

# HEP-2 细胞染色体不稳定性与 kinetochore 变异

龙春兰 谭 彬 刘学庆 丁裕斌 陈雪梅 余秋波 高茹菲 王应雄 何俊琳\*

(重庆医科大学遗传优生教研室, 重庆 400016)

**摘要** 染色体非整倍性畸变是恶性肿瘤细胞的显著细胞遗传学特征,但其诱发染色体数目不稳定的机制一直尚未阐明。本研究从与染色体分离直接相关的动粒(kinetochore)角度,采用 kinetochore-NOR 同步银染技术对 HEP-2 细胞染色体 kinetochore 变异进行分析,以探讨恶性肿瘤细胞染色体数目变异的形成机制。实验共分析 HEP-2 细胞分裂相 308 个,计染色体 16 962 条,正常对照个体外周血细胞分裂相 300 个,计染色体 13 800 条。结果表明:与正常人外周血细胞相比,HEP-2 细胞染色体 kinetochore 缺失和 kinetochore 迟滞复制频率显著升高( $P < 0.01$ ),而 kinetochore-NOR 融合频率二者没有显著差异( $P > 0.05$ ),这些结果提示 kinetochore 缺失和 kinetochore 迟滞复制可能是 HEP-2 细胞染色体非整倍性变异起源的诱因之一。此外,我们还在某些 HEP-2 细胞染色体上观察到多重 kinetochore 现象,并认为染色体多重 kinetochore 可能是恶性肿瘤细胞染色体结构畸变产生的一个新的途径。

**关键词** 染色体不稳定; kinetochore 变异; HEP-2 细胞

动粒(kinetochore)是细胞分裂过程中支持染色体分离的重要元件,它是由 kinetochore 蛋白(centromere proteins, CENPs)和少量卫星 DNA 组成的一个三层盘状结构<sup>[1]</sup>,位于染色体着丝粒区,其外围结构是纺锤体微管附着的蛋白质复合体区域。在细胞的分裂过程中,纺锤丝微管的附着、染色体的移动、分离均与 kinetochore 密切相关。如果 kinetochore 缺失或发生其它变异,均可导致纺锤丝微管与染色体的联系失败或在染色体上的附着不均一,进而引起染色体分离行为的异常。

细胞的分裂过程中染色体不分离或错误分离是诱发细胞非整倍性畸变的直接原因。恶性肿瘤细胞最显著的细胞遗传学特征之一是染色体非整倍性畸变,但其机制一直尚未阐明。Vig 等<sup>[2]</sup>采用抗着丝点抗体间接免疫荧光技术对肿瘤细胞染色体的 kinetochore 变异进行了分析,发现肿瘤细胞的 kinetochore 缺失频率显著高于正常细胞,并认为 kinetochore 缺失可能是肿瘤细胞非整倍体畸变的潜在根源之一。Ganem 等<sup>[3]</sup>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而丢失于细胞质中导致非整倍性畸变。我们在自然流产夫妇外周血细胞和肿瘤细胞中也观察到染色体 kinetochore 缺失现象非常普遍<sup>[4,5]</sup>,在正常人中随着年

龄增长 kinetochore 缺失频率增高<sup>[6]</sup>,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 同步银染技术对人喉部鳞癌细胞(HEP-2)染色体 kinetochore 变异进行了分析,拟探讨恶性肿瘤细胞染色体非整倍性畸变的发生机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

HEP-2 细胞株来自重庆医科大学生命科学院,正常个体外周血细胞作为对照。DMEM 高糖(美国 Gibco 公司)、RPMI-1640(美国 Gibco 公司)、胎牛血清 FCS(四季青)、硝酸银、甲醛、甲酸、甲醇、冰醋酸、氢氧化钠、氨水等均使用国产分析纯。

### 1.2 方法

HEP-2 细胞和正常个体外周血细胞培养均使用 90% RPMI-1640+10% FCS 混合培养基,在 37℃,5% CO<sub>2</sub> 浓度条件下培养。HEP-2 细胞待其生长密度达 80% 左右时,加入秋水仙素(终浓度 0.2 μg/ml),4 h

收稿日期: 2010-09-30 接受日期: 2010-11-15

国家自然科学基金(No.30771202)和重庆市人口计生委项目(No. [2008]58)资助项目

\* 通讯作者。Tel: 023-68485926, Fax: 023-68485008, E-mail: hejunlin\_11@yahoo.com.cn

后,胰酶消化收获细胞,正常个体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。染色体标本片在室温下老化10~15天,采用我室建立的 kinetochore-NOR 同步银染技术显现 kinetochore<sup>[7]</sup>,油镜下观察分析HEP-2细胞分裂相308个,正常对照个体外周血细胞分裂相300个。

### 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<sup>[8]</sup>:在正常情况下,一条中期染色体的着丝粒处存在2个深染的近似圆形小体,分别位于两条姐妹染色单体上(图1a);如果某条染色体上未见圆形小体或者在主溢痕边缘区域仅见1个圆形小体,则计为 kinetochore 缺失(图1b);如果近端着丝粒染色体的着丝粒区域的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,则计为 kinetochore-NOR 融合(图1c);如果同一条染色体上2个 kinetochore 大小相差1/2以上,则计为不对称 kinetochore (图1d);如果某条染色体上存在2对或2对以上的 kinetochore,则计为多重 kinetochore(图1e)。如果着丝粒区域正中仅见一个较大的圆形小体,则计为 kinetochore 迟滞复制(图1f)。

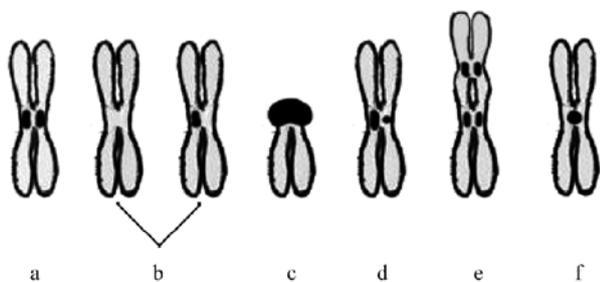


图1 染色体 kinetochore 分类标准模式图

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

**Fig. 1** Mode figure of category criteria of kinetochore variation  
a: normal kinetochore; b: kinetochore loss; c: kinetochore fusion; d: dissymmetry kinetochore; e: multi-kinetochores; f: kinetochore replication laggard.

## 2 结果

HEP-2细胞是典型的非整倍体细胞,染色体数目变化在36~120条之间,并存在结构畸变。我们总计分析了HEP-2细胞分裂相308个,共计染色体16 962条,检出 kinetochore 缺失染色体146条(0.86%)、

kinetochore-NOR 融合染色体75条(0.44%), kinetochore 迟滞复制染色体103条(0.61%),不对称 kinetochore 染色体92条(0.54%),多重 kinetochore 染色体18条(0.11%),与正常外周血细胞相比,在HEP-2细胞中 kinetochore 缺失、kinetochore 迟滞复制和不对称 kinetochore 频率显著增高( $P < 0.01$ ,表1);HEP-2细胞中各类 kinetochore 变异的分布见表2。此外,我们还在HEP-2细胞中观察到多重 kinetochores(表1)。

## 3 讨论

kinetochore 是位于染色体着丝粒区并与染色体分离密切相关的一个重要功能元件,已有研究证实 kinetochore 的主要作用归纳为4个方面<sup>[9,10]</sup>:① kinetochore 结构的内板和着丝粒区染色质紧密结合;② kinetochore 结构的外板与纺锤体微管发生联系,在有丝分裂中期和后期控制染色体的运动和分离;③在细胞分裂过程中,通过纺锤体聚集检查点(spindle assembly checkpoint, SAC)这一反馈机制来监控 kinetochore 和纺锤体微管的相互作用,进而调节整个细胞分裂周期的进程;④预防和纠正错误的染色体分离,以维持细胞的正常基因组结构。

染色体的不稳定性主要涉及染色体结构变异和数目变异,染色体上完整的着丝粒和端粒结构是维持染色体结构稳定的重要基础,而 kinetochore 和纺锤体结构的完整以及与染色体复制和细胞分裂相关蛋白分子的正常表达是染色体正常分离的重要保证。染色体的不稳定性是恶性肿瘤细胞最显著的特征之一,但对其发生机制一直未能阐明。以往一些研究从着丝粒结构变异、kinetochore 失活以及 kinetochore 与纺锤体微管联系失败等方面对非整倍性畸变产生的可能途径提出了一些假说。Zhang 等<sup>[11]</sup>曾提出“着丝粒爆开”能够引起染色体期外分离而导致非整倍性畸变。Vig 等<sup>[12]</sup>认为缺失 kinetochore 蛋白的染色体,其着丝粒功能失活,纺锤丝微管不能附着于着丝粒上,这可能是肿瘤细胞染色体非整倍性畸变发生的潜在根源。

本研究所分析的HEP-2细胞具有典型的染色体不稳定性特征,染色体数目变异主要集中在36~120条之间,表现为非整倍性畸变,并涉及诸多染色体结构畸变。我们在对HEP-2细胞 kinetochore 变异分析中观察到如下一些现象:①在HEP-2细胞中,其 kinetochore 缺失较为普遍(表1,图2a),我们过去在对其

表 1 HEP-2 细胞与正常个体外周血细胞染色体 kinetochore 变异比较( $\chi^2$  检验)

材料 Materials	分裂相数 Number of metaphases	染色体数 Number of chromosomes	Table 1 Comparison of kinetochore variation between HEP-2 cells and normal leukomonocyte cells( $\chi^2$ test)					
			Kinetochore 缺失 Kinetochore loss	Kinetochore 迟滞复制 Kinetochore duplication laggard	Kinetochore 不对称 Kinetochore dissymmetry	Kinetochore-NOR 融合 Kinetochore-NOR fusion	多重 kinetochore Multi-kinetochores	
HEP-2 cell	308	16962	146(0.86%)**	103(0.61%)**	92(0.54%)	75(0.44%) $\Delta$	18(0.11%)	
Lymphocyte from health people	300	13800	26(0.18%)	14(0.10%)	19(0.13%)	51(0.37%)	0	

\*\* $P < 0.01$ ;  $\Delta P > 0.05$

表 2 HEP-2 细胞中各类 kinetochore 变异的分布  
Table 2 Distribution of various kinetochore variations in HEP-2 cells

变异类型 / 染色体数目 Variation category / Number of chromosomes	Table 2 Distribution of various kinetochore variations in HEP-2 cells					
	Kinetochore 缺失 Kinetochore loss	Kinetochore 迟滞复制 Kinetochore duplication laggard	Kinetochore 不对称 Kinetochore dissymmetry	Kinetochore-NOR 融合 Kinetochore-NOR fusion	多重 kinetochore Multi-kinetochores	
$\leq 45$ chromosomes (analyzing 142 metaphases, amount to 5 396 chromosomes)	76(1.40%)	21(0.39%)	19(0.35%)	14(0.26%)	11(0.20%)	
From 46 to 92 chromosomes (analyzing 127 metaphases, amount to 7 744 chromosomes)	27(0.35%)	49(0.63%)	43(0.56%)	36(0.46%)	5(0.06%)	
$\geq 93$ chromosomes (analyzing 39 metaphases, amount to 3 822 chromosomes)	43(1.12%)	33(0.86%)	30(0.78%)	25(0.65%)	2(0.05%)	

Kinetochore 缺失主要集中在染色体数亚二倍体细胞; kinetochore 迟滞复制、不对称 kinetochore 和 kinetochore-NOR 融合主要集中在超二倍体细胞; 多重 kinetochore 主要集中在亚二倍体细胞。

Kinetochore loss was mainly observed in hypodiploid cells; kinetochore replication laggard, dissymmetric kinetochore and kinetochore-NOR fusion distributed mainly in hyperdiploid cells; multi-kinetochores was mainly observed in hypodiploid cells.

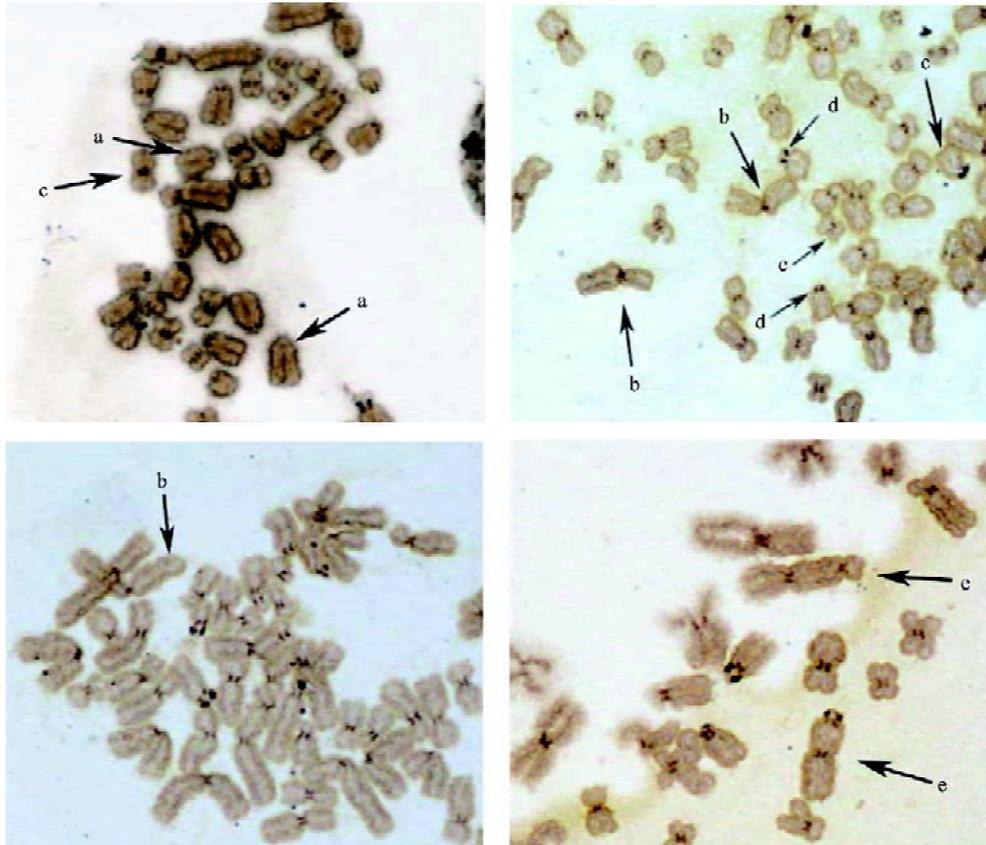


图2 HEP-2 细胞染色体 kinetochore 变异

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

Fig.2 Kinetochore variation in HEP-2 cells

a: kinetochore loss; b: kinetochore replication laggard; c: dissymmetry kinetochore; d: kinetochore-NOR fusion; e: multi-kinetochore.

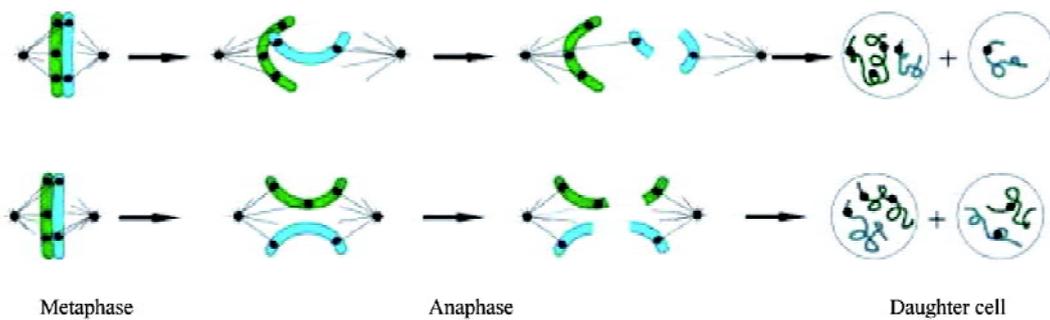


图3 多重 kinetochore 染色体多种分离模式中的两种模式

多重 kinetochore 在分裂后期时可产生多种分离模式, 但均可形成后期桥而导致新的染色体结构畸变。

Fig.3 Segregation mode of chromosome with multi-kientochores

Chromosome with multi-kinetochores may form diverse segregation modes at anaphase, but all of them produce a phenomenon of bridge-anaphase. The result will induce new structure aberration.

它肿瘤细胞和自然流产胚胎细胞的研究中也观察到类似的现象<sup>[4,5]</sup>。在细胞分裂过程中, 没有 kinetochore 的染色体, 纺锤丝微管不能附着于着丝粒上而导致姐妹染色单体不能向两极移动, 这提示HEP-2细

胞中染色体高频率的 kinetochore 缺失可能是其非整倍性畸变产生的途径之一, 但kinetochore缺失是由于 kinetochore 组装失败, 还是 kinetochore 蛋白合成异常所造成, 尚不清楚; ②在 HEP-2 细胞中, 我们观察到

kinetochore 迟滞复制频率显著增高(即在中期染色体着丝粒区正中央仅见 1 个 kinetochore)(表 1, 图 2b)。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, 在染色体着丝粒区可见 2 个 kinetochore 分别位于姐妹染色单体上, 如果细胞分裂中期时染色体 kinetochore 尚未完成复制, 纺锤丝微管便不能在分裂后期时将姐妹染色单体分离而诱发非整倍性畸变, 本研究在 HEP-2 细胞中见到高频率的 kinetochore 迟滞复制可能与其染色体数目不稳定相关。曾有学者提出姐妹染色单体迟滞分离是非整倍性畸变产生的重要途径, 但并不清楚姐妹染色单体迟滞分离的细胞学或分子学基础, 我们认为 kinetochore 迟滞复制或许是姐妹染色单体迟滞分离的细胞学基础; ③在正常细胞中, 中期染色体着丝粒区的 2 个 kinetochore 在形态大小上是一致的, 但我们在 HEP-2 细胞中观察到有许多染色体的 2 个 kinetochore 在形态上存在明显的差异(表 1, 图 2c), 我们称之为不对称 kinetochore。kinetochore-NOR 同步银染主要针对着丝粒点蛋白(CENPs)染色, kinetochore 大小的差异间接反映出着丝粒点蛋白含量或蛋白活性的差异。有研究表明, 在 kinetochore 结构组装过程中, CENP-A、CENP-B 在 CENPs 分子聚集、DNA 与 CENPs 分子相互联系以及维持染色体上仅有一个着丝粒有功能活性中扮演着重要角色<sup>[12-14]</sup>。此外, 动粒上的 Mad 和 Bub 蛋白家族可以使 kinetochore 活化, 促使纺锤丝微管与 kinetochore 接触<sup>[15]</sup>。因此, 我们对染色体上不对称 kinetochore 可能造成的后果作如下解释: kinetochore 结构的不对称性反映出 kinetochore 结构蛋白含量或活性的差异, 其结果可能导致纺锤丝微管在 kinetochore 结构上的不对称附着, 从而破坏了纺锤丝微管对姐妹染色单体向两极的平衡牵引, 最终诱发染色单体错误分离而形成非整倍性畸变; ④kinetochore-NOR 融合(图 2d)是我们过去曾提出的一种新的细胞遗传学现象<sup>[8]</sup>, 即近端着丝粒染色体上 kinetochore 结构的银染物质与其临近的核仁组织区(NOR)的银染物质混合在一起使之不能区分, 我们曾认为 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, 从而导致染色体分离行为异常而诱发非整倍性畸变<sup>[5,6,8]</sup>。本研究结果显示, HEP-2 细胞与正常细胞比较, 其 kinetochore-NOR 融合频率未见显著升高, 提示 HEP-2 细胞染色体数目的不稳定性可能与 kinetochore-NOR 融合无关。

此外, 我们在 HEP-2 细胞中观察到一种罕见的现象, 即在某些多着丝粒染色体上存在多对 kinetochore 结构, 提示这些具有 kinetochore 结构的着丝粒均具有功能活性, 我们称之为多重 kinetochore(图 2e), 这种现象在非恶性肿瘤细胞中是未见报道的。通常, 当一条染色体形成双着丝粒或多着丝粒后, 在染色体上仅保留一个着丝粒有功能活性(即只有一个着丝粒显示 kinetochore 结构阳性), 其余着丝粒失去功能活性(即着丝粒显示 kinetochore 结构阴性), 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。我们在 HEP-2 细胞中所见到的这种多重 kinetochore 的现象, 提示这些染色体在结构上是不稳定的, 因为在细胞分裂中期时, 纺锤丝微管均可附着在 kinetochore 上, 当分裂进入后期时, 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(图 3)。我们也曾在 BGC823 和 SW626 恶性肿瘤细胞中观察到类似的现象, 因此, 我们认为染色体多重 kinetochore 可能是肿瘤细胞结构畸变产生的一种新的途径。

总之, 恶性肿瘤细胞染色体不稳定性的诱发原因可能涉及多条途径, 某些肿瘤细胞染色体数目和结构变异可能涉及 kinetochore 变异, 而某些肿瘤细胞染色体的这种不稳定性可能涉及其它因素。本研究仅从染色体 kinetochore 变异这一角度, 探讨了 HEP-2 细胞染色体不稳定性的可能诱发原因。但诱发 kinetochore 变异的机制是不清楚的, 有待探索。

### 参考文献(References)

- 1 Sugimoto K, Fukuda R, Himeno M. Centromere/kinetochore localization of human centromere protein A (CENP-A) exogenously expressed as a fusion to green fluorescent protein. *Cell Struct Func* 2000; 25(4): 253-61.
- 2 Vig BK, Sternes LK. Centromeres without kinetochore proteins: Another mechanism for origin of aneuploidy in neoplasia. *Cancer Genet Cytogenet* 1991; 51(2): 269-72.
- 3 Ganem NJ, Godinho SA, Pellman D. A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability. *Nature* 2009; 460(7252): 278-83.
- 4 翁亚光, 王应雄, 张湘蜀, 吴春英, 何俊琳, 郑增淳. 自然流产夫妇染色体着丝粒点的研究. *中华妇产科杂志* 1995; 30(3): 142-4.
- 5 何俊琳, 曹波, 王应雄. BGC823 和 A549 细胞染色体着丝粒点变异. *遗传* 2005; 27(6): 877-81.
- 6 翁亚光, 王应雄, 张湘蜀, 吴春英, 郑增淳. 正常人各年龄组染色体着丝粒点(Cd)研究. *遗传* 1995; 17(3): 3-6.

- 7 He J, Liu X, Ding Y, Yu C, Weng Y, Wang Y, *et al.* An improved methode for staining kinetochores of human chromosomes. *Indian J Exp Biol* 2009; 47(5): 376-8.
- 8 王应雄, 翁亚光, 张湘蜀, 郑增淳, 周明娟, 顾美礼。正常人染色体 Cd 结构的研究。 *遗传* 1991; 13(4): 27-32.
- 9 Santaguida S, Musacchio A. The life and miracles of kinetochores. *EMBO J* 2009; 28(17): 2511-31.
- 10 Palframan WJ, Meehl JB, Jaspersen SL, Winey M, Murray AW. Anaphase inactivation of the spindle checkpoint. *Science* 2006; 313(5787): 680-4.
- 11 Zhang SH. Centromere spreading and out-of-phase chromatid separation in Burkitt's lymphoma and nasopharangeal carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1986; 23(2): 211-7.
- 12 Black BE, Foltz DR, Chakravarthy S, Luger K, Woods VL Jr, Cleveland DW. Structural determinants for generating centromeric chromatin. *Nature* 2004; 430(6999): 578-82.
- 13 Carroll CW, Silva MC, Godek KM, Jansen LE, Straight AF. Centromere assembly requires the direct recognition of CENP-A nucleosomes by CENP-N. *Nat Cell Biol* 2009; 11(7): 896-902.
- 14 Okada T, Ohzeki J, Masumoto H, Yoda K, Brinkley WR, Larionov V, *et al.* CENP-B controls centromere formation depending on the chromatin context. *Cell* 2007; 131(7): 1287-300.
- 15 翟中和, 王喜忠, 丁明孝。 *细胞生物学*, 第 3 版。北京: 高等教育出版社, 2000, 382.

## Chromosomal Instability and Kinetochore Variation in HEP-2 Cells

Chun-Lan Long, Bin Tan, Xue-Qing Liu, Yu-Bin Ding, Xue-Mei Chen,

Qiu-Bo Yu, Ru-Fei Gao, Ying-Xiong Wang, Jun-Lin He\*

(Department of Genetics, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract** Chromosomal instability is a marked character in many tumor cells, however the mechanism of this instability has not been clarified up to now. In this study, kinetochore variation of HEP-2 cells were analyzed by an improved method for staining kinetochores of human chromosomes in order to probe the mechanism of chromosomal instability of tumor cells. The metaphases of 308 (including 16 962 scored chromosomes) from HEP-2 cells and 300 (including 13 800 scored chromosomes) from normal control were analyzed under microscope. The results showed that: 1) compared to normal cells, frequency of kinetochore loss, kinetochore duplication laggard and kinetochore dissymetry in HEP-2 cells were significantly higher than that of control respectively ( $P < 0.01$ ). 2) a cytogenetic phenomenon of multi-kinetochores was observed in HEP-2 cells, and we suggested that it might be a new mechanism for inducing chromosomal structure abnormality in tumor cell.

**Key words** chromosomal instability; kinetochore variation; HEP-2 cells

Received: September 30, 2010 Accepted: November 15, 2010

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30771202) and the Project of Chongqing Population and Family Planning Commission (No.[2008]58)

\*Corresponding author. Tel: 86-23-68485926, Fax: 86-23-68485008, E-mail: hejunlin\_11@yahoo.com.cn