文章编号:1000-5404(2011)07-0667-04

论著

SW626 细胞染色体动粒变异对其染色体不稳定的影响

李 爽,谭 彬,刘学庆,陈雪梅,丁裕斌,余秋波,陈 倩,王应雄,何俊琳 (400016 重庆,重庆医科大学公共卫生学院遗传优生教研室)

【摘要】 **目的** 探讨恶性肿瘤细胞染色体不稳定性的可能机制。**方法** 采用本实验室建立的 kinetochore-NOR 同步银染技术,对 SW626 细胞染色体 kinetochore 变异进行分析。**结果** 与正常人外周血细胞相比,SW626 细胞染色体 kinetochore 缺失[132(0.89%) *vs* 26(0.18%)]、kinetochore 迟滞复制[82(0.55%) *vs* 14(0.10%)]和 kinetochore-NOR 融合[153(1.03%) *vs* 51(0.37%)]频率显著升高($P<0.01$),而不对称 kinetochore 频率二者差异性不显著($P>0.05$)。此外,在某些 SW626 细胞染色体上还观察到多重 kinetochores 现象。**结论** kinetochore 缺失、kinetochore 迟滞复制和 kinetochore-NOR 融合可能是 SW626 细胞染色体非整倍性变异起源的诱因之一;染色体多重 kinetochores 可能是恶性肿瘤细胞染色体结构畸变产生的重要途径之一。

【关键词】 染色体不稳定;kinetochore 变异;SW626 细胞

【中图法分类号】 R737.31;R394.3 **【文献标志码】** A

Effect of kinetochore variation on chromosomal instability in SW626 cells

Li Shuang, Tan Bin, Liu Xueqing, Chen Xuemei, Ding Yubin, Yu Qiubo, Chen Qian, Wang Yingxiong, He Junlin (Department of Genetics and Eugenics, College of Public Health, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

【Abstract】 **Objective** To probe possible mechanism of chromosomal instability in tumor. **Methods** Kinetochore variation was analyzed by an improved method for staining kinetochores of human chromosomes in SW626 cells. **Results** Compared to normal cells, the frequency of kinetochore loss [132(0.89%) *vs* 26(0.18%)], kinetochore duplication laggard [82(0.55%) *vs* 14(0.10%)] and kinetochore-NOR fusion [153(1.03%) *vs* 51(0.37%)] in SW626 cells was significantly higher than those of human normal periphoreal blood cells respectively ($P<0.01$). Kinetochore dissymmetry had no significant difference between SW626 cells and normal control cells ($P>0.05$). A cyto-genentic phenomenon of multi-kinetochores was observed in SW626 cells. **Conclusion** Kinetochore loss, duplication laggard and kinetochore-NOR fusion might be potential origin of aneuploidy production, and multikineto-chores might be a new mechanism for inducing chromosomal structure abnormality in tumor cells.

【Key words】 chromosomal instability; kinetochore variation; SW626 cells

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30771202) and the Foundation of Population and Family Planning Commission of Chongqing ([2008]58). Corresponding author: He Junlin, Tel: 86-23-68485926, E-mail: hejunlin_11@yahoo.com.cn

动粒(kinetochore)又称着丝粒点(centromeric dots,简称 Cd),是细胞分裂中期纺锤丝微管在染色体着丝粒区的附着点,它是由着丝粒点蛋白(centromere proteins,CENPs)和少量卫星 DNA 组成的一个 3 层盘状结构[1],与染色体分离密切相关。如果 kinetochore 缺失或发生其他变异,均可导致纺锤丝微管与染色体的联系失败或在染色体着丝粒上附着不均一,从而导致染色体异常分离。

染色体数目和结构畸变是恶性肿瘤细胞最显著的细胞遗传学特征,但其机制一直尚未阐明。一些研究提示染色体着丝粒区 kinetochore 蛋白缺乏或表达异常可能是细胞非整倍体畸变的潜在根源之一[2-6]。新近,Ganem 等[7]观察到在拥有多个中心体的细胞中,由于姐妹染色单体的 kinetochore 同时与多个中心体发出的纺锤丝微管相连接,致使染色体向两极移动迟缓

【基金项目】 国家自然科学基金(30771202);重庆市人口与计划生育委员会基金(计生办发[2008]58 号)

【通信作者】 何俊琳,电话:(023)68485926,E-mail:hejunlin_11@yahoo.com.cn

而丢失于细胞质中导致非整倍性畸变。这些结果强烈暗示了 kinetochore 变异与染色体不分离密切相关。本研究采用我室建立的 kinetochore-NOR 同步银染技术对卵巢癌细胞(SW626)染色体 kinetochore 变异进行了分析,拟探讨恶性肿瘤细胞染色体不稳定性畸变的发生机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

SW626 细胞株来自重庆医科大学生命科学院,以健康人(19~28 岁)外周血淋巴细胞作对照。使用 90% RPMI1640 培养基(美国 Gibco 公司)+10% 胎牛血清(中国杭州四季青生物工程材料有限公司),硝酸银、甲醛、甲酸、甲醇、冰醋酸、氢氧化钠、氨水(重庆川东化工有限公司)等均使用国产分析纯。

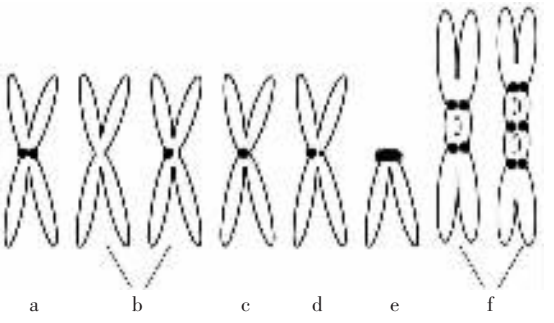
1.2 方法

SW626 细胞和正常外周血细胞在 37 ℃,5% CO_2 浓度条件下培养。待 SW626 细胞生长密度达 80% 左右时,加入秋水仙素(终浓度 0.2 μg/ml,美国 Sigma 公司),4 h 后,胰蛋白酶(美国 Difico 公司)消化收获细胞,正常外周血细胞采用常规悬浮培养,染色体制备采用常规染色体制备方法。

染色体 kinetochore 显现采用我室建立的 kinetochore-NOR 同步银染技术[8],即染色体标本片在室温下老化 10~15 d,0.2 mol/L 盐酸溶液预处理标本片 30 s,蒸馏水冲洗干净,0.1% NaOH 溶液处理标本 90 s,蒸馏水冲洗干净,在 65 ℃条件下,用 50% $AgNO_3$ 溶液处理标本 30 min,蒸馏水冲洗干净,随后在室温下用 40% 氨银溶液和 3% 福尔马林溶液等量混合处理标本片,镜下观察待染色体臂呈金黄色、kinetochore 和 NOR 区呈黑色,立刻用蒸馏水冲洗终止反应。日本 Nikon microscope eclipse 80i 型显微镜下分析标本并采集图像。

1.3 染色体 kinetochore 变异分析标准

kinetochore 变异分析标准参照我室发表的文献[5]。正常 kinetochore:1 条中期染色体的着丝粒处存在 2 个深染的近似圆形小体,分别位于 2 条姐妹染色单体上(图 1a);kinetochore 缺失:某条染色体上着丝粒区未见圆形小体或在主溢痕边缘区域仅见 1 个圆形小体(图 1b);kinetochore 迟滞复制:着丝粒区域正中仅见一个较大的圆形小体(图 1c);不对称 kinetochore:同一条染色体上 2 个 kinetochores 大小相差 1/2 以上(图 1d);kinetochore-NOR 融合:近端着丝粒染色体着丝粒区域的 1 个或 2 个圆形小体与其比邻的随体区 NOR 黑色银染物质混合在一起,使之不能区分(图 1e);多重 kinetochore:某条染色体上存在 2 对或 2 对以上的 kinetochores(图 1f)。



a:正常 kinetochore;b:kinetochore 缺失;c:kinetochore 迟滞复制;d:不对称 kinetochore;e:kinetochore-NOR 融合;f:多重 kinetochore

图 1 染色体 kinetochore 变异分类模式图

1.4 统计学分析

SW626 细胞与健康人外周血细胞 kinetochore 变异比较采用 SPSS 10.0 统计软件进行 χ^2 检验。

2 结果

SW626 细胞是典型的非整倍体细胞,染色体数目变化主要集中在 16~77 条之间,并存在复杂的结构畸变。本研究总计分析了 297 个 SW626 细胞分裂相,共计染色体 14 781 条,与健康人外周血细胞相比,在 SW626 细胞中 kinetochore 缺失、kinetochore 迟滞复制和 kinetochore-NOR 融合频率显著增高($P<0.01$),不对称 kinetochore 的差异性不显著性($P>0.05$,表 1);在 SW626 细胞中,kinetochore 缺失、kinetochore 迟滞复制、kinetochore-NOR 融合和多重 kinetochores 主要集中在亚二倍体细胞(表 2)。此外,我们还在 SW626 细胞中观察一种新的现象——多重 kinetochores(图 2)。

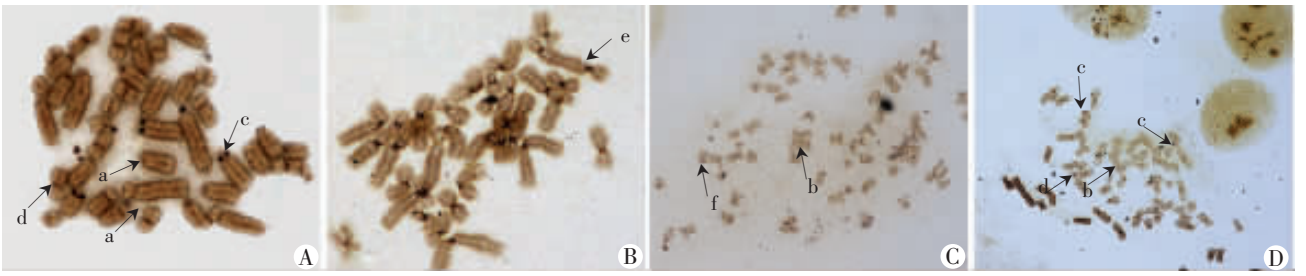
表 1 SW626 细胞与正常外周血细胞染色体 kinetochore 变异比较

细胞分类	分裂相数	染色体数	kinetochore 缺失 [条数(%)]	kinetochore 迟滞复制 [条数(%)]	kinetochore-NOR 融合 [条数(%)]	不对称 kinetochore [条数(%)]	多重 kinetochore [条数(%)]
SW626 细胞	297	14 781	132(0.89)[a]	82(0.55)[a]	153(1.03)[a]	23(0.16)	11(0.07)
健康人外周血细胞	300	13 800	26(0.18)	14(0.10)	51(0.37)	19(0.13)	0

a:$P<0.01$,与健康人外周血细胞比较

表 2 SW626 细胞中各类 kinetochore 变异的分布[条数(%)]

染色体数目	kinetochore 缺失	kinetochore 迟滞复制	不对称 kinetochore	kinetochore-NOR 融合	多重 kinetochore
染色体数目在 16~45 条范围内的细胞(计数 159 个分裂相,共计 6 042 条染色体)	81(1.34)	53(0.88)	10(0.16)	57(0.94)	7(0.12)
染色体数目在 46~77 条范围内的细胞(计数 138 个分裂相,共计 8 739 条染色体)	51(0.58)	29(0.33)	13(0.15)	96(1.10)	4(0.05)



A：示 kinetochore 缺失(a)、融合(c)和不对称 kinetochore(d)；B：示多重 kinetochore(e)；C：示 kinetochore 迟滞复制(b)和 kinetochore-NOR 未融合(f)；D：示 kinetochore 迟滞复制(b)、融合(c)和不对称 kinetochore(d)

图 2 SW626 细胞染色体 kinetochore 的变异观察 (kinetochore-NOR 同步银染 ×100)

3 讨论

有研究已经证实，kinetochore 是染色体分离所必需的重要功能元件，kinetochore 异常将导致细胞非整倍性畸变[9-10]。

染色体着丝粒区上的 kinetochore 是由着丝粒点蛋白和少量卫星 DNA 组成的一个 3 层盘状结构，kinetochore-NOR 同步银染技术是对着丝粒点蛋白成分进行染色[8]，该技术可以确定着丝粒区 kinetochore 结构是否存在。染色体不稳定(包括数目畸变和结构畸变)是恶性肿瘤细胞显著的细胞遗传学特征，但其发生机制一直不清。本研究观察到如下一些现象：①SW626 细胞染色体 kinetochore 缺失较为普遍，我们也曾在肿瘤细胞和自然流产胚胎细胞中观察到类似的现象[5]。在细胞分裂过程中，缺乏 kinetochore 结构的染色体不能与纺锤丝微管发生联系而导致姊妹染色单体不能正常分离，这提示 SW626 细胞中高频率的 kinetochore 缺失可能是其非整倍性畸变产生的途径之一。②在 SW626 细胞中观察到 kinetochore 迟滞复制现象显著增加(即在着丝粒区正中央仅见 1 个 kinetochore)，在正常情况下，细胞分裂中期时 kinetochore 已随染色体复制而完成了自身的复制，如果细胞分裂中期时 kinetochore 尚未完成复制，纺锤丝微管便不能在分裂后期将姊妹染色单体分离而诱发非整性畸变。我们认为 kinetochore 迟滞复制或许是姊妹染色单体迟滞分离的细胞学基础。③我们曾报道了 kinetochore-NOR 融合这种新的细胞遗传学现象，并在其他肿瘤细胞中也观察到 kinetochore-NOR 融合显著升高，提出 NOR 银染物质与 kinetochore 结构银染物质的混合可能会干扰纺锤丝微管与 kinetochore 结构的联系，从而影响染色体的正常分离[5,11]。本研究也在 SW626 细胞中观察到类似的现象，提示 kinetochore-NOR 融合可能是诱发 SW626 细胞染色体数目不稳定的途径之一。④有学者报道某些染色体着丝粒区处的 2 个 kinetochores 在形态大小上存在明显的差异，这种差异可能会破坏纺锤丝微管对中期染色体的平衡牵引而诱发染色体不分离[12]。但我们在 SW626 细胞中没有观察到不对称 kinetochore 显著升高的现象。

此外，我们在 SW626 细胞中观察到一种新的现象，即某些染色体存在多重 kinetochore 结构，这在正常细胞中是非常罕见的。通常，当一条染色体形成双着丝粒或多着丝粒后，只有一个着丝粒有功能活性(即着丝粒区 kinetochore 阳性)，这是细胞进化过程中所形成的维持染色体结构稳定的重要机制。在 SW626 细胞某些染色体上出现的这种多重 kinetochore 现象，提示这些染色体在结构上是不稳定的，因为多个有活性的 kinetochore 均能被纺锤丝微管附着，当细胞进入分裂后期时会由于纺锤丝微管向两极的走向不同而形成“后期桥”，其结果导致染色体断裂而形成新的结构畸变。鉴于我们在其他肿瘤细胞中也曾观察到类似现象，因而提示染色体多重 kinetochore 可能是肿瘤细胞结构畸变产生的重要途径之一。

本研究结果揭示了染色体 kinetochore 可以发生丢失、迟滞复制等事件，提示了 kinetochore 的这些变异可能与肿瘤细胞染色体错误分离密切相关，但我们并不清楚诱发染色体 kinetochore 丢失和迟滞复制的原因及机制，或许涉及 kinetochore 蛋白自身表达异常，或许涉及 kinetochore 组装过程中相关调控蛋白分子表达异常[13-14]，这有待进一步研究。此外，我们还证实了双着丝粒或多着丝粒染色体并不一定就保持一个着丝粒具有功能活性，在异常的病理状态下(如细胞恶变状态下)，一条染色体上的多个着丝粒均可保持其功能活性，但为什么肿瘤细胞能够逃逸细胞维持染色体结构稳定的这种机制尚不清楚，有待进一步探索。

参考文献：

[1] Sugimoto K, Fukuda R, Himeno M. Centromere/kinetochroe localization of human centromere protein A (CENP-A) exogenously expressed as a fusion to green fluorescent protein[J]. Cell Struct Funct, 2000, 25(4): 253-261.

[2] Vig B K, Sternes K L. Centromeres without kinetochore proteins. Another mechanism for origin of aneuploidy in neoplasia[J]. Cancer Genet Cytogenet, 1991, 51(2): 269-272.

[3] Nakagome Y, Abe T, Misawa S, *et al*. The" loss "of centromeres from chromosomes of aged women[J]. Am J Med Genet, 1984, 36(2): 398 - 404.
[4] 袁泰先, 蔡燕, 彭乙华, 等. CENP-I 表达下调对 HEK293 细胞生长及染色体分离的影响[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(16): 1569 - 1572.
[5] 何俊琳, 曹波, 王应雄. BGC823 和 A549 细胞染色体着丝粒点变异[J]. 遗传, 2005, 27(6): 877 - 881.
[6] 施琼, 翁亚光, 蔡燕, 等. 胚胎细胞 MAD2 基因表达对染色体分离的影响[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(15): 1544 - 1547.
[7] Ganem N J, Godinho S A, Pellman D. A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability[J]. Nature, 2009, 460(7252): 278 - 282.
[8] He J, Liu X, Ding Y, *et al*. An improved method for staining kinetochores of human chromosomes[J]. Indian J Exp Biol, 2009, 47(5): 376 - 378.
[9] Santaguida S, Musacchio A. The life and miracles of kinetochores[J]. EMBO J, 2009, 28(17): 2511 - 2531.
[10] Palframan W J, Meehl J B, Jaspersen S L, *et al*. Anaphase inactivation of the spindle checkpoint[J]. Science, 2006, 313(5787): 680 - 684.
[11] 王应雄, 翁亚光, 张湘蜀, 等. 正常人染色体 Cd 结构的研究[J]. 遗传, 1991, 13(4): 27 - 29, 32.
[12] Bardhan A. Complex regulation of sister kinetochore orientation in meiosis-I[J]. J Biosci, 2010, 35(3): 485 - 495.
[13] Mukhopadhyay D, Dasso M. The fate of metaphase kinetochores is weighed in the balance of SUMOylation during S phase[J]. Cell Cycle, 2010, 9(16): 3194 - 3201.
[14] Brito I L, Monje-Casas F, Amon A. The Lrs4-Csm1 monopolin complex associates with kinetochores during anaphase and is required for accurate chromosome segregation[J]. Cell Cycle, 2010, 9(17): 3611 - 3618.

(收稿:2010-10-28 修回:2010-12-09)
(编辑 吴培红)

(上接666页)

2 结果

本组共死亡23例,占15.8%,其中治疗组死亡11例(14.7%),对照组死亡12例(16.9%)。死亡原因为脑干功能衰竭13例(治疗组7例,对照组6例),多器官功能衰竭8例(治疗组3例,对照组5例),治疗组1例死于心力衰竭,对照组1例死于上消化道大出血。用药后早期2组降低颅内压的效果差异无统计学意义($P>0.05$);用药后治疗组1周内的意识清醒率、脑水肿的程度(中、重度)与对照组比较有统计学差异($P<0.05$),见表1。治疗3个月后,治疗组BI分值(77.52±12.63)及MMSE分值(26.54±7.46)均优于对照组BI分值(72.80±13.45)及MMSE分值(24.38±5.15)($P<0.05$)。用药后2组患者均未发现明显不良反应。

表1 用药后1周2组患者早期疗效比较[例(%)]

组别	例数	意识清醒	颅内压(mmH_2O)			脑水肿		
			≤200	201~249	≥250	轻度	中度	重度
治疗组	75	58(77.3)[a]	23(30.7)	38(50.7)	14(18.7)	18(24.0)	33(44.0)[a]	24(32.0)[a]
对照组	71	44(62.0)	20(28.2)	35(49.3)	16(22.5)	15(21.1)	20(28.2)	36(50.7)

a: $P<0.05$,与对照组比较

3 讨论

高血压脑出血术后脑水肿、高颅压是影响患者预后的主要原因,临床上常用20%甘露醇控制高颅压,其作用机制一般多认为通过高渗作用带走大量水分而起到利尿作用,从而缩小脑容积[1]。近年来有文献报道,吡拉西坦具有降低颅内压的作用[2],本组资料表明,吡拉西坦降低颅内压的效果与甘露醇相当,其作用机制尚不清楚。吡拉西坦对局灶性脑水肿的控制优于甘露醇,本组资料显示,治疗1周后中、重度脑水肿组间比较有统计学意义,其作用机制可能为:①通过渗透性脱水带走脑水肿组织内的水分,有学者认为,从临床应用来看,其脱水机理与甘露醇相似,属于渗透性脱水[3];②脑出血后血肿周围血流量下降,缺血、缺氧是造成脑水肿的重要原因[4],吡拉西坦是一种神经营养药物,能增加脑细胞的ATP/ADP比率和葡萄糖的利用率,增加脑细胞对缺氧的耐受能力,促进受损脑细胞的修复,从而减轻脑水肿。高血压脑出血容易留下偏瘫等后遗症,以及失语、失用、记忆障碍等认知功能障碍,导致痴呆的发生率为27.5%,患者生存能力低下[5]。本组资料表明,吡拉西坦可改善患者的生存质量,治疗组BI分值及MMES分值均显著高于对照组,吡拉西坦可促进乙酰胆碱合成并增强神经兴奋的传导,促进脑内代谢,改善高级端脑整合的作用,从而提高学习、记忆能力。甘露醇治疗可引起肾功能衰竭和水、电解质紊乱等不可忽视的不良反应[6],本组资料未出现肾功能衰竭患者,但2组均有部分患者出现一过性血尿素氮及肌酐升高,其中治疗组8例(10.7%),对照组17例(23.9%),组间比较有统计学差异($P<0.05$),甘露醇对肾功能的损害仍应引起高度重视,本组未发现其他不良反应。脑出血后随着损伤的严重性和持续时间等因素可导致不同程度的神经元坏死和凋亡,因此,早期的治疗对患者的预后至关重要。应用大剂量吡拉西坦能在早期降低脑水肿的程度及有效降低高颅压,还具有促进神经功能恢复的双重功效,对高血压脑出血患者不失为理想的、可供选择的药物。

参考文献:

[1] Tan G, Zhou J, Yuan D, *et al*. Formula for use of mannitol in patients with intracerebral haemorrhage and high intracranial pressure[J]. Clin Drug Investig, 2008, 28(2): 81 - 87.
[2] Bhardwaj A. Osmotherapy in neurocritical care[J]. Curr Neurol Neurosci Rep, 2007, 7(6): 513 - 521.
[3] 林欣, 苏晨芳, 张赛, 等. 康容注射液降低颅内压作用的临床研究[J]. 中国临床神经外科杂志, 2004, 9(3): 190 - 192.
[4] 李玲, 陈康宁, 陈福明. 氟桂利嗪对大鼠脑出血后脑细胞内游离钙的影响[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(11): 981 - 983.
[5] 王拥军. 脑血管疾病与认知功能障碍[J]. 中华内科杂志, 2005, 44(11): 872 - 873.
[6] Gondim Fde A, Aiyagari V, Shackleford A, *et al*. Osmolality not predictive of mannitol-induced acute renal insufficiency[J]. J Neurosurg, 2005, 103(3): 444 - 447.

(收稿:2011-02-11 修回:2011-03-07)
(编辑 王小宴)