult rats [J]. *Cytotherapy*, 2011, 13(7):873-887.
- [25] Dawley EM, O Samson S, Woodard KT, et al. Spinal cord regeneration in a tail autotomizing urodele[J]. *J Morphol*, 2012, 273(2):211-225.
- [26] Kuwagata M, Ogawa T, Nagata T, et al. The evaluation of early embryonic neurogenesis after exposure to the genotoxic agent 5-bromo-2'-deoxyuridine in mice [J]. *Neurotoxicology*, 2007, 28(4):780-789.
- [27] Tanaka R, Tainaka M, Ota T, et al. Accurate determination of S-phase fraction in proliferative cells by dual fluorescence and peroxidase immunohistochemistry with 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) and Ki67 antibodies[J]. *J Histochem Cytochem*, 2011, 59(8):791-798.
- [28] Ogawa T, Kuwagata M, Muneoka K, et al. Abnormal brain function of the rat neonate in a prenatal 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)-induced developmental disorder model[J]. *Int J Dev Neurosci*, 2012, 30(6):507-515.
- [29] Schmuck M, Temme T, Heinz S, et al. Automatic counting and positioning of 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) positive cells in cortical layers of rat brain slices[J]. *Neurotoxicology*, 2014(14):127-133.
- [30] Bonvicini F, Mirasoli M, Manaresi E, et al. Development of chemiluminescent assays for the quantitative detection and imaging of 5-bromo-2' deoxyuridine-labeled DNA in parvovirus B19-infected cells [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405(2/3):941-949.
- [31] Vermeulen BL, Gleich SE, Dedeurwaerder A, et al. In vitro assessment of the feline cell-mediated immune response against feline panleukopeniavirus, calicivirus and felid herpesvirus 1 using 5-bromo-2'-deoxyuridine labeling[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2012, 146(2):177-184.
- [32] Ivashkina OI, Zots MA, Bezriadnov DV, et al. Increased 5-bromo-2'-deoxyuridine incorporation in various brain structures following passive avoidance training in mice [J]. *Bull Exp Biol Med*, 2012, 154(1):171-173.
- [33] Portugal R, Martins C, Keil GM. Novel approach for the generation of recombinant African swine fever virus from a field isolate using GFP expression and 5-bromo-2'-deoxyuridine selection[J]. *J Virol Methods*, 2012, 183(1):86-89.
- [34] Lehner B, Sandner B, Marschallinger J, et al. The dark side of BrdU in neural stem cell biology: detrimental effects on cell cycle, differentiation and survival[J]. *Cell Tissue Res*, 2001, 345(3):313-328.
- [35] Caldwell MA, He X, Svendsen CN. 5-bromo-2'-deoxyuridine is selectively toxic to neuronal precursors in vitro [J]. *Eur J Neurosci*, 2005, 22(11):2965-2970.
- [36] Hancock A, Priestler C, Kidder E, et al. Does 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) disrupt cell proliferation and neuronal maturation in the adult rat hippocampus in vivo[J]. *Behav Brain Res*, 2009, 199(2):218-221.
- [37] Qu D, Wang G, Wang Z, et al. 5-Ethynyl-2'-deoxycytidine as a new agent for DNA labeling: Detection of proliferating cells[J]. *Anal Biochem*, 2011, 417(1):112-121.
- [38] Liu L, Yang LY. Detection of DNA Synthesis in Proliferating Cells with EdU [J]. *Med Recapitulate*, 2010, 16(19):2901-2904.
- [39] Rakic P. Neurogenesis in adult primate neocortex: an evaluation of the evidence[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2002, 3(1):65-71.
- [40] 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]. *Bio Techniques*, 2008, 44(7):927-929.
- [41] Hua H, Kearsey SE. Monitoring DNA replication in fission yeast by incorporation of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(9):1-6.

(收稿日期:2015-07-12 修回日期:2015-08-16)

• 综述 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.32.043

不同年龄阶段恶性肿瘤儿童生存质量评价量表及其应用的研究进展*

王紫娟, 刘洋, 石林综述, 莫霖[△]审校
(重庆医科大学附属儿童医院特需门诊 400014)

[关键词] 恶性肿瘤; 儿童; 生存质量; 生存质量评价量表

[中图分类号] R-1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)32-4583-04

近年来,我国儿童恶性肿瘤的病死率逐年上升,占儿童疾病死亡的第2位,仅次于意外伤害。儿童常见恶性肿瘤按其发

* 基金项目:重庆市沙坪坝区科学技术委员会资助项目(PJ20140030)。 作者简介:王紫娟(1990-),在读硕士,主要从事儿童肿瘤护理研究。 [△] 通讯作者, E-mail: molin999@126.com。