

DOI:10.13350/j.cjpb.220911

• 论著 •

# EdU 标记多房棘球蚴成体干细胞方法的建立\*

曹珊菱<sup>1</sup>, 郭小腊<sup>2\*\*</sup>, 郑亚东<sup>3</sup>, 孙晓林<sup>1\*\*</sup>

(1. 甘肃农业大学动物医学院, 甘肃兰州 730070; 2. 中国农业科学院兰州兽医研究所家畜疫病病原生物学国家重点实验室  
甘肃省动物寄生虫病重点实验室; 3. 浙江农林大学动物科技学院动物医学院)

**【摘要】** 目的 建立 EdU(5-ethynyl-2-deoxyuridine) 标记多房棘球蚴体内成体干细胞(neoblasts)的方法, 用于观察其细胞形态和分布特点。方法 采用 0.25% 胰蛋白酶消化法从多房棘球蚴包囊中分离原代细胞, 分别对原代细胞和多房棘球蚴进行 EdU 染色, 利用激光共聚焦显微镜检测 EdU 阳性细胞。结果 用建立的 EdU 标记方法检查多房棘球蚴体内成体干细胞, EdU 阳性细胞体积较小, 细胞核较大, 呈球形或近球形。在成熟的原头节头节中, EdU 阳性细胞主要分布在其中后端, 呈分散分布, 且原头节头节是否外翻在 EdU 阳性细胞数量上无明显不同。同时, 大多数 EdU 阳性细胞也表达磷酸化组蛋白 H3。结论 建立的 EdU 标记多房棘球蚴成体干细胞的方法可靠, 简单, 易操作, 为该细胞的功能研究提供了新的技术手段。

**【关键词】** 多房棘球蚴; 原头节; 原代细胞; 成体干细胞; EdU

**【中图分类号】** R383.3

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2022)09-1045-03

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Sep.; 17(9): 1045-1047, 1052.]

## EdU labeling method for population of neoblasts in *Echinococcus multilocularis*

CAO Shan-ling<sup>1</sup>, GUO Xiao-la<sup>2</sup>, ZHENG Ya-dong<sup>3</sup>, SUN Xiao-lin<sup>1</sup> (1. College of Veterinary medicine, Gansu Agriculture University, Lanzhou 730070, China; 2. State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China; 3. College of Animal Science and Technology, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Hangzhou 311302 China)

**【Abstract】** **Objective** To establish a method of EdU-labeled neoblasts for detecting the distribution and characteristic morphology in *Echinococcus multilocularis*. **Methods** Primary cells were isolated from the metacestodes of *E. multilocularis* by using 0.25% trypsin digestion. EdU was added to the culture medium of primary cells and protoscoleces, respectively. EdU positive cells were detected by laser confocal scanning microscope. **Results** EdU positive cells have been characterized as small, round or oval cells with a large and prominent nucleolus. In mature protoscoleces, EdU positive cells were mainly distributed in back-end of the mature protoscoleces in a dispersed manner. The number of EdU positive cells was no significant difference in whether the scoleces were evaginated or not. Most EdU positive cells were also found to express phosphorylated histone H3. **Conclusion** The established method of EdU-labeled neoblasts in *E. multilocularis* is simple, reliable and easy to operate, providing a technical means for further study the function of these cells.

**【Key words】** *Echinococcus multilocularis*; protoscolex; primary cell; neoblasts; EdU

\*\* 棘球蚴病(echinococcosis)又称包虫病,是一种古老的人兽共患寄生虫病。直至今日,该病依然是全球范围内一个严重的公共卫生问题<sup>[1]</sup>。棘球蚴病主要包括细粒棘球蚴病和多房棘球蚴病。人常因误食被多房棘球蚴虫(*Echinococcus multilocularis*)虫卵污染的水和食物引起多房棘球蚴病(alveolar echinococcosis, AE),也称泡球蚴病。该病病程长且不易察觉,难以根治,又称之为“虫癌”<sup>[2-3]</sup>。AE 主要分布在北半球较为寒冷的国家或地区,我国主要流行于青海、甘肃和新疆等西北牧区<sup>[4-5]</sup>。虽然在棘球蚴病诊断、治疗和防治等方面已经开展了大量研究,但是迄今为止对棘球蚴病的防治仍困难重重,主要原因是对该病的发病机制仍不清楚。

干细胞研究是生物及医学研究领域研究的重点和热点之一,涡虫因其强大的再生能力、分布广、取材方便等特点已经成为研究发育和再生的动物模型<sup>[6]</sup>。涡虫之所以具有惊人的再生能力与一群被称为 neoblasts 的成体多潜能干细胞群有关<sup>[7]</sup>。Neoblasts 是涡虫体内唯一有自我更新和分化功能的细胞<sup>[8]</sup>。研究

\* **【基金项目】** 国家自然科学基金-地区科学基金项目(No. 32160843);国家自然科学基金-青年科学基金项目(No. 31702224)。

\*\* **【通讯作者】** 孙晓林, E-mail: sunxl@gsau.edu.cn  
郭小腊, E-mail: guoxiaola@caas.cn

**【作者简介】** 曹珊菱(1996-),女,硕士研究生,主要从事预防兽医学研究。E-mail: 13993139329@163.com

发现,多房棘球绦虫也同样存在类似于“neoblasts”多能干细胞以及相似的细胞更新机制,这类干细胞曾被称为“生发细胞”(germinative cells)<sup>[9]</sup>。生发细胞是其体内唯一可以增殖的细胞,在原头节时期,生发细胞增殖异常旺盛<sup>[10]</sup>。多房棘球绦新包囊的产生、发展、扩散和转移,以及原头节的发生、生长和发育,都以生发细胞的自我更新能力和全能性为基础<sup>[10]</sup>。因此,对其细胞周期及调控机制的研究,对于预防和治愈有“虫癌”之称的泡球虫病具有至关重要的意义。

EdU 是胸腺嘧啶核苷的类似物,能够在细胞分裂时代替胸腺嘧啶(T)渗入正在复制的 DNA 分子中,可以标记分裂期的细胞<sup>[11]</sup>。EdU 检测方法具有快速、灵敏、准确的优点,而且 EdU 染料在细胞内很容易扩散。本实验基于 EdU 和 Alexa Flour 荧光染料的特异性反应快速检测 EdU 阳性细胞,建立可靠的 EdU 标记多房棘球绦 neoblasts 的方法,为多房棘球绦体干细胞的功能研究提供新的分子标记技术。

## 材料与方 法

### 1 材 料

**1.1 多房棘球绦** 在无菌条件下,收取人工感染多房棘球绦的长爪沙鼠[购于浙江省医学科学院动物生产许可证号:SCXK(浙)2019-0002]腹腔中的包囊,剪碎后置于铜网上研磨。将研磨出的原头节在预冷的 PBS 中自然沉降 5~10 次,每次 10 min。将分离的多房棘球绦(每孔约 200 个)培养于高葡萄糖 DMEM 培养基中,培养液含有 20% 胎牛血清、青霉素(100 U/mL)和链霉素(0.1 mg/mL)。

**1.2 主要试剂和仪器** Click-iT™ EdU 成像试剂盒(C10337, Invitrogen)和 Hoechse33242 荧光染料(R37605, Invitrogen)购自 ;磷酸化组蛋白 H3(9713T, Cell Signaling)购自上海优宁维生物科技股份有限公司。激光共聚焦显微镜由德国 Leica 公司生产。

### 2 方 法

**2.1 原代细胞的分离与培养** 将多房棘球绦包囊剪碎,置于 4 mL 含 0.25% 胰酶的无钙镁 HBSS 平衡盐溶液中 37 °C 消化 40 min,然后加入 11 mL 含 1% BSA 的 PBS,500 g 离心 5 min。弃上清,用含 20% 胎牛血清高葡萄糖 DMEM 培养基重悬细胞,置 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养。

**2.2 EdU 标记和检测** 每孔加入 1 mL 含有 10 μmol/L EdU 的培养基孵育 24 h。用 PBS 清洗细胞或多房棘球绦 3 次,每次 10 min;加入 500 μL 4% 多聚甲醛固定 2 h;加入 1 mL 含有 1% Triton X-100 的 PBS 通透 30 min,用 PBS 清洗;每孔加入 500 μL 1 ×

Click-iT? EdU 反应混合物,室温避光孵育 30 min。500 μL 反应混合物包括 430 μL Click 反应缓冲液,20 μL CuSO<sub>4</sub>,50 μL EdU 缓冲液添加物,1.2 μL Alexa Flour 488 Azide。弃去染色反应液,用 1 mL 含 1% BSA 的 PBS 洗涤 2 次,每次 5 min。

**2.3 Hoechse33242 染色** 每孔加入 500 μL 稀释的 Hoechse33242 溶液(1 : 2000),室温避光孵育 30 min;弃染色反应液,用 1 mL 含 1% BSA 的 PBS 洗涤 2 次,每次 5 min。

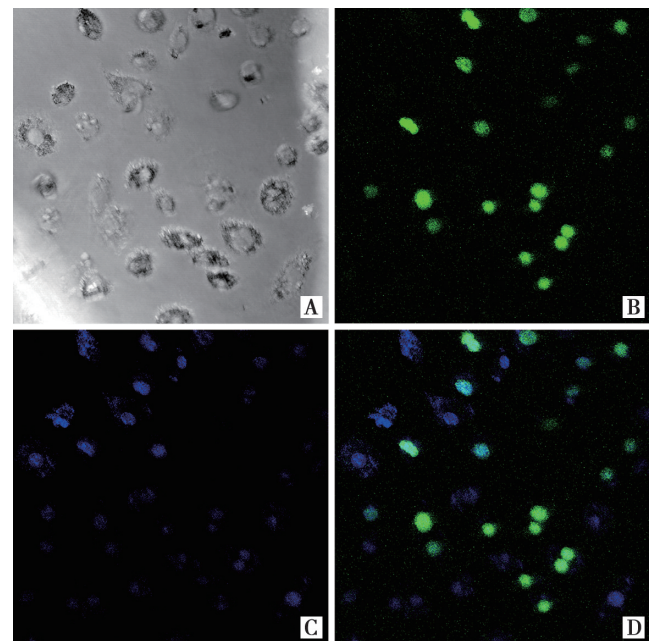
**2.4 免疫荧光定位** 滴加用 PBS 稀释的 H3P 抗体(1 : 200),37 °C 孵育 1 h 后 4 °C 过夜。第 2 d 用 PBS 漂洗 3 次;滴加 1 : 1 000 稀释的 Alexa Flour594 标记的山羊抗兔 IgG,室温避光孵育 60 min;弃染色反应液,用 1 mL 含 1% BSA 的 PBS 洗涤 2 次,每次 5 min。

**2.5 激光共聚焦扫描显微镜观察拍照** 选用波长 488 nm 和 594 nm 的激光激发扫描拍照,并用图像分析软件对照片进行数据分析。

## 结 果

### 1 neoblasts 形态观察和 EdU 标记

激光共聚焦扫描显微镜观察多房棘球绦原代细胞中 EdU 阳性细胞体积较小,细胞核相对较大,呈球形或近球形(图 1)(未叙述其他染色情况)。



Light 光镜观察 EdU EdU 标记的阳性细胞 DAPI 细胞核荧光染料染色 Merge 合并

图 1 Neoblasts 细胞形态观察及 EdU 标记

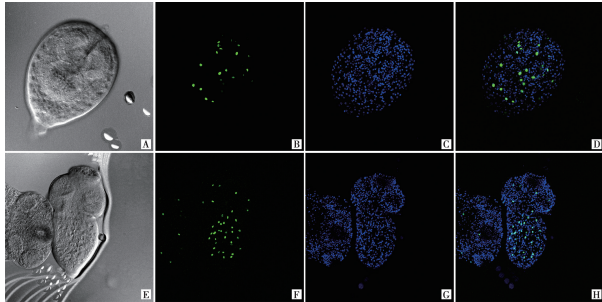
Light imaging EdU EdU positive cells DAPI Nuclear fluorescent dye Merge merge

Fig. 1 Characteristic morphology and EdU-labeled neoblasts

### 2 棘球绦体中 neoblasts 分布

为了进一步确定 neoblasts 的分布和 EdU 的标记

效果,对原头节体内 EdU 阳性信号进行采集。结果表明,在原头节头节内翻的情况下,EdU 阳性细胞主要分布在原头节的中间部分,且呈分散分布。在原头节头节外翻时,EdU 阳性细胞主要分布在原头节中后端(图 2)。原头节头节是否外翻在 EdU 阳性细胞数量上无明显不同。



注:上图为原头节头节内翻时 EdU 阳性细胞分布特征;下图为原头节头节外翻时 EdU 阳性细胞分布特征。

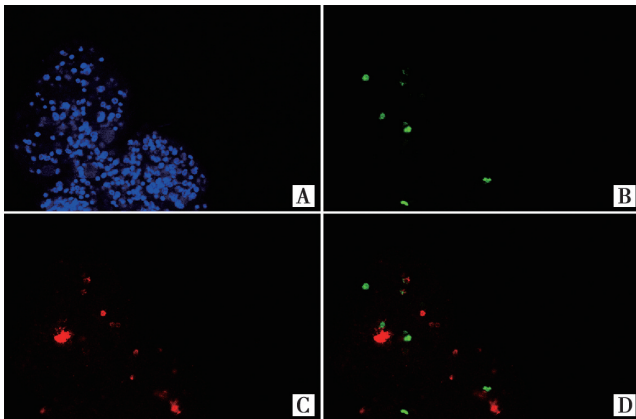
图 2 原头节体中 EdU 标记的 neoblasts 分布图

Notes: Top: Distribution characteristics of EdU positive cells in protoscolex with invaginated scolex; Bottom: Distribution characteristics of EdU positive cells in protoscolex with evaginated scolex.

Fig. 2 Distribution of EdU-labeled neoblasts at protoscoleces

### 3 EdU 与干细胞的标记物 H3P 共定位情况

为了确定 EdU 阳性细胞是否为 neoblasts,利用干细胞的标记物-磷酸化组蛋白 H3(phosphorylated-histone H3, H3P)进行共定位分析,结果如图 3。大多数 EdU 阳性细胞与 H3P 阳性细胞有共定位。因此,用 EdU 标记 neoblasts 切实可靠。



EdU EdU 标记阳性细胞 H3P H3P 标记的干细胞 DAPI  
细胞核荧光染料染色 Merge 合并

图 3 EdU 与干细胞标记物 H3P 共定位

EdU EdU positive cells H3P H3P-labeled cells DAPI nuclear fluorescent dye Merge Merge

Fig. 3 Co-localization of EdU and stem cell marker H3P in neoblasts

## 讨论

全能干细胞是寄生虫蠕虫自我更新和生长发育的基本基础<sup>[10]</sup>。多房棘球蚴体内存在着无限自我更新能力和分化潜能的 neoblasts,它们在组织细

胞更新,生长发育以及再生过程中发挥关键作用<sup>[11]</sup>。neoblasts 是多房棘球蚴成体内唯一具有增殖能力和自我更新能力的体细胞<sup>[12-13]</sup>。此外,体外培养的原头节可不断发育并形成完整的新包囊,将这些包囊腹腔注射感染小鼠后,可在宿主体内形成新的包囊,说明多房棘球蚴的生长发育必须通过 neoblasts 的自我更新才能实现<sup>[14]</sup>。因此,探索多房棘球蚴成体干细胞快速有效的标记方法可为揭示 neoblasts 的增殖与分化机制提供技术支持。

本实验从多房棘球蚴包囊中分离原代细胞,激光共聚焦扫描显微镜观察 EdU 阳性细胞体积较小,细胞核比较大,呈球形或近球形。这与从涡虫中鉴定到的 neoblast 的结果相符<sup>[14]</sup>。对多房棘球蚴体内的 neoblasts 标记结果表明,在原头节头节内翻时,EdU 阳性细胞主要分布在原头节中间部分,而在头节外翻的原头节中,EdU 阳性细胞主要分布在原头节中后端,都呈分散分布。另外,对头节外翻与内翻两种情况的原头节体内 EdU 阳性细胞数目进行比较,EdU 阳性细胞数量无明显变化。研究发现,neoblasts 在原头节阶段增殖异常旺盛,neoblasts 的这种增殖特点是多房棘球蚴能够快速产生新个体并在宿主体内迁移的主要原因之一<sup>[13,15]</sup>。当抑制 neoblasts 增殖或是特异性破坏 neoblasts 时,会导致多房棘球蚴包囊生长的停滞以及原头节发育异常<sup>[16]</sup>。因此,neoblasts 的维持对多房棘球蚴在宿主体内的生长发育至关重要。

组蛋白 H3 的磷酸化高度保守,仅发生于有丝分裂和减数分裂过程的特定时期和特定位点,磷酸化组蛋白 H3 抗体介导的免疫荧光技术因此成为研究干细胞的重要方法之一<sup>[17]</sup>。利用 H3P 标记物进行共定位分析发现,大多数 EdU 阳性细胞与 H3P 阳性细胞有共定位,由此认为用 EdU 标记 neoblasts 切实可行。本实验建立的 EdU 标记多房棘球蚴成体干细胞的方法可靠,简单,易操作,为深入研究这类细胞提供了新的技术手段。

### 【参考文献】

- [1] 温浩,吐尔干艾力·阿吉,邵英梅. 棘球蚴病防治成就及面临的挑战[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2015,33(6):466-471.
- [2] Casulli A, Barth TFE, Tamarozzi F. *Echinococcus multilocularis* [J]. Trends Parasitol, 2019, 35(9):738-739.
- [3] Wen H, Vuitton L, Tuxun T, et al. Echinococcosis: Advances in the 21st Century [J]. Clin Microbiol Reviews, 2019, 32(2): e00075-18.
- [4] Hegglin D, Deplazes P. Control of *Echinococcus multilocularis*: strategies, feasibility and cost-benefit analyses[J]. Int J Parasitol, 2013, 43(5):327-337.
- [5] Giraudoux P, Raoul F, Afonso E, et al. Transmission ecosystems of *Echinococcus multilocularis* in China and Central Asia[J]. Parasitology, 2013, 140(13):1655-1666. (下转 1052 页)



朱耿超等<sup>[10]</sup>对苏州地区儿童呼吸道感染病毒类型研究显示,58.06%为RSV和其他病毒混合感染,冬季发生混合感染率明显高于其他三季,婴儿组发生混合感染比例显著高于其他组。本次研究中,163例混合感染中,28.83%发生于春季,占比最高,10.43%发生于夏季,占比最低。48.47%发生于新生儿组,占比最高,7.98%发生于儿童组,占比最低。李晶等<sup>[11]</sup>关于新乡地区儿童呼吸道感染病原特征分析中,感染多发于春冬季节,<1岁患儿感染病原数最多,以RSV感染为主。本次研究结果与朱耿超等研究结果不同,与李晶等研究一致。在全球范围内,各地区季节性流感的流行菌株有所不同,加之流感菌株的变异,给流感的预防工作带来极大挑战<sup>[12]</sup>。在我国,RSV流行具有特定的季节特点,南方地区的流行季节是夏秋季节,北方地区是冬春季<sup>[13]</sup>。

任康轶等<sup>[14]</sup>研究中,在RSV单一阳性样本中,50.67%为RSV-A阳性,男性比例高于RSV-B。两组患儿月龄、临床表现、住院时间及血常规等实验室数据的比较差异均无统计学意义。本次研究中,52.88%患儿为RSV-A阳性,47.12%患儿为RSV-B阳性,男性占比两组对比差异具有统计学意义,两组的年龄分组情况、发病时间、住院时间、临床症状对比差异没有统计学意义。两者研究结果一致。有研究显示<sup>[14]</sup>,男性是导致RSV重症感染的危险因素之一,可能与男性儿童气道树相对狭窄或性激素影响有关,但具体致病机制尚不明确。

【参考文献】

[1] LI YL, Yang L, Ling YH, et al. The spectrum of viral pathogens in children with severe acute lower respiratory tract infection; A 3

- year prospective study in the pediatric intensive care unit[J]. J Med Virol, 2019, 91(6): 25-27.  
[2] Legand A, Briand S, Shindo N, et al. Addressing the public health burden of respiratory viruses; the battle against respiratory viruses(BRaVe)initiative[J]. Future Virol, 2013, 8(10): 953-968.  
[3] de Benedictis FM, Bush A. Recurrent lower respiratory tract infections in children[J]. BMJ, 2018, 362(1): 2698.  
[4] Ralston SL, Lieberthal AS, Meissner HC, et al. Clinical practice guideline: the diagnosis, management, and prevention of bronchiolitis[J]. Pediatrics, 2014, 134(5): 1474-1502.  
[5] Arthur JL. A novel bocavirus associated with acute gastroenteritis in Australian children[J]. PLoS Pathog, 2009, 5(4): 391.  
[6] 卢庆彬. 儿童急性呼吸道感染病毒流行特征与基因特征研究[D]. 山东大学, 2013.  
[7] 张静. 儿童呼吸道感染病毒病原学及分子流行病学研究[D]. 兰州大学, 2011.  
[8] Turunen R, Koistinen A, Vuorinen T, et al. The first wheezing episode: respiratory virus etiology, atopic characteristics, and illness severity[J]. Pediatr Allergy Immunol, 2014, 25(8): 796-803.  
[9] Jonnalagadda S, Rodriguez O, Estrella B, et al. Etiology of severe pneumonia in ecuadorian children[J]. PLoS One, 2017, 12(2): 1371.  
[10] 朱耿超, 李淑湘, 杨辰. 2011-2015年苏州地区儿童呼吸道感染病毒检出情况分析[J]. 检验医学, 2017, 32(9): 779-783.  
[11] 李晶, 任一帅, 郭喜霞, 等. 2015-2018年新乡地区儿童呼吸道感染病原特征分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2019, 14(6): 700-704.  
[12] 王颖硕. 儿童呼吸道病毒感染的流行病学特点[J]. 中国实用儿科杂志, 2019, 34(2): 100-104.  
[13] 《中华儿科杂志》编辑委员会, 中华医学会儿科学分会呼吸学组. 毛细支气管炎诊断、治疗与预防专家共识(2014年版)[J]. 中华儿科杂志, 2015, 53(3): 168-171.  
[14] 任康轶, 任洛, 邓昱. 2013~2018年重庆地区2066例急性下呼吸道感染住院患儿呼吸道合胞病毒流行特征分析[J]. 中国当代儿科杂志, 23(1): 67-73.  
[15] Tse SM, Coull BA, Sordillo JE, et al. Gender- and age-specific risk factors for wheeze from birth through adolescence[J]. Pediatr Pulmonol, 2015, 50(10): 955-962.

【收稿日期】 2022-04-29 【修回日期】 2022-07-15

(上接 1047 页)

[6] Wang Q, Zhong B, Yu W, et al. Assessment of a 10-year dog deworming programme on the transmission of *Echinococcus multilocularis* in Tibetan communities in Sichuan Province, China[J]. Int J Parasitol, 2021, 51(2-3): 159-166.  
[7] Reddien PW. The cellular and molecular basis for planarian regeneration[J]. Cell, 2018, 175(2): 327-345.  
[8] Alessandra S, Rossi L. Planarian stem cell heterogeneity[J]. Adv Exp Med Biol, 2019(1123): 39-54.  
[9] Reuter M, Kreshchenko N. Flatworm asexual multiplication implicates stem cells and regeneration[J]. Can J Zool, 2004(82): 334-356.  
[10] Brehm K. *Echinococcus multilocularis* as an experimental model in stem cell research and molecular host-parasite interaction[J]. Parasitology, 2010, 137(3): 537-555.  
[11] Ning H, Albersen M, Lin G, et al. Effects of EdU labeling on mesenchymal stem cells[J]. Cytotherapy, 2013, 15(1): 57-63.  
[12] Koziol U, Brehm K. Recent advances in *Echinococcus* genomics and stem cell research[J]. Vet Parasitol, 2015, 213(3-4): 92-102.

[13] Spiliotis M, Lechner S, Tappe D, et al. Transient transfection of *Echinococcus multilocularis* primary cells and complete in vitro regeneration of metacystode vesicles[J]. Int J Parasitol, 2008(38): 1025-1039.  
[14] Sanchez-Alvarado A, Kang H. Multicellularity, stem cells, and the neoblast of the planarian *Schmidtea mediterranea* [J]. Exp Cell Res, 2005, 306(2): 299-308.  
[15] Koziol U, Rauschendorfer T, Zanon Rodriguez L, et al. The unique stem cell system of the immortal larva of the human parasite *Echinococcus multilocularis* [J]. Evodevo, 2014, 5(1): 10.  
[16] Stettler M, Fink R, Walker M, et al. In vitro parasitocidal effect of nitazoxanide against *Echinococcus multilocularis* metacystodes [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003(47): 467-474.  
[17] Perez-Cadahia B, Drobic B, Davie JR. H3 phosphorylation: dual role in mitosis and interphase[J]. Biochem Cell Biol, 2009, 87(5): 695-709.

【收稿日期】 2022-04-13 【修回日期】 2022-07-03