

# 人绒毛癌细胞 JEG-3 和人卵巢畸胎瘤细胞 PA-1 染色体着丝粒点变异的研究

## Study on Centromeric Dots Variation in JEG-3 Cells and PA-1 Cells

CAO Bo, WEN Sha-luo

(The Maternity and Child Health Hospital of Panzhihua, Sichuan 617000, China)

曹波/温沙洛

(四川省攀枝花市妇幼保健院, 四川 攀枝花 617000)

**【摘要】**背景与目的: 探讨染色体着丝粒点 (Cd) 的变异与人绒毛癌细胞 JEG-3 和人卵巢畸胎瘤细胞 PA-1 染色体非整倍性畸变的关系。材料与方法: 肿瘤细胞株传代后用常规方法制备染色体, 用直接法制备胚胎绒毛细胞染色体标本, 采用 Cd-NOR 同步银染分析技术研究 JEG-3 细胞和 PA-1 细胞染色体 Cd 的变异。结果: JEG-3 细胞染色体 Cd 缺失率为 1.43%、Cd 迟滞复制率为 0.21%、小 Cd 率为 1.52%、Cd-NOR 融合率为 1.16%、与正常人胚胎绒毛细胞染色体 Cd 相比较, JEG-3 细胞染色体 Cd 缺失、Cd-NOR 融合率显著升高 ( $P < 0.0125$ ), 而与小 Cd、Cd 迟滞复制率间差异无统计学意义 ( $P > 0.0125$ )。PA-1 细胞染色体 Cd 缺失率为 1.22%、Cd 迟滞复制率为 0.95%、小 Cd 率为 1.81%、Cd-NOR 融合率为 1.03%、与正常人胚胎绒毛细胞染色体 Cd 相比较, PA-1 细胞染色体 Cd 缺失率、Cd 迟滞复制率、Cd-NOR 融合率均显著升高 ( $P < 0.0125$ ), 而与小 Cd 的差异无统计学意义 ( $P > 0.0125$ )。结论: JEG-3 细胞染色体非整倍性畸变可能主要与 Cd 缺失、Cd-NOR 融合有关, PA-1 细胞染色体非整倍性畸变可能主要与 Cd 缺失、Cd 迟滞复制和 Cd-NOR 融合有关。

**【关键词】**肿瘤细胞; 着丝粒点; 非整倍性畸变

中图分类号: Q343.2<sup>+</sup>44

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2008)01-0064-04

**【ABSTRACT】** BACKGROUND AND AIM: To study the relation between the centromeric dots (Cd) variation in JEG-3 cells and PA-1 cells and the chromosome aneuploidy aberration. MATERIALS AND METHODS: Chromosome of tumor cells were prepared with conventional method, chromosome of normal embryonic villi were treated directly. A Cd-NOR in-phase silver dye analysis technique modified by this laboratory was used to study centromeric dots (Cd) variation of JEG-3 cells and PA-1 cells. RESULTS: Frequency of Cd loss in JEG-3 cells was 1.43%, frequency of Cd duplication delay was 0.21%, frequency of small Cd was 1.52% and that of Cd-NOR fusion was 1.16%. Frequencies of Cd loss and Cd-NOR fusion in JEG-3 cells were significantly higher than those of normal embryonic villi ( $P < 0.0125$ ). Frequency of Cd duplication delay and small Cd showed no difference between JEG-3 cells and normal embryonic villi cells. Frequency of Cd loss in PA-1 cells was 1.22%, of Cd duplication delay was 0.95%, of small Cd was 1.81%, and that of Cd-NOR fusion was 1.03%. Frequencies of Cd loss, Cd duplication delay and Cd-NOR fusion in PA-1 cells were significantly higher than those of normal embryonic villi cells ( $P < 0.0125$ ). Frequency of small Cd showed no difference between PA-1 cells and normal embryonic villi. CONCLUSION: Cd loss and Cd-NOR fusion might be related with aneuploidy aberration of JEG-3 cells. Cd loss, Cd duplication delay and Cd-NOR fusion might be related with aneuploidy aberration of PA-1 cells.

**【KEY WORDS】** tumor cells; centromeric dots; aneuploidy aberration

收稿日期: 2007-05-31; 修订日期: 2007-09-18

作者简介: 曹波 (1972-), 男, 四川省阆中市人, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向: 妇科肿瘤。

染色体着丝粒点(kinetochores 或 centromeric dots, 简称 Cd) 又称动粒子, 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。其主要由蛋白质成份(centromere protein, CENP) 和少量的着丝粒区 DNA 共同构成一个三层盘状结构<sup>[1]</sup>。染色体 Cd 是细胞分裂中纺锤丝微管在染色体上的附着点, 与染色体分离直接相关<sup>[2-3]</sup>。

着丝粒区 Cd 缺失可能是非整倍体形成的潜在根源<sup>[4-5]</sup>, 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。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, 但其机制尚不清楚。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研究, 揭示了其 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新机制<sup>[6-9]</sup>。

鉴于国内外对恶性肿瘤细胞 Cd 变异的研究报道较少, 因此, 我们采用 Cd-NOR 同步银染技术对人绒毛癌细胞 JEG-3、人卵巢畸胎瘤细胞 PA-1Cd 变异进行了分析, 以探索 Cd 变异与癌细胞染色体非整倍性畸变的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞

JEG-3 细胞株和 PA-1 细胞株均购自重庆医科大学病理生理学教研室。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 将 JEG-3 细胞和 PA-1 细胞分别用含 10% 新生牛血清的 RPMI-1640 培养液, 置于 5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度、37 °C 培养箱中培养, 细胞处于对数生长期时备用。

**1.2.2 染色体的制备** JEG-3 细胞株和 PA-1 细胞株经传代后培养 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% 胰蛋白酶溶液消化细胞 3 min, 吸管轻轻吹打使其细胞脱壁, 1 000 r/min 离心 10 min 收集细胞。染色体制备按常规方法。正常人胚胎绒毛组织取自妊娠 7~12 周孕妇人工流产绒毛, 并用直接法制备染色体标本。

**1.2.3 染色体的 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 Cd-NOR 同步银染技术制作 Cd 带标本。

**1.2.4 Cd 变异分析标准** 在正常情况下, 1 条中期染色体着丝粒区存在 2 个深染的圆形小体(见图 1a)。如果 D、G 组染色体中, 1 条染色体的 1 个或 2 个 Cd 与染色体随体区 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 1b)。如果在着丝粒区正中央存在 1 个深染小体, 则计为 Cd 迟滞复制或单 Cd(见图 1c)。如果某条中期染色体着丝粒区未见圆形小体或在着丝粒区边缘仅见 1 个, 则计为 Cd 缺失(见图 1d)。如果某条染色体 Cd 结构与其他染色体 Cd 结构相比, 形态显得特别小, 小于 1/2 则计为小 Cd。如果同一条中期染色体上存在 2 对或 2 对以上的深染圆形小体, 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, 依次类推。

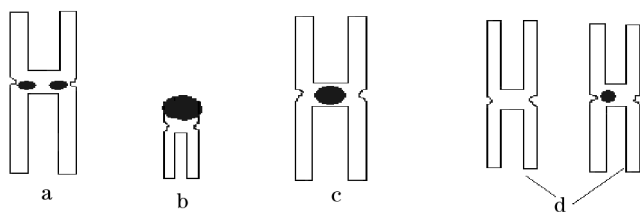


图 1 Cd 分析标准模式图

Figure 1 Figure of Cd analyzed standard mode

A normal Cd; b: Cd-NOR amalgamation; c: Cd duplication; d: Cd loss

### 1.3 统计学方法

实验数据采用多个样本率  $\chi^2$  检验,  $\alpha = 0.05$  为检验水准, 两个样本率间的比较用  $\chi^2$  分割法, 检验水准  $\alpha' = \alpha / (K - 1) = 0.0125$ 。采用 SPSS11.0 统计软件对数据进行分析处理。

## 2 结果

本研究分析的 JEG-3 细胞、PA-1 细胞是典型的非整倍性细胞群, 其染色体数目变化从 10~150 多条, 而大部分集中于 50~70 几条。

### 2.1 JEG-3 细胞、Cd 变异与人胚胎绒毛细胞染色体 Cd 变异的比较

结果见表 1 和图 2。与人胚胎绒毛细胞相比, JEG-3 细胞染色体 Cd 缺失、Cd-NOR 融合显著升高, 经  $\chi^2$  检验, 两组之间差别有统计学意义 ( $P < 0.0125$ ), 而小 Cd、Cd 迟滞复制两者间差异无统计学意义 ( $P > 0.0125$ )。

### 2.2 PA-1 细胞与人胚胎绒毛细胞染色体 Cd 变异的比较

结果见表 1 和图 3。与人胚胎绒毛细胞相比, PA-1 细胞染色体 Cd 缺失、Cd 迟滞复制、Cd-NOR 融合显著升高, 经  $\chi^2$  检验, 两组之间差别有统计学意义 ( $P < 0.0125$ ), 而小 Cd 其差异无统计学意义 ( $P > 0.0125$ )。

表 1 JEG-3细胞、PA-1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 centromeric dots(Cd) variation of Cd loss, Cd duplication laggard, Cd-NOR amalgamation and little Cd between JEG-3 cells PA-1 cells and human normal embryonic villi cells

Cell type	Metaphase aberration	Chromosomal	Type of Cd variation			
			Cd loss	Cd duplication laggard	Cd-NOR amalgamation	Little cd
JEG-3 cells	595	37485	536(1.43%)*	79(0.21%)	435(1.16%)*	570(1.52%)
PA-1 cells	649	38291	467(1.22%)*	364(0.95%)*	394(1.03%)*	693(1.81%)
Normal embryonic villi cells	367	16882	42(0.25%)	29(0.17%)	85(0.50%)	280(1.66%)

Compared with human normal embryonic villi cell group, \*P < 0.0125.

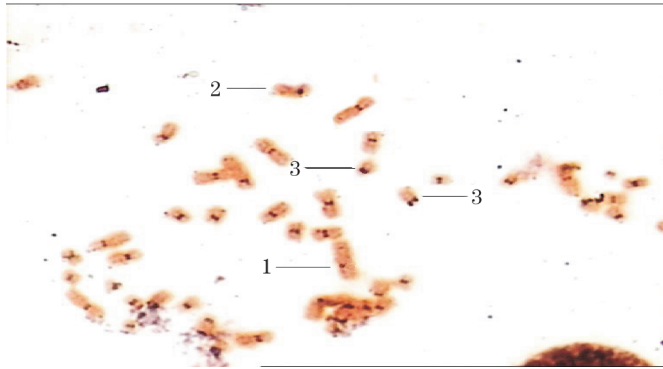


图 2 JEG-3细胞 Cd 变异图

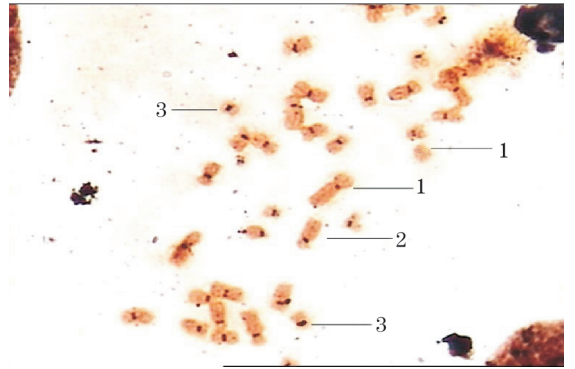


图 3 PA-1细胞 Cd 变异图

Figure 2 Figure of centromeric dots(Cd) variation of JEG-3 cells twain small macula in centromere Figure 3 Figure of centromeric dots (Cd) variation of PA-1 cells

1 Cd loss ; 2 Cd duplication laggard ; 3 Cd-NOR amalgamation normal Cd are twain small macula in centromere

### 3 讨论

恶性肿瘤细胞染色体非整倍性畸变机制尚不清楚，Cervantes MD 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<sup>[3]</sup>，但从染色体 Cd 变异角度来探讨肿瘤细胞非整倍性畸变机制的报道尚不多见，Sugimoto K 等报道<sup>[1-4, 11]</sup>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，不能被纺锤丝附着，造成分裂中期纺锤丝微管不能附着于染色体上，不能将染色单体牵引至赤道板两极，在细胞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<sup>[12]</sup>。对一些非癌细胞染色体 Cd 变异的研究提示：Cd 缺失的中期染色体易于在分裂后期形成非整倍性畸变<sup>[6, 13]</sup>。对 JEG-3 细胞、PA-1 细胞的染色体 Cd 分析表明，恶性肿瘤细胞 Cd 缺失较为普遍(分别见图 2, 图 3)，而这种现象在非肿瘤细胞中是极其少见的<sup>[13-14]</sup>。这提示在 JEG-3 细胞和 PA-1 细胞中，存在高频率的 Cd 缺失可能与其非整倍性畸变有关。

过去在非癌细胞染色体 Cd 研究中曾提出 Cd 迟滞复制会增加非整倍性畸变风险<sup>[13-14]</sup>，在 PA-1 细胞中 Cd 迟滞复制较为普遍(见图 3)。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，单 Cd 的出现对染色单体的正常分离有一定影响，其结果是分裂后期时纺锤体微管便不能将两条姊妹染色单体正常分开，两条染色单体进入同一细胞或有的染色单体发生丢失，即形成非整倍性畸变。

“Cd-NOR 融合”(即 D、G 组染色体 NOR 银染物质与其邻近的 Cd 结构混合在一起)，是 Fabarius A 等在非癌细胞 Cd 研究中提出的一种新的细胞遗传现象<sup>[13-14]</sup>，Cd-NOR 融合将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，本文研究的 JEG-3 细胞和 PA-1 细胞染色体的 Cd-NOR 融合频率显著升高(见图 2, 图 3)，可能是引起该癌细胞染色体非整倍性畸变的途径之一。

癌细胞存在小 Cd 结构，小 Cd 结构会影响附着于染色体上的纺锤丝微管数量，其上附着的纺锤丝微管数目也相应较少<sup>[15]</sup>，结果很难维持纺锤丝微管对赤道板上染色体的平衡牵引，最终引起染色体非整倍性畸变。

在非肿瘤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，这类染色体能比较稳定地在细胞世代间相传。本研究中，观察到某些 JEG-3 细胞、PA-1 细胞染色体上存在多重 Cd 现象，具有多重 Cd 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异常染色体。由于多重 Cd 现象在非癌细胞中极为罕见，那么，多重 Cd 染色体能否作为癌细胞的一种细胞遗传学标记特征有待更进一步证实。

Saunders 等<sup>[16]</sup>用免疫组织化学与传统细胞遗传学分析方法研究口腔癌细胞的染色体分离，发现在细胞分裂过程中，Cd 蛋白成分的缺陷，使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、丢失或在中期和后期的迟滞，引起染色体非整倍性畸变的产生。提示了染色体 Cd 结构改变可能会增加染色体不分离风险，从而导致非整倍体的发生。Cd 是蛋白质性复合结构，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基因突变的因素都可能引起 Cd 蛋白合成障碍而出现 Cd 结构变异现象。某些癌细胞的非整倍性畸变可能仅涉及 Cd 变异的一种或几种。Cd 缺失是诱发细胞非整倍性畸变的潜在因素，这一点已得到共识。癌细胞中高频率的 Cd 缺失、Cd 迟滞复制、小 Cd 和 Cd-NOR 融合提示了 Cd 的这些变异可能是癌细胞非整倍性畸变产生的途径之一。并非所有非整倍体畸变都一定与 Cd 变异有关，或许还涉及其他一些途径，如着丝粒爆开、纺锤体异常、染色单体迟滞分离等。我们虽还不能就此将 Cd 的这些变异确定为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 结构角度来探索癌细胞非整倍性畸变机制是有意义的。

因而对恶性肿瘤细胞进行染色体 Cd 结构变化的分析，将染色体 Cd 变异分析用于肿瘤的早期诊断及预后的评估将具有一定的参考价值。

### 参考文献:

- [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[J]. Cell Struct Funct, 2000, 25(4): 253-261.
- [2] Cui B, Gorovsky MA. Centromeric histone H3 is essential for vegetative cell division and for DNA elimination during conjugation in *Tetrahymena thermophila*[J]. Mol Cell Biol, 2006, 26(12): 4499-4510.
- [3] Cervantes MD, Xi X, Vermaak D, et al. The CNA1 histone of the ciliate *tetrahymena thermophila* is essential for chromosome segregation in the germline micronucleus[J]. Mol Biol Cell, 2006, 17(1): 485-497.
- [4] Sugata N, Li S, Earnshaw WC, et al. Human CENP-H multimers colocalize with CENP-A and CENP-C at active centromeric-kinetochore complexes[J]. Hum Mol Genet, 2000, 9(19): 2919-2926.
- [5] 刘京升, 郭森, 李效良, 等. 着丝点结构变异与消失对非整倍体细胞形成的影响[J]. 泰山医学院学报, 2003, 29(3): 45-50.
- [6] 焦海燕, 杜婧, 彭亮, 等. 非整倍体患者及其双亲染色体动粒结构的相关性研究[J]. 宁夏医学院学报, 2003, 19(1): 18-22.
- [7] 吴家璐, 李龙芸. 应用 7、8 号人染色体着丝粒特异探针和 FISH 技术检测胸腔积液中的超二倍体肿瘤细胞[J]. 癌症进展, 2005, 17(5): 289-294.
- [8] 曹波, 王应雄. HepG2 细胞染色体着丝粒点变异的研究[J]. 癌变·畸变·突变, 2004, 16(6): 335-337.
- [9] 何俊琳, 曹波, 王应雄. BGC823 和 A549 细胞染色体着丝粒点(Cd)变异[J]. 遗传, 2005, 17(6): 877-881.
- [11] Xue biao yao, Ariane Abrieu, Yun Zheng et al. CENP-E forms a link between attachment of spindle microtubules to kinetochores and the mitotic checkpoint[J]. Nature cell biology, 2000, 251(2): 484-491.
- [12] Leocadia V, Paliulis R, Bruce N. The Reduction of Chromosome Number in Meiosis Is Determined by Properties Built into the Chromosomes[J]. J Cell Biology, 2000, 150(6): 1223-1231.
- [13] Fabarius A, Willer A, Yerganian G, et al. Specific aneusomies in Chinese hamster cells at different stages of neoplastic transformation initiated by nitrosomethylurea[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(10): 6778-6783.
- [14] 刘京昇, 李效良, 魏成芳, 等. 染色体着丝点结构变化与习惯性流产的关系[J]. 遗传, 2003, 25(4): 393-395.
- [15] 罗松, 林海燕, 齐建国, 等. 利用正义和反义技术研究着丝粒/动粒复合体蛋白 CENP-B 在细胞周期调控中的作用[J]. 科学通报, 2005, 21(5): 531-536.
- [16] Saunders WS, Shuster M, Huang X, et al. Chromosomal instability and cytoskeletal defects in oral cancer cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(1): 303-308.

