

本文引用: 王静, 孟新秀, 刘书琴, 等. 基于胞质分裂的增殖心肌细胞探针检测方法的建立[J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30(10): 890-895. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2022.10.009.

· 方法学研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2022)30-10-0890-06

## 基于胞质分裂的增殖心肌细胞探针检测方法的建立

王静<sup>1,2</sup>, 孟新秀<sup>1,2</sup>, 刘书琴<sup>1,2</sup>, 赵璇<sup>1,2</sup>, 肖俊杰<sup>1,2</sup>

(1. 上海大学附属南通医院(南通市第六人民医院) 上海大学老年医学研究院, 江苏省南通市 226011;

2. 上海大学上海器官修复工程技术研究中心 上海大学心血管研究所, 上海市 200444)

**[摘要]** **[目的]** 基于双荧光探针方法, 探究全新的在活细胞水平检测心肌细胞增殖的实验方法, 该方法能排除多核心肌细胞核复制带来的假阳性细胞, 为精准探测心肌细胞增殖提供实验参考。**[方法]** 以细胞内细胞分裂周期蛋白 20 (CDC20) 和痉挛性截瘫蛋白 20 (SPG20) 作为探针靶点, 构建分子探针, 采用脂质体转染试剂 2000 (Lipo-2000) 作为探针载体, 将探针转染到细胞中, 在活细胞水平检测 CDC20 和 SPG20 双阳性的细胞, 即为发生胞质分裂的增殖细胞。**[结果]** 细胞不发生增殖时, 荧光探针无法检测到目的序列, 细胞不发光; 细胞核复制分裂但不发生胞质分裂时, 两个荧光探针不能同时检测到序列, 细胞不同时发两种荧光; 细胞发生胞质分裂的增殖时, 细胞同时发两种荧光。**[结论]** 使用 CDC20/SPG20 双荧光探针方法, 能够准确检测发生胞质分裂的增殖的心肌细胞, 从而排除因核增殖产生的细胞增殖假阳性问题, 使细胞增殖的检测精准度更高。

**[关键词]** 心肌细胞; 细胞增殖; 探针; 活细胞检测; 胞质分裂

**[中图分类号]** R363; R5

**[文献标识码]** A

### The establishment of a probe method for the detection of proliferating cardiomyocytes based on mitosis with complete cytokinesis

WANG Jing<sup>1,2</sup>, MENG Xinxu<sup>1,2</sup>, LIU Shuqin<sup>1,2</sup>, ZHAO Xuan<sup>1,2</sup>, XIAO Junjie<sup>1,2</sup>

(1. Institute of Geriatrics of Shanghai University & Affiliated Nantong Hospital of Shanghai University (the Sixth People's Hospital of Nantong), Nantong, Jiangsu 226011, China; 2. Institute of Cardiovascular Sciences & Shanghai Engineering Research Center of Organ Repair, Shanghai University, Shanghai 200444, China)

**[ABSTRACT]** **Aim** To explore a novel experimental method for detecting cardiomyocyte proliferation at the live cell level, and to exclude false positive cells caused by multinucleate cardiomyocytes, so as to provide experimental reference for accurate detection of cardiomyocytes proliferation. **Methods** Use the cell division cyclin 20 (CDC20) and spastic paraplegia 20 (SPG20) as the molecular beacons' targets. These molecular beacons allow for CDC20 and SPG20 detection in live cells, through Lipo-2000 transfection. The double positive cells are the proliferating ones that undergo cytokinesis. **Results** When the cells did not proliferate, the probes could not detect the target sequences and the cells cannot be detected by the fluorescence. When the nuclei replicated and divided without cytokinesis, the sequences could not be detected by both two probes at the same time, and the cells also could not be detected. When cells underwent mitosis with complete cytokinesis proliferation, both two fluorescence probes could be detected simultaneously. **Conclusion** The molecular beacons-based approach targeting CDC20 and SPG20 identified a proliferative subset of cardiomyocytes, which could exclude false positive problems of cell proliferation caused by nuclear proliferation and improve the accuracy of cell proliferation detection.

**[KEY WORDS]** cardiomyocytes; cell proliferation; probe; live cell detection; cytokinesis

[收稿日期] 2021-11-24

[修回日期] 2022-05-02

[基金项目] 国家重点研发计划政府间国际科技创新合作重点专项(2018YFE0113500); 上海市科学技术委员会上海器官修复工程技术研究中心(20DZ2255400); 国家自然科学基金重点国际(地区)合作研究项目(82020108002); 国家自然科学基金青年基金项目(81900250)

[作者简介] 王静, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为运动保护心脏的分子机制, E-mail: han\_x\_i\_a\_o@163.com。通信作者肖俊杰, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为运动保护心脏的分子机制, E-mail: junjiexiao@shu.edu.cn。

冠状动脉粥样硬化或急性冠状动脉栓塞等疾病,往往会诱发急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI),导致心肌发生缺血、损伤和坏死<sup>[1]</sup>。随着急诊经皮冠状动脉介入治疗(percutaneous coronary intervention, PCI)等技术的应用,AMI 患者的生存率显著提高,但是其后发生心力衰竭的患者人数急剧增加<sup>[2]</sup>。心肌梗死后的缺血相关心肌病的特征是心肌细胞丢失和心肌再生失败<sup>[3]</sup>。研究表明,出生后的人类心脏保留了微弱的增殖潜力,然而这种增殖的潜在在大部分成人发生 AMI 损伤时仍然不足以恢复这种心肌细胞的丢失,因此有效促进心肌细胞的增殖与新生对于实现心脏修复至关重要<sup>[4-6]</sup>。基于此,验证心肌细胞增殖,对于探究促进心肌细胞增殖相关防治策略具有重要意义。

研究表明,大多数出生后的人类以及啮齿类动物模型中的心肌细胞在没有胞质分裂的情况下经历多次基因(deoxyribonucleic acid, DNA)复制<sup>[7-8]</sup>。随着心脏的成熟,心肌细胞内源性的增殖能力减弱,非生产性的细胞周期活动导致双核和多倍体细胞形成<sup>[9-10]</sup>。尽管这些研究证实了心肌细胞具有足够的 DNA 复制能力,但多核以及多倍体的心肌细胞也为准确检测心肌细胞增殖带来了挑战。以往检测细胞增殖的实验方法如 5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷(5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU)增殖检测、细胞增殖相关抗原(antigen Ki-67, Ki67)、磷酸化组蛋白 H3(PHH3)等都是基于细胞增殖时发生核内 DNA 复制或者有丝分裂过程,对于存在双核和多倍体形式的心肌细胞,往往会产生增殖假阳性的问题<sup>[11-12]</sup>。因此,需要新的鉴定心肌细胞增殖的策略以排除检测过程中双核以及多核的干扰。在本研究中,将以大鼠心肌细胞作为研究对象,以细胞内细胞分裂周期蛋白 20(cell division cycle 20, CDC20)和痉挛性截瘫蛋白 20(spastic paraplegia 20, SPG20)作为探针靶点<sup>[13-14]</sup>,构建分子探针,在活细胞水平评估心肌细胞增殖,使细胞增殖的检测精度更高。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物及细胞

实验中所使用的心肌细胞分离自新生 Sprague Dawley(SD)大鼠乳鼠或胚胎期 16.5 天的胚胎大鼠心肌细胞。8 周育龄的 SD 大鼠购自于维通利华公司,大鼠饲养于上海大学 SPF 级动物房,大鼠在动

物房适应 1 周后进行配种。本研究所进行的动物实验获得生命学院伦理委员会批准。实验中使用的 293T 细胞系购自于中科院上海细胞库,细胞培养于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内。

### 1.2 实验试剂

脂质体转染试剂 2000(Lipofectamine™ 2000 transfection, Lipo-2000)购自于 Thermo Fisher Scientific 公司(#11668027);心肌细胞特异性抗体肌肉瘤 α 肌动蛋白单克隆抗体(α-actinin)购自于 Thermo Fisher Scientific 公司(#MA1-22863);Cy3 荧光标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)抗体购自于 Jackson ImmunoResearch(#715-165-151);细胞核染料 Hoechst33342 购自于碧云天公司(#C1022);Ki67 重组抗体[SP6]购自于 Abcam 公司(#ab16667);Alexa Fluor 488 荧光标记山羊抗兔 IgG(H+L)抗体购自于 Jackson ImmunoResearch(#111-545-003)。

### 1.3 乳鼠以及胎鼠心肌细胞分离

选取 0~3 天的新生大鼠或胚胎期 16.5 天的胎鼠,无菌操作取心脏,剪碎后使用 ADS 缓冲液重悬,放于 37 °C 摇床,140 r/min,震荡消化,收集消化后细胞悬液,加入适量胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)终止消化;离心获得细胞沉淀并用心脏成纤维细胞完全培养基重悬。重复上述消化过程数次,直至组织全部都消化完成。将细胞悬液通过 100 μm 滤网滤入培养皿,并置于细胞培养箱内贴壁 70 min 后移走上清。将未贴壁的上清收集到离心管中,用密度梯度离心的方法(Percoll)获得新生小鼠心肌细胞,对细胞计数后铺板,待细胞铺展后即可进行实验。

### 1.4 探针制备

分子探针为单链核苷酸片段,形成茎环结构后,3'端的掩蔽基团将探针上 5'标记的荧光蛋白封闭。当探针随载体进入到细胞后,结合到检测的信使 RNA(message RNA, mRNA)序列后,茎环结构打开,此时探针上的荧光蛋白解除封闭效应,发出荧光,指示所探测的蛋白的转录。本研究中采用全新的双探针检测技术,特异性检测心肌细胞增殖以及有丝分裂发生后特异性表达 CDC20 以及 SPG20 的蛋白,以此定义心肌细胞的胞质分裂发生,即心肌细胞增殖。探针由生工生物工程公司合成,分别在 CDC20 以及 SPG20 探针的 3'端加上黑洞淬灭基团 2(black hole quencher-2, BHQ2)和黑洞淬灭基团 1(black hole quencher-1, BHQ1)<sup>[14]</sup>(表 1)。

表 1. 探针序列信息

Table 1. The information of molecular beacons

探针	5'荧光基团	3'淬灭基团	探针序列(5'→3')	靶点序列(5'→3')
CDC20	Cy3	BHQ2	<u>CCTGGGTAATAGTCATTTCCGGATCCAGG</u>	ATCCGAAATGACTATTAC
SPG20	Alexa Fluor 488	BHQ1	<u>CAGAGCTTTCTTCTTTGCTCCCTCTG</u>	GGAGGCAAAGAAGAAAG
Cy3 阳性	Cy3		<u>CGCGACGACAAGCGCACCCGATATCGCG</u>	
Cy3 阴性对照			<u>CGCGACGACAAGCGCACCCGATATCGCG</u>	

注:探针序列下划线标注部分表示 5'与 3'互补区;空白处表示不适用。

### 1.5 双荧光探针活细胞检测系统搭建

SPG20 以及 CDC20 荧光探针溶解至 10 μmol/L, 以杜氏培养基 (dulbecco's modified eagle medium, DMEM) 作为反应介质, 分别将 SPG20 以及 CDC20 探针以 1:5 的体积比与 Lipo-2000 载体混合 20 min (37 °C, 50 r/min)。以 400 μL 反应体积为例: 200 μL DMEM 培养基中分别加入 1 μL SPG20 以及 1 μL CDC20 荧光探针, 室温静置 5 min; 在另一组 200 μL DMEM 培养基中加入 5 μL Lipo-2000, 室温静置 5 min。5 min 后将两组 DMEM 预混液进行混合, 于 37 °C 融合反应 20 min。混合结束后将探针混合液加入培养的细胞中进行转染 (每 5×10<sup>5</sup> 细胞加入 100 μL 混合液), 转染 1.5 h 后对细胞进行成像, 验证细胞的增殖。

### 1.6 细胞增殖染色鉴定

探针转染细胞结束后, 将细胞培养板取出, 使用荧光显微镜观察活细胞状态下同时表达 Cy3 以及 Alexa Fluor 488 荧光的细胞, 即为发生胞质分裂的增殖细胞。

验证心肌细胞时, 需要对细胞进行 α-actinin 染色。将探针转染的细胞取出, 进行 4% 多聚甲醛固定, 固定后用 5% Triton X-100 对细胞进行穿孔。依次对细胞进行抗 α-actinin 一抗以及 Cy5 荧光标记山羊抗小鼠 IgG (H+L) 二抗染色。染色结束后使用 Hoechst33342 对核进行荧光标记。

依次对细胞进行固定和穿孔, 然后使用抗 Ki67 一抗以及 Alexa Fluor 488 荧光标记山羊抗兔 IgG (H+L) 二抗对细胞进行 Ki67 染色, 最后对核进行荧光标记。

### 1.7 统计学分析

数据采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析, 柱状图采用 GraphPad Prism 8 绘制。实验采用单一变量, 组间比较采用 *t* 检验, 数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,  $P < 0.05$  被认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 转染体系的建立

本研究中, 使用 293T 细胞验证载体与探针的最适转染比例。以 DMEM 培养基作为反应介质, 分别将 Lipo-2000 载体以 20:1、10:1、5:1、2:1 的体积比与 Cy3 荧光标记的阳性探针混合 20 min, 然后将其加入到 293T 细胞中进行转染。1.5 h 后使用荧光显微镜观察转染后 293T 细胞中 Cy3 荧光的阳性率, 以此评估最适的转染浓度 (图 1A)。统计学分析表明, 在 Lipo-2000 载体与 Cy3 探针体积比为 5:1 以及 2:1 时, 细胞表达的 Cy3 荧光值基本一致, 即转染已经达到峰值。这一结果说明, 以 5:1 的比例进行载体和探针的混合即可达到最佳的转染效果 (图 1B)。因此, 在之后的实验中将采用这一比例进行探针转染系统的组装。

### 2.2 双荧光探针与 Ki67 检测细胞增殖的比较

为了进一步明确双荧光探针检测的增殖细胞的精准度, 本研究分别使用双荧光探针以及 Ki67 的方法检测 293T 细胞的增殖。293T 细胞传代后进行培养, 待细胞生长至增殖期后, 分别对细胞进行双荧光探针增殖检测以及 Ki67 增殖染色。在双荧光探针染色中, 单一探针阳性的细胞为没有进行胞质分裂或已经完成胞质分裂的增殖细胞, 只有当 SPG20 以及 CDC20 探针双阳性时, 细胞即为发生胞质分裂的增殖细胞 (图 2A)。接着使用 Ki67 对同样培养条件下的 293T 细胞进行增殖染色 (图 2B), 统计 Ki67 染色阳性的增殖细胞占总细胞的比例。在对两种细胞增殖方法的比较中发现, 双荧光探针染色的方式较传统的鉴定方法统计出的增殖率偏低, 一定程度上反应了双荧光探针在细胞增殖鉴定过程中的精准性 (图 2C)。

### 2.3 双荧光探针检测心肌细胞增殖

使用双荧光探针方法, 分别在胚胎期 16.5 天的大鼠心肌细胞以及新生大鼠心肌细胞中对增殖细胞进行检测。结果表明, 在胚胎大鼠心肌细胞中能

够检测到较多双阳性荧光的细胞即胞质分裂期的增殖细胞(图 3A)。在新生大鼠心肌细胞中同样检测到双阳性表达的心肌细胞,表明新生大鼠心肌细胞同样具有胞质分裂的增殖能力(图 3B)。在这部

分实验中,通过心肌细胞特异性标记物  $\alpha$ -actinin 指征细胞为心肌细胞,并且成像结果表明,增殖检测探针在心肌细胞胞质以及核内均检测出 CDC20 以及 SPG20 的 mRNA 序列的表达。

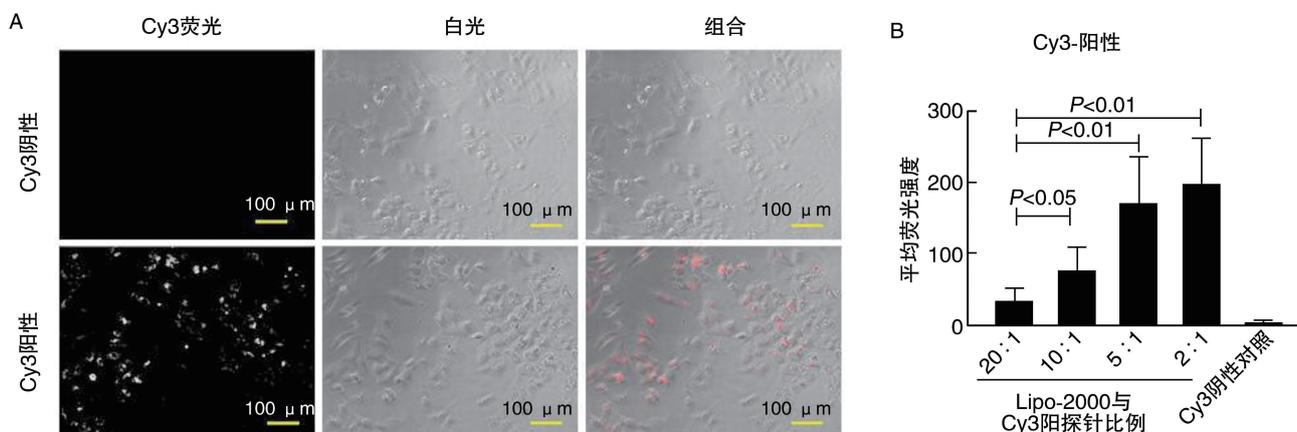


图 1. 转染体系搭建

A 为荧光显微镜检测 293T 细胞转染 Cy3 阳性以及阴性对照探针后细胞内 Cy3 表达;B 为统计学结果显示采用不同 Lipo-2000 与探针的比例,细胞内探针的导入效率(通过 Cy3 荧光值评估转入效率)。

Figure 1. Transfection system construction

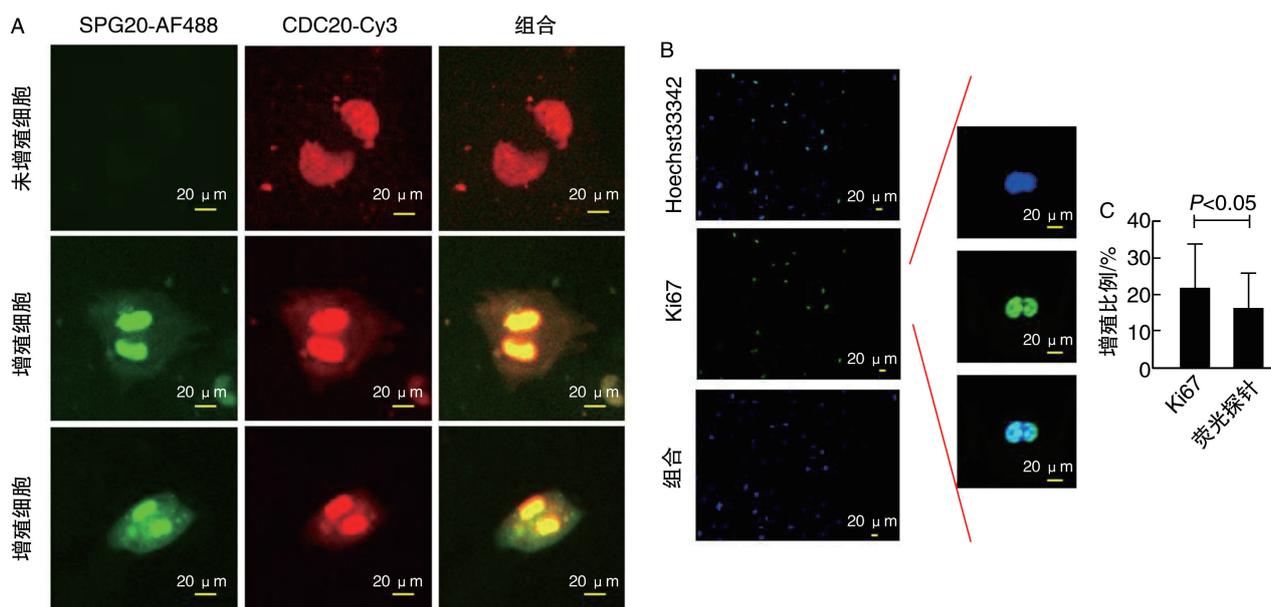


图 2. 双荧光探针与 Ki67 增殖检测方法的比较

A 为 SPG20 以及 CDC20 探针检测 293T 细胞增殖展示图,双阳性细胞表示增殖细胞;B 为 Ki67 染色鉴定细胞增殖展示图;C 为两种检测细胞增殖方式所统计的细胞增殖率比较。

Figure 2. Comparison of two-colour molecular beacons and Ki67

### 3 讨论

随着医疗水平的不断提升,由冠状动脉粥样硬化或急性冠状动脉栓塞引起的急性心肌梗死的预

后有所改善,但即使在及时有效的再灌注成功的情况下,心肌细胞仍会丢失。而这种心肌细胞的丢失往往导致不良的左心室重构、缺血性心肌病,甚至引起心力衰竭、心律失常和死亡<sup>[15]</sup>。然而,目前的

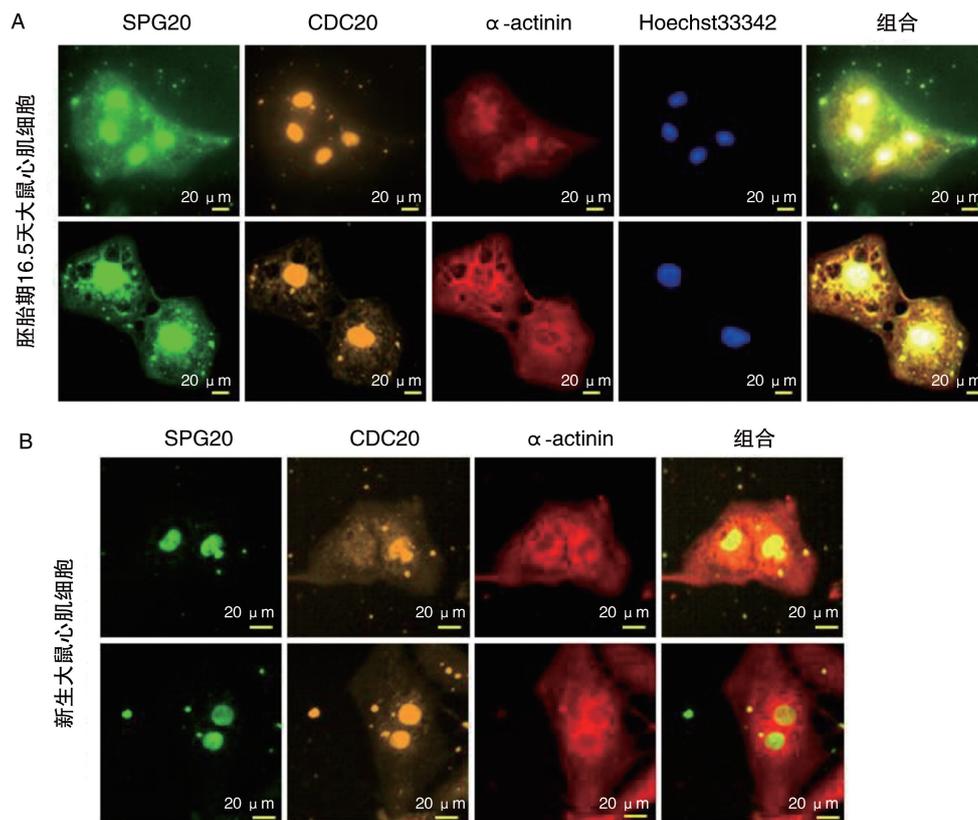


图 3. 探针法检测心肌细胞增殖

A 为 SPG20 以及 CDC20 探针检测胚胎期 16.5 天大鼠心肌细胞增殖, 双阳性细胞表示增殖细胞; B 为 SPG20 以及 CDC20 探针检测新生大鼠心肌细胞增殖, 双阳性细胞表示增殖细胞。绿色表示 SPG20 探针阳性; 橙色表示 CDC20 探针阳性; 红色表示心肌细胞特异性  $\alpha$ -actinin 阳性; 蓝色显示的为细胞核。

Figure 3. Cardiomyocyte proliferation test through molecular beacons

临床治疗手段只能减缓心力衰竭的发病进程, 并没有可靠的治疗策略可以逆转心肌细胞的丢失。因此, 寻找有效的改善心肌细胞丢失、促进心肌细胞增殖的治疗策略具有重要意义<sup>[16]</sup>。然而由于心肌细胞在生长过程中存在多倍体的内复制现象, 对于心肌细胞增殖的鉴定存在较大的挑战<sup>[9-10]</sup>。传统的细胞增殖的检测方式如 Ki67、PHH3 或极光激酶 B (aurora B) 等都是基于细胞处于活跃期并发生核复制过程, 因此对于检测细胞的时间点要求较高, 同时会产生较多因为多核细胞核复制而引起的假阳性问题<sup>[17]</sup>。另一种检测细胞增殖的方式以胞质分裂中期特异性的标志物为靶点, 采用统计荧光值总和的方式, 在 S 期使用抗体或染料测定胸腺嘧啶类似物 [5'-溴脱氧尿嘧啶核苷 (5-bromo-2'-deoxyuridine, BrdU) 或 EdU] 与 DNA 的结合, 识别细胞周期, 鉴定增殖。然而这种方式仍不能区分开细胞的胞质分裂与多倍体的内复制<sup>[18]</sup>。

在细胞发生分裂后期, 需要 CDC20 启动转录翻译, 促使染色单体分离, 导致分离酶抑制蛋白 (se-

curin) 和 Cyclin B 的降解并最终发生有丝分裂。同样, SPG20 基因编码 Spartin 蛋白, 该蛋白与运输 (ESCRT) 机制、细胞分裂和完成细胞分裂时的中体脱落所需的内体分选复合物相关<sup>[13]</sup>。基于此, 我们设计双探针检测技术, 特异性检测细胞内 CDC20 以及 SPG20 的 mRNA 水平, 以此定义心肌细胞的胞质分裂发生, 即心肌细胞增殖。前期的实验结果表明, 当细胞以多倍体形式存在时, CDC20 以及 SPG20 的分子探针均未能检测到其表达; 当细胞仅出现核分裂时, 双分子探针仅检测到 SPG20 的表达; 只有细胞同时出现核分离以及胞质分裂时, 双分子探针才同时检测到 CDC20 以及 SPG20 的表达。因此, 使用这一双探针技术, 我们能够在活细胞水平实时动态检测细胞的增殖<sup>[14]</sup>。

本实验通过采用全新的双探针检测技术, 特异性检测心肌细胞增殖以及有丝分裂发生后期特异性表达的 CDC20 以及 SPG20 蛋白, 成功在胚胎期 16.5 天的大鼠心肌细胞以及新生大鼠的心肌细胞中观测到了增殖的心肌细胞。同时与传统的 Ki67

增殖检测比较时发现,双荧光探针的检测方法检测到的增殖细胞较 Ki67 方法低,进一步反应了探针法检测增殖的精准性。因此,使用双荧光探针方法,能够准确检测发生胞质分裂的增殖的心肌细胞,从而排除因核复制产生的细胞增殖假阳性问题,使细胞增殖的检测精准度更高。为验证促进心肌细胞增殖的相关药物研发提供了一种很好的检测手段,这对于心肌细胞丢失引起的相关疾病的防治策略的提出具有重要意义。

#### [参考文献]

- [1] AMBROSE J A, SINGH M. Pathophysiology of coronary artery disease leading to acute coronary syndromes [J]. F1000Prime Rep, 2015, 7: 8.
- [2] NABEL E G, BRAUNWALD E. A tale of coronary artery disease and myocardial infarction [J]. N Engl J Med, 2012, 366(1): 54-63.
- [3] ANDERSON J L, MORROW D A. Acute myocardial infarction[J]. N Engl J Med, 2017, 376(21): 2053-2064.
- [4] CÜNTHEL M, BARNETT P, CHRISTOFFELS V M. Development, proliferation, and growth of the mammalian heart[J]. Mol Ther, 2018, 26(7): 1599-1609.
- [5] ZHU F, MENG Q, YU Y, et al. Adult cardiomyocyte proliferation: a new insight for myocardial infarction therapy [J]. J Cardiovasc Transl Res, 2021, 14(3): 457-466.
- [6] 于晓朴, 边云飞, 庞有成, 等. 外泌体 miRNA 在缺血性心脏病中的作用机制及靶向治疗前景[J]. 中国动脉硬化杂志, 2021, 29(2): 171-178.  
YU X P, BIAN Y F, PANG Y C, et al. The mechanism of exosome miRNA in ischemic heart disease and the prospect of targeted therapy [J]. Chin J Arterioscler, 2021, 29(2): 171-178.
- [7] LÁZÁR E, SADEK H, BERGMANN O. Cardiomyocyte renewal in the human heart: insights from the fall-out[J]. Eur Heart J, 2017, 38(30): 2333-2342.
- [8] SENYO S E, STEINHAUSER M L, PIZZIMENTI C L, et al. Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes [J]. Nature, 2013, 493(7432): 433-U186.
- [9] GAN P, PATTERSON M, SUCOV H M. Cardiomyocyte ploidy and implications for heart regeneration [J]. Annu Rev Physiol, 2020, 82: 45-61.
- [10] DERKS W, BERGMANN O. Polyploidy in cardiomyocytes: roadblock to heart regeneration? [J]. Circ Res, 2020, 126(4): 552-565.
- [11] MITCHISON T J, SALMON E D. Mitosis: a history of division[J]. Nat Cell Biol, 2001, 3(1): E17-E21.
- [12] ELMACI I, ALTINOZ M A, BOLUKBASI F H, et al. Paradoxical results obtained with Ki67-labeling and PHH3-mitosis index in glial tumors: a literature analysis[J]. Clin Neuropathol, 2017, 36(6): 272-282.
- [13] KAPANIDOU M, CURTIS N L, BOLANOS-GARCIA V M. CDC20: at the crossroads between chromosome segregation and mitotic exit[J]. Trends Biochem Sci, 2017, 42(3): 193-205.
- [14] MILLIRON H Y, WEILAND M J, KORT E J, et al. Isolation of cardiomyocytes undergoing mitosis with complete cytokinesis[J]. Circ Res, 2019, 125(12): 1070-1086.
- [15] REED G W, ROSSI J E, CANNON C P. Acute myocardial infarction[J]. Lancet, 2017, 389(10055): 197-210.
- [16] 朴明慧, 曲文博, 刘冰, 等. 纳米载药在心肌梗死及其并发症防治中的应用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2021, 29(11): 989-994.  
PIAO M H, QU W B, LIU B, et al. Application of nano-drug delivery for treatment of myocardial infarction and its complications[J]. Chin J Arterioscler, 2021, 29(11): 989-994.
- [17] TOBIAS O, SICINSKI P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy[J]. Nat Rev Cancer, 2017, 17(2): 93-115.
- [18] HARRIS L, ZALUCKI O, PIPER M. BrdU/EdU dual labeling to determine the cell-cycle dynamics of defined cellular subpopulations [J]. J Mol Histol, 2018, 49(3): 229-234.

(此文编辑 许雪梅)