

BGC823 和 A549 细胞染色体着丝粒点变异

何俊琳, 曹波, 王应雄

(重庆医科大学遗传优生教研室, 重庆 400016)

摘要: 癌细胞的一个显著细胞遗传学特征是染色体非整倍性畸变,但其畸变的机制至今仍然不清。因此,从与染色体分离直接相关的着丝粒点变异的角度,采用 Cd-NOR 同步银染技术对 BGC823 细胞和 A549 细胞染色体 Cd 变异进行了分析,以探索癌细胞非整倍性畸变的发生机制。结果表明:(1)BGC823 细胞染色体 Cd 缺失率为 1.75%、迟滞复制率为 0.28%、小 Cd 率为 1.82%、Cd-NOR 融合率为 0.95%,与正常人胚胎绒毛细胞染色体 Cd 相比较,BGC823 细胞染色体 Cd 缺失和 Cd-NOR 融合显著升高($P < 0.0125$),而 Cd 迟滞复制和小 Cd 两者没有显著性差异。(2)A549 细胞染色体 Cd 缺失率为 2.73%、迟滞复制率为 0.94%、小 Cd 率为 1.73%、Cd-NOR 融合率为 0.71%,与正常人胚胎绒毛细胞染色体 Cd 相比较,A549 细胞染色体 Cd 缺失和 Cd 迟滞复制显著升高($P < 0.0125$),而小 Cd 和 Cd-NOR 融合两者没有显著性差异。提示 BGC823 细胞染色体非整倍性畸变可能主要源于 Cd 缺失和 Cd-NOR 融合,而 A549 细胞染色体非整倍性畸变可能主要源于 Cd 缺失和 Cd 迟滞复制。

关键词: BGC823 细胞; A549 细胞; 着丝粒点; 非整倍性畸变

中图分类号: R730.231

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2005)06-0877-05

Study on Centromeric Dots Variation of BGC823 Cells And A549 Cells

HE Jun-Lin, CAO Bo, WANG Ying-Xiong

(Department of Genetics And Eugenics, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: Chromosomal aneuploidy was a notable cytogenetic character in cancer cells. However, the mechanism of aneuploidy aberration is not clear up to the present. In order to probe into the mechanism of aneuploidy aberration of cancer cells, centromeric dots (Cd) variation on chromosomes of BGC823 and A549 cells were studied by a simultaneous silver staining of both NOR and Cd from centromeric dots variation. The results showed that: (1) Frequency of Cd loss in BGC823 cells was 1.75%, Cd duplication laggard was 0.28%, small Cd was 1.82%, and Cd-NOR amalgamation was 0.95%. Compared to normal embryonic villi cells, frequencies of Cd loss and Cd-NOR amalgamation of BGC823 cells increased significantly ($P < 0.0125$), and that frequencies of Cd replication laggard and small Cd showed no difference between BGC823 cells and normal embryonic villi cells. (2) Frequency of Cd loss in A549 cells was 2.73%, Cd duplication laggard was 0.49%, small Cd was 1.73%, and Cd-NOR amalgamation was 0.71%. Frequencies of Cd loss and Cd replication laggard in A549 cells were significantly higher than those of normal embryonic villi cells ($P < 0.0125$), moreover frequencies of Cd-NOR amalgamation and small Cd showed no difference between A549 cells and normal embryonic villi cells. We suggested that Cd loss and Cd-NOR amalgamation might be related with aneuploidy formation of BGC823 cells, and that Cd loss and Cd replication laggard might be related with aneuploidy formation of A549 cells.

Key words: BGC823 cells; A549 cells; Centromeric dots; Aneuploidy aberration

收稿日期: 2004-12-29; 修回日期: 2005-05-15

作者简介: 何俊琳(1966—), 女, 硕士, 副教授, 研究方向: 医学遗传学。Tel: 023-68485001; Email: hejunlin_11@yahoo.com.cn

通讯作者: 王应雄(1957—), 男, 硕士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 医学遗传学。Tel: 023-68485001; Email: wyx61221@yahoo.com.cn

染色体着丝粒点(centromeric dots, 简称 Cd)又称动粒子(kinetochore), 位于染色体着丝粒区, 通过特殊的银染方法可使 Cd 被染成黑色。主要由着丝粒蛋白(centromere proteins, CENPs)和少量着丝粒区 DNA 共同构成的一个三层盘状结构^[1]。Cd 是细胞分裂时纺锤丝微管在染色体上的附着点, 与染色体分离直接相关。

在细胞分裂中, 染色体不分离或错误分离将导致细胞非整倍性畸变, 但其发生机制问题一直尚未阐明, 而癌细胞的一个显著细胞遗传学特征是染色体非整倍性畸变。曾有学者提出, 着丝粒区 Cd 缺失可能是非整倍性畸变形成的潜在根源^[2,3], Vig 曾采用抗着丝粒点抗体免疫荧光技术对肿瘤细胞染色体 Cd 变异进行了研究, 揭示其 Cd 缺失现象较为普遍, 因而提出肿瘤细胞染色体 Cd 缺失是导致其非整倍性畸变的根源所在的新机制^[4]。

鉴于国内外对恶性肿瘤细胞 Cd 变异的研究报道较少, 因此, 我们从与染色体分离直接相关的 Cd 变异角度, 采用 Cd-NOR 同步银染技术对 BGC823 和 A549 细胞染色体 Cd 变异进行分析, 以探索 Cd 变异与癌细胞染色体非整倍性畸变的关系, 对肿瘤发生的早期预防提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 细胞来源

人胃腺癌细胞株(BGC823)和人肺腺癌细胞株(A549)由重庆医科大学病理学教研室提供。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

将 BGC823 细胞和 A549 细胞在含有 10% 新生牛血清的 RPMI-1640 (invitrogen) 培养基中培养, CO₂ 5%, 饱和湿度, 培养温度 37℃。细胞处于对数生长期时备用。

1.2.2 染色体制备

BGC823 细胞和 A549 细胞经传代后培养至 48 h 加入秋水仙素(终浓度 0.2 μg/mL)处理培养物 6 h。弃掉培养液, 用 0.25% 浓度胰蛋白酶(上海生工)溶液消化细胞 3 min, 吸管轻轻吹打瓶壁使细胞脱瓶, 1000 r/min 离心 10 min 收集细胞。染色体制备按如下步骤: 收集的细胞经 0.075 mol/L 浓度的 KCl 溶液在 37℃ 条件下低渗处理 25 min, 加入 5 滴固定液(甲醇:冰醋酸, 3:1)预固定, 1000 r/min 离心

10 min, 弃掉上清液, 加入固定液 5 mL, 吸管吹打使细胞混匀, 在室温下固定 30 min, 1000 r/min 离心 10 min, 弃掉上清液, 再加入固定液 5 mL, 在室温下重复固定 20 min, 1000 r/min 离心 10 min, 弃掉上清液, 加入适量固定液制备成细胞悬液, 滴片。

正常人胚胎绒毛取自妊娠 7~12 w 孕妇人工流产绒毛, 并采用直接法制备染色体标本。

1.2.3 染色体 Cd-NOR 同步银染

制备好的染色体标本在室温下放置 10~12 d, 按我室改良的 Cd-NOR 同步银染技术制作 Cd 带标本^[5]。

1.3 Cd 变异分析标准

在正常情况下, 一条中期染色体着丝粒区存在 2 个深染的圆形小体(见图 1-a), 如果某条中期染色体着丝粒区未见圆形小体或着丝粒区边缘仅见一个, 则计为 Cd 缺失(见图 1-d); 如果在着丝粒区正中央存在一个深染小体, 则计为 Cd 迟滞复制(见图 1-c); 如果 D、G 组染色体中, 一条染色体的一个或两个 Cd 与其临近的随体区 NOR 处的银染物质混合在一起, 使两者不能相互区分, 则计为 Cd-NOR 融合(见图 1-b); 如果某条染色体 Cd 与同一核型中其它 Cd 相比, 形态小于 1/2 则计为小 Cd; 如果一条染色体上存在 2 对或 2 对以上 Cd, 则计为多重 Cd。

如果上述的任何一种情况是发生在 2 条染色体上, 则计为 2 次, 如果发生在 3 条染色体上, 则计为 3 次, 依此类推。

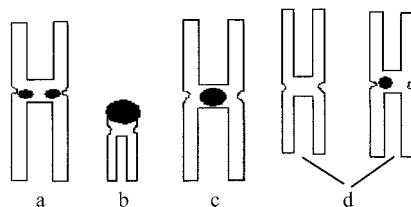


图 1 Cd 分析标准模式图

a. 正常 Cd b. Cd-NOR 融合 c. Cd 迟滞复制 d. Cd 缺失

Fig.1 Standard mode figure of Cd analysis

a. Normal Cd b. Cd-NOR amalgamation
c. Cd replication laggard d. Cd loss

1.4 统计学方法

实验数据采用多个样本率 χ^2 检验, 检验标准 $\alpha = 0.05$, 如 $P < 0.05$, 两个样本率间(实验组与对照组间)的比较用 χ^2 分割法, 检验水准 $\alpha' = \alpha/2 (K$

-1)=0.0125。采用 SPSS11.0 统计软件对实验数据进行处理。

2 结果

本研究所分析的 BGC823 细胞和 A549 细胞是典型的非整倍性细胞群,其染色体数目从 13 条至 157 条变化,而大部分染色体数目集中于 52 条至 76 条之间。

2.1 BGC823 细胞染色体 Cd 变异分析结果

分析 BGC823 细胞染色体分裂相 328 个,共计 20142 条染色体,检出 Cd 缺失染色体 352 条(占 1.75%)、Cd 迟滞复制染色体 56 条(占 0.28%)、Cd-NOR 融合染色体 191 条(占 0.95%)、小 Cd 染色体 366 条(占 1.82%)。分析正常人胚胎绒毛细胞染色体分裂相 367 个,共计 16882 条染色体,检出 Cd 缺失染色体 42 条(占 0.25%)、Cd 迟滞复制染色体 29 条(占 0.17%)、Cd-NOR 融合染色体 85 条(占 0.50%)、小 Cd 染色体 280 条(占 1.66%)(见表 1)。两组相比较,BGC823 细胞染色体 Cd 缺失和 Cd-

NOR 融合发生率显著升高($P < 0.0125$),而 Cd 迟滞复制和小 Cd 没有显著性差异(见表 2)。

2.2 A549 细胞染色体 Cd 变异分析结果

分析 A549 细胞染色体分裂相 291 个,共计 17156 条染色体,检出 Cd 缺失染色体 468 条(占 2.73%)、Cd 迟滞复制染色体 161 条(占 0.94%)、Cd-NOR 融合染色体 121 条(占 0.71%)、小 Cd 染色体 297 条(占 1.73%)。分析正常人胚胎绒毛细胞染色体分裂相 367 个,共计 16882 条染色体,检出 Cd 缺失染色体 42 条(占 0.25%)、Cd 迟滞复制染色体 29 条(占 0.17%)、Cd-NOR 融合染色体 85 条(占 0.50%)、小 Cd 染色体 280 条(占 1.66%)(见表 1)。两组相比较,A549 细胞染色体 Cd 缺失和 Cd-NOR 迟滞复制发生率显著升高($P < 0.0125$),而 Cd-NOR 融合和小 Cd 没有显著性差异(见表 2)。

2.3 多重 Cd 变异

我们在 2 个 BGC823 细胞和 1 个 A549 细胞中还观察到存在多重 Cd 现象(见图 4),这种现象在非癌细胞中是极其罕见的。

表 1 BGC823 细胞、A549 细胞与正常人胚胎绒毛细胞染色体 Cd 缺失、Cd 迟滞复制、Cd-NOR 融合、小 Cd 比较

Table 1 Comparison on Cd variation of Cd loss, Cd replication laggard, Cd-NOR amalgamation and small Cd between BGC823 cells, A549 cells and human normal embryonic villi

	分裂相计数 Metaphase Number	染色体计数 Chromosome Number	Cd 缺失 Cd Loss	Cd 迟滞复制 Cd Replication Laggard	Cd-NOR 融合 Cd-NOR Amalgamation	小 Cd Small Cd
BGC823	328	20142	352(1.75%)	56(0.28%)	191(0.95%)	366(1.82%)
A549	291	17156	468(2.73%)	161(0.94%)	121(0.71%)	297(1.73%)
Embryonic villi cells	367	16882	42(0.25%)	29(0.17%)	85(0.50%)	280(1.66%)

表 2 实验组与对照组之间统计分析(χ^2 检验)

Table 2 Statistical analysis(χ^2 test) between experimental groups and control

	Cd 缺失 Loss	Cd 迟滞复制 Cd Replication Laggard	Cd-NOR 融合 Cd-NOR Amalgamation	小 Cd Small Cd
三组比较 (Compared BGC823, A549 with the control)	$P < 0.05$	$P < 0.05$	$P < 0.05$	$P > 0.05$
BGC823 与对照组 (Compared BGC823 with the control)	$P < 0.0125$	$P > 0.0125$	$P < 0.0125$	$P > 0.05$
A549 与对照组 (Compared A549 with the control)	$P < 0.0125$	$P < 0.0125$	$P > 0.0125$	$P > 0.05$

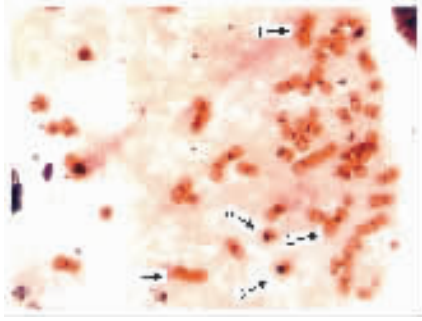


图2 BGC823 细胞 Cd 变异

1: Cd 缺失; 2: Cd 迟滞复制; 3: Cd-NOR 融合。

Fig.2 Centromeric dots(Cd) variation of BGC823 cells

1: Cd loss; 2: Cd replication laggard; 3: Cd-NOR amalgamation.

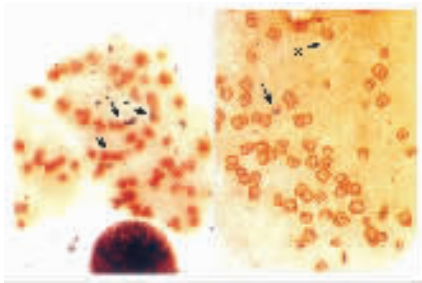


图3 A549 细胞 Cd 变异

1: Cd 缺失; 2: Cd 迟滞复制; 3: Cd-NOR 融合。

Fig.3 Centromeric dots(Cd) variation of A549 cells

1: Cd loss; 2: Cd replication laggard; 3: Cd-NOR amalgamation.

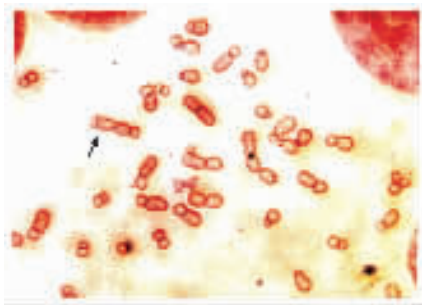


图4 多重 Cd 变异

箭头示多重 Cd 变异。

Fig.4 Multiple centromeric dots(Cd) variation

Arrow indicates multiple centromeric dots variation.

3 讨论

恶性肿瘤细胞染色体非整倍性畸变机制至今尚不清楚。Zhang 提出“着丝粒爆开”导致染色单体期外分离是其形成途径之一^[6],但从染色体 Cd 变异角度来探索肿瘤细胞非整倍性畸变机制的报道尚不

多见。Vig, Paweletz, Abrieu 及 Leocadia 等^[4,7~9]报道染色体 Cd 是纺锤体微管附着、运动和细胞周期监控的重要结构区,是染色体能否正常分离的基本结构,无 Cd 结构的染色体其着丝粒功能失活,不能被纺锤丝微管附着,造成分裂中期纺锤丝微管不能将染色单体牵引至赤道板两极,使分裂后期染色体不能正常向两极移动而导致染色体不分离或错误分离,从而形成非整倍性畸变。此外,对一些非癌细胞染色体 Cd 变异的研究也提示,染色体 Cd 缺失的中期染色体易于在分裂后期形成非整倍性畸变^[2,3]。本文对 BGC823 细胞和 A549 细胞染色体 Cd 变异分析表明,其 Cd 缺失较为普遍,而这种现象在非癌细胞中是极其罕见的^[10],这提示 BGC823 细胞和 A549 细胞高频率的 Cd 缺失可能与其非整倍性畸变相关。

以往在非癌细胞染色体 Cd 研究中曾提出 Cd 迟滞复制会增加非整倍性畸变风险,我们在 A549 细胞中发现存在高频率的 Cd 迟滞复制现象,对其可能造成的后果我们作如下解释:由于 Cd 迟滞复制导致中期染色体着丝粒区仅存在一个单一 Cd 结构,其结果是分裂后期纺锤丝微管不能将两条姊妹染色单体正常分离,最终造成两条染色单体进入同一细胞或发生丢失而形成非整倍性畸变。

“Cd-NOR”融合(即 D、G 组染色体 NOR 银染物质与其临近的 Cd 结构混合在一起)是我们过去在非癌细胞 Cd 研究中首次提出的一种新的细胞遗传学现象^[10]。我们认为 Cd 与 NOR 银染物质的混合可能对纺锤丝微管与 Cd 之间的联系产生一定的干扰和阻碍作用,从而引起染色体非整倍性畸变。本文研究的 BGC823 细胞存在高频率的“Cd-NOR”融合现象,我们认为“Cd-NOR”融合可能是造成该癌细胞非整倍性畸变的途径之一。

在我们所研究的这两种癌细胞株中没有发现小 Cd 频率显著升高,但不排除小 Cd 会影响附着于染色体上的微管数量,进而影响纺锤丝微管对赤道板上染色体的平衡牵引,最终导致非整倍性畸变的发生^[11]。

在非癌细胞中见到的双着丝粒或多着丝粒染色体往往只在其中一个着丝粒区存在 Cd 结构,没有 Cd 结构的着丝粒不能被纺锤丝微管附着,因而这类染色体能够比较稳定地在细胞世代间传递。而在本研究中,观察到某些 BGC823 细胞和 A549 细胞染色

体存在多重 Cd 现象,具有多重 Cd 结构的染色体往往不稳定,这是由于分裂后期时,附着于多重 Cd 上的纺锤丝微管可能会因其向两极的走向不同而形成“后期桥”,结果易于造成染色体断裂而形成新的结构异常染色体。由于多重 Cd 现象在非癌细胞中极其罕见,它是否可作为癌细胞的一种细胞遗传学标记尚待更进一步的证实。

Saunders 等^[12]采用免疫组织化学和细胞遗传学技术分析了口腔癌细胞染色体分离,发现在细胞分裂过程中,其 Cd 蛋白成分缺陷,使纺锤丝微管对染色体的捕获失败或造成排列障碍,从而导致染色体不分离、丢失或分裂后期迟滞,引起染色体非整倍性畸变的产生。Cd 是蛋白质和 DNA 复合结构,受特定基因控制合成,因而任何能导致这些基因活性改变或突变的因素都可能引起 Cd 蛋白合成障碍而出现 Cd 变异状况。某些癌细胞的非整倍性畸变可能涉及到 Cd 变异的一种或几种情况,但并非癌细胞的所有非整倍性畸变都涉及 Cd 变异,或许还涉及到其它一些途径,如着丝粒爆开、纺锤体异常、姊妹染色单体迟滞分离等。

细胞癌变是一个相当复杂的生物学过程,非整倍性畸变是恶性肿瘤细胞的显著细胞遗传学特征,其机制尚未阐明,它是肿瘤发生的原因还是结果,目前也尚无定论,Fabarius 等^[13]认为非整倍性畸变是诱发肿瘤产生的重要因素。我们现在虽不能就此断言 Cd 的这些变异是癌细胞必定出现的标记特征,但从与染色体分离直接相关的 Cd 角度来探索癌细胞非整倍性畸变的发生机制是有意义的,这对肿瘤早期诊断及预防有一定的参考价值。

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 Funct*, 2000, 25(4): 253 ~ 261.
- [2] WANG Ying-Xiong, WENG Ya-Guang, ZHANG Xiang-Shu, WU Chun-Ying, ZHENG Zeng-Chun, ZHOU Ming-Juan, GU Mei-Li. Study on centromeric dots of aneuploid patients and their parents. *Chinese Journal of Medical Genetics*, 1992, 9(3): 146 ~ 150.
- [3] WANG Ying-Xiong, WENG Ya-Guang, HE Jun-Lin, LIU Xue-Qing, ZHENG Zeng-Chun. Study on centromeric dots variation of chorion tissue. *Hereditas (Beijing)*, 1995, 17(2): 1~3.
- [4] WANG Ying-Xiong, WENG Ya-Guang, ZHANG Xiang-Shu, ZHENG Zeng-Chun, ZHOU Ming-Juan, GU Mei-Li. A study on centromeric dots (Cd) of human chromosomes. *Hereditas (Beijing)*, 1991, 13(4): 27~29, 32.
- [5] WANG Ying-Xiong, WENG Ya-Guang, ZHANG Xiang-Shu, ZHENG Zeng-Chun, ZHOU Ming-Juan, GU Mei-Li. A study on centromeric dots (Cd) of human chromosomes. *Hereditas (Beijing)*, 1991, 13(4): 27~29, 32.
- [6] WANG Ying-Xiong, WENG Ya-Guang, ZHANG Xiang-Shu, ZHENG Zeng-Chun, ZHOU Ming-Juan, GU Mei-Li. A study on centromeric dots (Cd) of human chromosomes. *Hereditas (Beijing)*, 1991, 13(4): 27~29, 32.
- [7] WANG Ying-Xiong, WENG Ya-Guang, ZHANG Xiang-Shu, ZHENG Zeng-Chun, ZHOU Ming-Juan, GU Mei-Li. A study on centromeric dots (Cd) of human chromosomes. *Hereditas (Beijing)*, 1991, 13(4): 27~29, 32.
- [8] WANG Ying-Xiong, WENG Ya-Guang, ZHANG Xiang-Shu, ZHENG Zeng-Chun, ZHOU Ming-Juan, GU Mei-Li. A study on centromeric dots (Cd) of human chromosomes. *Hereditas (Beijing)*, 1991, 13(4): 27~29, 32.
- [9] WANG Ying-Xiong, WENG Ya-Guang, ZHANG Xiang-Shu, ZHENG Zeng-Chun, ZHOU Ming-Juan, GU Mei-Li. A study on centromeric dots (Cd) of human chromosomes. *Hereditas (Beijing)*, 1991, 13(4): 27~29, 32.
- [10] WANG Ying-Xiong, WENG Ya-Guang, ZHANG Xiang-Shu, ZHENG Zeng-Chun, ZHOU Ming-Juan, GU Mei-Li. A study on centromeric dots (Cd) of human chromosomes. *Hereditas (Beijing)*, 1991, 13(4): 27~29, 32.
- [11] WANG Ying-Xiong, WENG Ya-Guang, ZHANG Xiang-Shu, ZHENG Zeng-Chun, ZHOU Ming-Juan, GU Mei-Li. A study on centromeric dots (Cd) of human chromosomes. *Hereditas (Beijing)*, 1991, 13(4): 27~29, 32.
- [12] WANG Ying-Xiong, WENG Ya-Guang, ZHANG Xiang-Shu, ZHENG Zeng-Chun, ZHOU Ming-Juan, GU Mei-Li. A study on centromeric dots (Cd) of human chromosomes. *Hereditas (Beijing)*, 1991, 13(4): 27~29, 32.
- [13] WANG Ying-Xiong, WENG Ya-Guang, ZHANG Xiang-Shu, ZHENG Zeng-Chun, ZHOU Ming-Juan, GU Mei-Li. A study on centromeric dots (Cd) of human chromosomes. *Hereditas (Beijing)*, 1991, 13(4): 27~29, 32.