

· 临床研究 ·

U937 细胞染色体动粒变异的研究

柳光芬

(重庆消防总队医院检验科 400060)

摘要:目的 使用特殊银染方法分析 U937 细胞染色体动粒变异情况。方法 采用动粒-核仁组织区(Cd-NOR)银染法分析 15 728 条 U937 白血病细胞(观察组)和 13 800 条健康人(对照组)分裂中期姐妹染色体动粒,并进行比较。结果 与对照组外周血淋巴细胞染色体动粒比较,观察组染色体动粒缺失(0.80%)、动粒迟滞复制(0.38%)和不对称动粒(0.24%)概率显著升高($P < 0.01$),而 Cd-NOR 融合(0.71%)差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 U937 肿瘤细胞普遍伴随着动粒变异,以此为基础可以建立一种诊断或治疗该肿瘤的新方法。

关键词:染色体;肿瘤细胞,培养的;动粒

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.25.014

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)25-2605-02

Study on kinetochore variations of U937 cell lines

Liu Guangfen

(Department of Clinical Laboratory, Fire Brigade Hospital, Chongqing 400060, China)

Abstract: Objective To investigate the kinetochore variations of U937 cell lines analyzed by special silver-staining method. **Methods** We used centromeric dots nucleolar organizing region(Cd-NOR) silver staining method to analyze 15728 U937 leukemia cells(observation group) and 13800 normal human chromosomes(control group) and conducted the comparison. **Results** Compared with peripheral blood lymphocyte kinetochore in the control group, the probability of kinetochore loss(0.80%), kinetochore duplication laggard(0.38%) and kinetochore dissymmetry(0.24%) of U937 cells in the observation group was significantly increased ($P < 0.01$), but Cd-NOR fusion(0.71%) had no statistical difference($P > 0.05$). **Conclusion** U937 tumor cells are generally accompanied by kinetochore variations. Based on it, a new method to diagnose or treat tumor may be established.

Key words: chromosomes; tumor cells, cultured; kinetochore

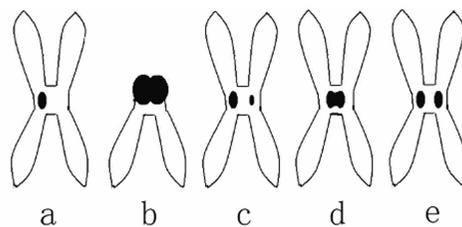
动粒(kinetochore)又称着丝粒点(centromeric dots, Cd),是细胞分裂前/中期维系姐妹染色体的重要结构。动粒主要是由多种着丝粒蛋白(centromeric proteins, CENPs)和串联重复的卫星 DNA 等组成,其内层附着在着丝粒上,外层和纺锤丝微管相连,并在其牵引下完成染色体移动和分离等过程。动粒结构或者组成的缺失或者变化,可能会导致纺锤丝微管的附着失败或者不平衡,进而引起染色体分离异常。有研究发现,在各种类型的肿瘤中染色体数目和形态异常是其显著的遗传学特征,而染色体不分离或错误分离是产生上述结果的直接原因。有研究发现,在 HEP-2 和 SW626 等细胞染色体上动粒变异的概率远高于正常细胞^[1-2],而在健康人外周血淋巴细胞动粒的变异则极为罕见^[3]。上述发现提示动粒的畸变可能是引起肿瘤细胞染色体异常的原因之一。作者采用改良的动粒-核仁组织区(centromeric dots-nucleolus organizer region, Cd-NOR)银染法^[4-5],分析了 U937 白血病细胞系的动粒变异情况,以期急性髓系白血病的诊断提供新手段和后续研究的开展奠定基础。

1 材料与与方法

1.1 材料 U937 白血病细胞株(观察组)保存于重庆消防总队医院检验科,健康人外周血(对照组)也收集于本科室,提前排除遗传病和其他可能引起染色体变异的疾病,所有受试者均签知情同意书。RPMI1640、胎牛血清(FCS)购自美国 Gibco 公司,硝酸银等常用试剂均使用国产分析纯。

1.2 方法 U937 细胞株使用 90% RPMI1640+10% FCS 混合培养基在 37℃, 5% CO₂ 浓度,饱和湿度培养,待其生长分裂旺盛时,加入终浓度 0.2 μg/mL 的秋水仙素,于培养环境中孵育 4 h 后,0.2% 胰蛋白酶消化收获细胞。健康人外周血细胞使用 90% RPMI1640+10% FCS 混合培养基在 37℃ 封闭

培养 72 h 后加入 0.2 μg/mL 的秋水仙素,孵育 2 h, 1 000 r/min 常温离心 10 min 收获细胞。常规染色体制备方法,滴片后于 60℃ 烤箱中老化过夜,采用 Cd-NOR 同步银染法染色,油镜下观察计数并照相。分别统计两组细胞分裂相各 300 个,得到 4 种动粒变异类型的染色体数以及染色体总数。动粒变异分类参照相关文献^[1-2],将动粒变异分为 4 类:动粒缺失、Cd-NOR 融合、不对称动粒及动粒迟滞复制。染色体动粒分类标准模式,见图 1。



a: 动粒缺失; b: Cd-NOR 融合; c: 不对称动粒; d: 动粒迟滞复制; e: 正常动粒。

图 1 染色体动粒分类标准模式图

1.3 统计学处理 采用 SPSS 统计软件进行分析。采用 χ^2 分析,对两组同一动粒变异类型进行两两比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

本文一共分析了 U937 细胞株染色体分裂象 300 个,共计染色体 15 728 条:检出动粒缺失(封 2 图 2:a)染色体 126 条(0.80%)、Cd-NOR 融合(封 2 图 2:b)染色体 112 条(0.71%)、不对称动粒(封 2 图 2:c)染色体 38 条(0.24%)、动粒迟滞复制(封 2 图 2:d)染色体 59 条(0.38%)、正常动粒(封 2 图 2:e)染

色体 15 393 条(97.87%);和对照组外周血淋巴细胞动粒变异数据相比较,动粒缺失、迟滞复制和不对称的概率显著升高($P < 0.01$),Cd-NOR 融合差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

表 1 两组细胞染色体动粒变异情况比较[n(%)]

组别	染色体总数	动粒缺失	动粒-NOR 融合	不对称动粒	动粒迟滞复制
观察组	15 728	126(0.80)*	112(0.71)	38(0.24)*	59(0.38)*
对照组	13 800	35(0.25)	78(0.57)	12(0.09)	19(0.14)

*: $P < 0.01$, 与对照组比较。

3 讨论

染色体不稳定(chromosomal instability, CIN)是肿瘤细胞最显著的遗传学特征之一^[6-8],但到底是细胞肿瘤化导致 CIN,还是因为某些关键染色体的高度畸变而使细胞肿瘤化,二者之间的因果关系一直未能明确。有研究发现,肿瘤细胞染色体着丝粒上动粒蛋白缺失/失活概率远高于正常细胞^[1-2],提示动粒结构的完整性对保持染色体稳定至关重要。动粒结构的缺失将会影响纺锤丝微管附着,分裂后期染色体不能在纺锤丝微管的牵引下正确向细胞两极移动,进而引起染色体不分离或者错误分离。

通过分析 U937 肿瘤细胞动粒并和健康人外周血淋巴细胞染色体对比发现,其变异主要分为 3 种类型:缺失(封 2 图 2:a),不对称(封 2 图 2:c)和迟滞复制(封 2 图 2:d),而 Cd-NOR 融合(封 2 图 2:b)差异无统计学意义($P > 0.05$)。本文结果显示,U937 细胞动粒缺失率(0.80%)远远高于正常细胞(0.25%),提示动粒缺失可能是引起其染色体不稳定的一个重要因素。有研究显示被巨细胞病毒感染而导致流产的胚胎染色体动粒畸变率明显增高,其中动粒消失和变小为其主要变异方式^[9]。动粒上含有多种维持着丝粒功能、结构的 CENPs 以及 Mad(mitotic arrest defective)、Bub(budding uninhibited by benomy)等促使微管和动粒接触的重要蛋白^[10-11],是纺锤丝微管连接着丝粒的关键元件。如果一对姐妹染色单体上动粒出现缺失,由该侧中心体发出的纺锤丝不能和染色单体连接,导致牵引不平衡,则必然会在分裂后期引起染色丢失或增加等现象^[12]。

Cd-NOR 同步银染法,主要是针对其结构上丰富的蛋白质进行着色,银染下较大的动粒可能含有更多的 CENPs 等和其他与纺锤丝连接相关物质,正常染色体之间动粒大小本不尽相同^[13],但姐妹染色单体上的动粒通常是大小一致的两个对称小点,这和分裂的有序性有很大关系。本研究中发现 U937 肿瘤细胞中出现较高频率的不对称动粒(0.24%),动粒结构的不对称可能会影响到两极中心体发散出纺锤丝的附着数量,破坏纺锤丝牵引姐妹染色单体的平衡性,这也可能是引起染色体分离出现问题的潜在因素之一。作者也观察到 U937 肿瘤细胞染色体中存在动粒迟滞复制的现象(0.38%),和正常细胞动粒迟滞率(0.14%)比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。在分裂间期染色体复制时,由于种种原因动粒并未复制或复制后未分离,致使分裂期的一对染色体上只有一个动粒,这种现象称之为动粒迟滞复制。只有一个动粒结构的染色体在有丝分裂中/后期时,细胞两极中心体发出的纺锤丝都附着在同一个动粒上,不能使姐妹染色单体顺利分离并移动到两极,从而导致两条染色单体进入同一子细胞或者丢失在细胞质中^[14]。

肿瘤细胞染色体数目和结构变异可能受多种因素影响,本文从和染色体分离直接相关的动粒入手,探讨了动粒和肿瘤染色体变异之间可能的相互联系。Cd-NOR 同步银染可以特异性的对着丝粒上有活性的动粒染色。和目前使用较多的间接

免疫荧光方法相比,该方法不需要昂贵的 ACA(Anti-Chromosome antibody)抗体,操作的时间短,有利于疾病的快速诊断。同时,银染片无需封片,在常温下也能保存数年时间,有利于患者资料的保存,避免了荧光易淬灭保存时间短的缺点。因此 Cd-NOR 同步银染法可作为一种诊断肿瘤的快速临床诊断方法。

参考文献:

- [1] 龙春兰,谭彬,刘学庆,等. HEP-2 细胞染色体不稳定性与 kinetochore 变异[J]. 中国细胞生物学学报,2011,33(2): 136-141.
- [2] 李爽,谭彬,刘学庆,等. SW626 细胞染色体动粒变异对其染色体不稳定的影响[J]. 第三军医大学学报,2011,33(7):667-670.
- [3] 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.
- [4] Vig BK, Sternes KL. Centromeres without kinetochore proteins another mechanism for origin of aneuploidy in neoplasia[J]. Cancer Genet Cytogenet,1991,51(2):269-272.
- [5] 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.
- [6] Lingle WL, Barrett SL, Negron VC, et al. Centrosome amplification drives chromosomal instability in breast tumor development[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2002,99(4): 1978-1983.
- [7] Eden A, Gaudet F, Waghmare A, et al. Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation [J]. Science,2003,300(5618):455.
- [8] McCarthy N. Chromosomal instability: A lack of new origins drives fragility[J]. Nat Rev Cancer,2011,11(9):626-627.
- [9] 刘彦慧,王明波,何永明,等. 巨细胞病毒感染与早期胚胎组织细胞染色体着丝粒及染色体变异关系研究[J]. 中国优生与遗传杂志,2008,16(5):30-31.
- [10] Hardwick KG, Shah JV. Spindle checkpoint silencing: ensuring rapid and concerted anaphase onset[J]. F1000 Biol Rep,2010(2):55.
- [11] Stenbrück L, Pereira G, Efferth T. Effects of artesunate on cytokinesis and G₂/M Cell cycle progression of tumour cells and budding yeast[J]. Cancer Genomics Proteomics, 2010,7(6):337-346.
- [12] Ganem NJ, Godinho SA, Pellman D. A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability[J]. Nature, 2009,460(7252):278-283.
- [13] Batram C, Baddeley D, Kreth G, et al. High precision size measurement of centromere 8 and the 8q24/c-myc gene region in metaphase and interphase human fibroblasts indicate differential condensation[J]. J Struct Biol,2008, 164(3):293-303.
- [14] Ganem NJ, Godinho SA, Pellman D. A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability[J]. Nature, 2009,460(7252):278-282.