

机制研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001763

骨肉瘤细胞中 H3K79me_{2,3} 参与有丝分裂期调控的研究

何衍信, 戴 威, 李浩可, 尹 凤, 赵 圆, 高彦飞, 邓忠良

(重庆医科大学附属第二医院骨科, 重庆 400016)

【摘要】目的:为了研究组蛋白 3 第 79 位赖氨酸二甲基化和三甲基化(H3K79me_{2,3})水平在骨肉瘤细胞有丝分裂期的变化及对有丝分裂期进程的影响。**方法:**利用细胞周期同步化方法,观察骨肉瘤细胞 U2OS 在有丝分裂期前中期到有丝分裂期各阶段 H3K79me_{2,3} 水平的变化;并用特异性抑制剂 EPZ5676 抑制 H3K79 甲基化水平,用 Western blot 及活细胞荧光激光共聚焦检测其对有丝分裂期进程的影响。**结果:**在骨肉瘤细胞 U2OS 中,H3K79me_{2,3} 水平在有丝分裂期前中期下降,并随着细胞出有丝分裂期,H3K79me_{2,3} 水平逐渐增加,使用抑制剂进一步降低其在有丝分裂期的水平并抑制其随后的增加,对有丝分裂期中期到后期的转化过程影响不明显,但会引起姐妹染色单体分离错误出现的比例增高($\chi^2=4.99, P=0.026$)。**结论:**H3K79me_{2,3} 水平在骨肉瘤有丝分裂期前中期降低,并随着细胞出有丝分裂期逐渐升高,这种变化可能与确保姐妹染色单体正确分离的相关调控有关。

【关键词】H3K79me_{2,3};骨肉瘤;有丝分裂期**【中图分类号】**R34**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-01-18Investigation of the role of H3K79me_{2,3} on mitotic progression in osteosarcoma cells

He Yanji, Dai Wei, Li Haoke, Yin Feng, Zhao Yuan, Gao Yanfei, Deng Zhongliang

(Department of Orthopedics, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To determine the H3K79me_{2,3} level in osteosarcoma cells during mitosis and to investigate its potential influence on mitotic progression. **Methods:** Western blot was used to detect the H3K79me_{2,3} level in osteosarcoma cells after mitotic synchronization. Time-lapse imaging was performed with a laser confocal fluorescence microscope to monitor the mitotic progression of U2OS cells with or without inhibitor EPZ5676. **Results:** The H3K79me_{2,3} level in osteosarcoma cells declined in the prometaphase and then increased gradually with mitosis exit. Depletion of H3K79me_{2,3} and the following increase caused an increase in the percentage of chromosome missegregation, with no significant effect on the kinetics of mitosis exit ($\chi^2=4.99, P=0.026$). **Conclusion:** The H3K79me_{2,3} level shows variations during mitosis in osteosarcoma cells and is related to the regulation of chromosome segregation.

【Key words】H3K79me_{2,3}; osteosarcoma; mitosis

骨肉瘤是一种起源于间叶组织的恶性肿瘤,好发于儿童和青少年的长骨干骺端,具有恶性程度高、侵袭性强、易复发和易发生早期远处转移的特点^[1]。细胞周期调控紊乱导致的肿瘤细胞异常增殖以及染色体异倍体的出现是各种恶性肿瘤的共同生物学特征,有丝分裂期的精细调控在防止出现上

述 2 种错误中发挥着重要作用^[2]。因此,研究骨肉瘤细胞的有丝分裂期调控及其相关分子基础不仅可以在分子层面阐明骨肉瘤的发生机制,还可以为临床骨肉瘤早期诊断及治疗方案提供理论基础。

纺锤体组装检查点(spindle assembly checkpoint, SAC)作为细胞周期最关键的监控机制,保证了细胞周期正常有序进行以及基因组稳定地在母代与子代之间遗传^[3]。研究表明,与 SAC 有关的有丝分裂期的相关调控不仅与细胞周期相关基因有关,还与组蛋白的翻译后修饰密切相关^[4-5]。相关报道证明组蛋白 3 的第 79 位赖氨酸的甲基化(H3K79me_{2,3})与细

作者介绍:何衍信, Email: heyxj0412@163.com,

研究方向:骨肉瘤的研究和治疗。

通信作者:邓忠良, Email: guke_lab@163.com。

基金项目:国家自然科学基金青年基金资助项目(编号:C050201)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180528.0951.006.html>

(2018-05-29)

胞周期调控有关^[6-8]。Feng 等^[9]研究表明,在宫颈癌 HeLa 细胞中,H3K79me_{2,3} 水平在 G₂ 期降低,在有丝分裂期升高;在 Kim 等^[10]的研究中,肺癌细胞 A549 中 H3K79me₂ 水平在 G₂/M 期下降,而其 H3K79me₃ 水平在整个细胞周期中无明显变化;Guppy 等^[11]研究则发现,在结肠癌细胞 HCT116 中,H3K79me₂ 在细胞周期中有丝分裂期早期升高,在有丝分裂期后期下降。H3K79 的甲基化水平在不同组织来源细胞系中调节方式不同,显示其对细胞周期的调控可能发挥不同的作用。而 H3K79 的甲基化水平在骨肉瘤细胞有丝分裂期中的变化情况及其对丝分裂期进程的影响仍不清楚,需要进一步探索。因此本文采用细胞周期同步化方法,观察将骨肉瘤细胞系 U2OS 细胞从有丝分裂期前中期到出有丝分裂期各个阶段 H3K79me_{2,3} 的水平变化;并用特异性抑制剂 EPZ5676 抑制 H3K79 甲基化在有丝分裂期水平,用 Western blot 及活细胞荧光激光共聚焦技术检测对骨肉瘤细胞有丝分裂期进程的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

U2OS 及 MG63 细胞株购于中国科学院上海细胞库。高糖 DMEM 培养基、MEM 培养基、0.25% 胰蛋白酶购于 Hyclone 公司。一抗 H3K79me₂、H3K79me₃ 购于 CST 公司;一抗 Cdc27 (SC-13154)、Cyclin B1 (SC-752)、Cyclin A (SC-751)、Tubulin (SC-166729)、H3 (SC-8654)、GAPDH (SC-166574) 购于 Santa Cruz 公司;二抗为辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG (ZB-2305) 以及辣根酶标记山羊抗兔 IgG (ZB-2301), 购于北京中杉金桥公司;EPZ5676 购于 Selleck;DMSO 及 Nocodazole 购于 Sigma 公司。

1.2 细胞培养

U2OS 细胞均采用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养;MG63 细胞采用含 10% 胎牛血清、0.11 g/L 丙酮酸钠的 MEM 培养基培养。所有细胞均置于 37 °C 恒温和 5% CO₂ 气体的饱和湿度培养箱中。

1.3 细胞同步化

细胞接种 24 h 后,加入含有终浓度为 100 ng/mL 的 Nocodazole 培养基培养 18 h,后用移液器吹落漂浮的上层细胞 (shake-off),即为有丝分裂期前中期细胞。收集的有丝分裂期前中期细胞用 PBS 漂洗 3 遍后加入新鲜培养基混匀后均分至培养皿中,放回恒温培养箱中继续培养,分不同时间点收取,即为 Nocodazole 释放后细胞。

1.4 Western blot 检测

细胞用 0.25% 的胰酶消化收取,按细胞量加入适量 RI-

PA 细胞裂解液提取各组细胞总蛋白后,加入等量 2× 上样缓冲液充分混匀,煮沸 10 min 使蛋白充分变性。聚丙烯酰胺凝胶 (10% 分离胶、5% 浓缩胶) 电泳,恒流电转 (250 mA/2 h) 到 PVDF 膜,在 5% TBST 脱脂奶粉溶液中室温封闭 1 h, TBST 液清洗 3 次,每次 5 min;将 PVDF 膜放入相应一抗溶液 (1:1 000) 4 °C 过夜;TBST 液清洗 3 次,每次 5 min;将 PVDF 膜置于相应二抗溶液 (1:5 000) 室温孵育 1 h 后 TBST 溶液洗涤 3 次,每次 5 min;用 ECL 化学发光剂显影并拍照记录。

1.5 CCK-8 法检测细胞增殖

取对数生长的 U2OS 细胞接种于 96 孔板,处理组加入含有终浓度为 10 μmol/L 的 EPZ5676,对照组加入等量 DMSO (二甲基亚砜,溶剂对照),分别在处理后 48、72、96 h 每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,培养箱中孵育 30 min,酶标仪读取 450 nm 波长下的吸光度 (absorbance, A) 值。

1.6 逆转录病毒感染

在感染前一天将 MG63 细胞接种到细胞培养瓶中,当细胞密度达到 60%~70% 时,进行感染。将含有 H2B-GFP 逆转录病毒的培养上清中加入 Polybrene (终浓度为 5 μg/mL),均匀混合后加入 MG63 细胞中培养。

1.7 活细胞荧光激光共聚焦显微镜观察

将 MG63/H2B-GFP 细胞种于 4 孔的腔室盖玻片系统中,处理组加入含有终浓度为 10 μmol/L 的 EPZ5676,对照组加入等量 DMSO,48 h 时细胞密度达到 50%~60%。488 nm 通道曝光,共采集 8 层。图像每 10 min 采集 1 次,共采集 7 h。采用 60 倍物镜的 Leica SP8 双扫描模式激光共聚焦显微镜进行图像采集。腔室载玻片系统置于 37 °C 恒温和 5% CO₂ 气体的饱和湿度暗盒里。

1.8 统计处理

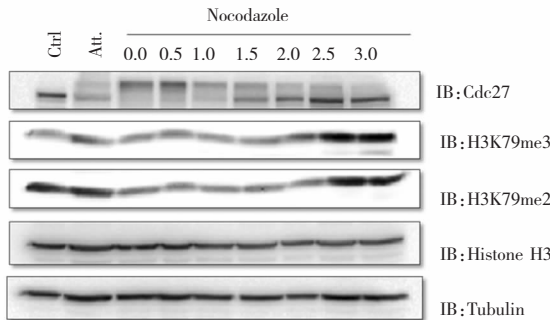
采用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析。3 组及以上组内比较采用单因素方差分析;不同时间点测量的 2 组间采用重复测量方差分析;活细胞荧光激光共聚焦显微镜观察后比较 EPZ5676 与对照组的姐妹染色单体分裂情况采用四格表资料的卡方检验。检验水准 α=0.05。

2 结果

2.1 H3K79me_{2,3} 水平在骨肉瘤细胞有丝分裂期下降

为了探索 H3K79me_{2,3} 水平与骨肉瘤细胞有丝分裂期调控的关系,本研究用 Nocodazole 同步化 U2OS 细胞,并采用 shake-off 方法得到有丝分裂期前中期细胞,然后将其释放到正常培养基中继续培养,分阶段收集处于不同时相的有丝分裂期细胞直至细胞出有丝分裂期。用 Western blot 检测细胞有丝分裂期细胞分裂周期蛋白 27 (cell division cycle 27, Cdc27) 以及 H3K79me_{2,3} 水平的变化。结果发现,Cdc27 在有丝分裂前中期发生高度磷酸化,随着细胞出有丝分裂期逐步发生去磷酸化,表现为位移条带的逐渐恢复,其变化过程与文献报道相符 (图 1)。实验结果显示,H3K79me₂ 条带灰度

值(2.5 h,3.0 h 组)较细胞释放 0 时逐渐加深($F=90.930,P=0.000$),表明随着有丝分裂的进行,H3K79me2 蛋白水平逐渐上升,H3K79me3 水平在细胞有丝分裂期的变化趋势与 H3K79me2 类似,表现为逐渐上升趋势(表 1)。



Ctrl: 未经任何处理;Att.:Nocodazole 处理 18 h 后收集贴壁细胞;0.0:Nocodazole 处理 18 h 后收集悬浮细胞;0.5~3.0:Nocodazole 处理 18 h 后收集的悬浮细胞释放到正常培养基中继续培养 0.5~3.0 h

图 1 Western blot 检测 U2OS 细胞同步化后的 H3K79 甲基化水平

表 1 细胞周期同步化释放后 Western blot 结果中 H3K79me2,3 条带的灰度值

时间	H3K79me2	H3K79me3
0.0 h	0.51 ± 0.04	0.65 ± 0.05
0.5 h	0.57 ± 0.03	0.57 ± 0.03
1.0 h	0.53 ± 0.01	0.59 ± 0.01
1.5 h	0.62 ± 0.03	0.86 ± 0.04
2.0 h	0.92 ± 0.08	0.73 ± 0.06
2.5 h	1.10 ± 0.08	1.07 ± 0.08
3.0 h	1.08 ± 0.02	1.05 ± 0.02
F 值	90.930	59.090
P 值	0.000	0.000

2.2 EPZ5676 能够抑制 H3K79 的甲基化水平

为了研究 H3K79 甲基化水平对骨肉瘤细胞有丝分裂期进程的影响,本研究利用 H3K79 甲基化转移酶 DOT1L 的特异性抑制剂 EPZ5676^[12]抑制 H3K79 的甲基化水平。结果发现,在 U2OS 细胞中加入终浓度为 1 μmol/L 和 10 μmol/L 的 EPZ5676,分别于 48 h 和 72 h 时检测 H3K79 甲基化水平,发现 1 μmol/L 的 EPZ5676 处理 48 h 就足以抑制 H3K79me2,3 的水平(图 2)。

将 U2OS 细胞用终浓度为 1 μmol/L 的 EPZ5676 处理 48 h 后,再用 Nocodazole 同步化 shake-off 收集前中期细胞,并释放到正常培养基中观察细胞从前中期直到出有丝分裂期的过程。分别观察代表细胞有丝分裂期不同时相节点的标志分子:细胞周期蛋白 Cyclin A 在细胞进入有丝分裂期前中期开始被降解一直到细胞出有丝分裂期^[13];细胞周期蛋白

Cyclin B1 在有丝分裂中期至后期转化过程中开始被降解,直至细胞出有丝分裂期^[14];Cdc27 在有丝分裂前中期发生高度磷酸化,中期向后期转化过程中逐步发生去磷酸化^[15](图 3)。结果发现,EPZ5676 处理组与对照组相比,处理组的 H3K79me2 被抑制,但是 2 组细胞有丝分裂期的重要标志分子 Cyclin B1、Cyclin A 及 Cdc27 的动态变化趋势类似(图 3),表明 H3K79me2/3 水平的降低不影响骨肉瘤细胞有丝分裂进程。

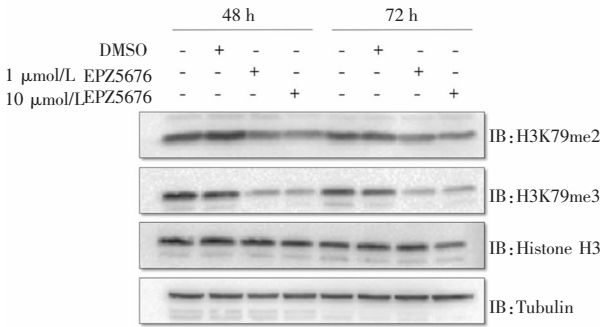
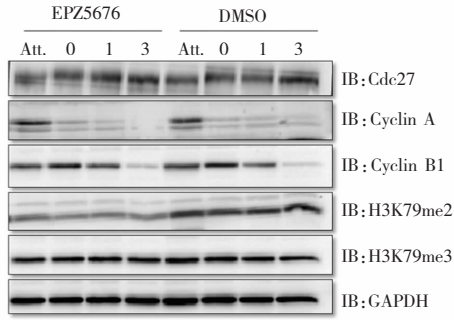


图 2 Western blot 检测 EPZ5676 处理后 H3K79me2,3 的表达



Att.:Nocodazole 处理 18 h 后收集贴壁细胞;0:Nocodazole 处理 18 h 后收集悬浮细胞;1~3:Nocodazole 处理 18 h 后收集的悬浮细胞释放到正常培养基中继续培养 1~3 h

图 3 Western blot 检测 EPZ5676 处理后同步化后各组细胞相关蛋白表达

2.3 H3K79me2,3 水平降低后姐妹染色单体分离错误的比例增高

为了进一步动态观察 H3K79me2,3 水平的降低对于骨肉瘤细胞有丝分裂期中期到后期转化以及姐妹染色单体分离的影响,本研究利用逆转录病毒得到稳定表达 GFP-H2B 的细胞系,用活细胞荧光激光共聚焦观察 EPZ5676 处理 48 h 后的细胞有丝分裂期过程,并统计姐妹染色单体分离错误的情况(图 4)。

EPZ5676 处理组中共 43 组有丝分裂期细胞,其中 23 组姐妹染色单体分离错误,20 组未见姐妹染色单体分离错误;DMSO 对照组中共 38 组有丝分裂期细胞,其中 11 组姐妹染色单体分离错误,27 组未见姐妹染色单体分离错误(表 2)。卡方检验表明 EPZ5676 处理组出现姐妹染色单体分离错误的比例高于对照组,具有统计学差异($\chi^2=4.990,P=0.026$)。

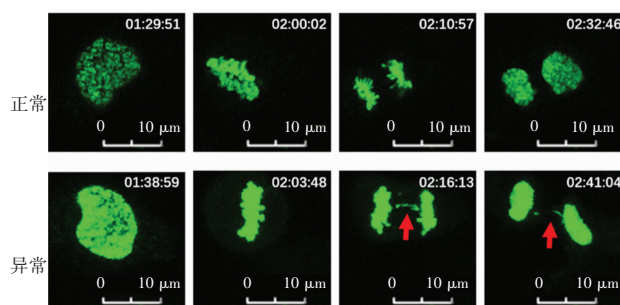


图4 有丝分裂中期出现姐妹染色单体分离错误
(箭头指示姐妹染色单体分离错误)

表2 EPZ5676 处理组与 DMSO 对照组染色体分离错误相关性

	染色体分离错误	未发现染色体分离错误	合计
处理组	23	20	43
对照组	11	27	38
合计	34	47	81

为了探索 EPZ5676 导致的染色体分离错误对细胞增殖的影响,使用终浓度为 $1 \mu\text{mol/L}$ 的 EPZ5676 处理 U2OS 细胞,采用 CCK-8 法分析其对 U2OS 细胞增殖的影响。各指标比较采用重复测量方差分析,结果显示主体间 $F=5.829$, $P=0.073$,即与 DMSO 对照组相比,EPZ5676 处理后的细胞增殖无明显区别(图 5,表 3)。

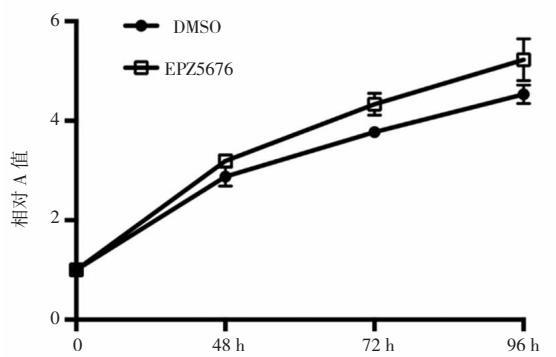


图5 CCK-8 实验检测 EPZ5676 处理后
对 U2OS 细胞增殖的影响

表3 CCK-8 实验结果中相对 A 值

时间	DMSO	EPZ5676
0 h	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
48 h	2.88 ± 0.19	3.19 ± 0.12
72 h	3.77 ± 0.11	4.05 ± 0.13
96 h	3.91 ± 0.18	4.89 ± 0.30
F 值	5.829	
P 值	0.073	

3 讨论

组蛋白的翻译后修饰对生物体的染色质结构

和基因表达起着重要的调控作用,任何修饰异常均会导致机体生理失常,从而导致肿瘤等疾病的发生^[16]。作为一种重要的组蛋白共价修饰,H3K79 的甲基化在异染色质形成、X-染色体失活、转录调控等生命过程中起着非常重要的作用^[17]。H3K79 的甲基化可以通过阻止沉默信息调控因子的蛋白家族形成的沉默复合物在染色质上的结合,从而阻止染色质的凝缩,使染色质处于开放的常染色质或转录激活的状态^[18-19]。

研究表明,H3K79 的甲基化不仅与基因的转录激活有关^[16,20],还与细胞周期的正常进行密切相关^[7],其在不同细胞的细胞周期中呈现出不同的动态变化^[8]。本研究发现,在骨肉瘤细胞中,H3K79me_{2,3} 水平在有丝分裂期前中期下降,并随着细胞出有丝分裂期逐渐上升,这与文献中所报道的 H3K79 甲基化水平在 HeLa 细胞^[9]、A549 细胞^[10]以及 HCT116 细胞^[11]中有丝分裂期的变化趋势都不相同。在骨肉瘤细胞中,有丝分裂前中期 H3K79me_{2,3} 水平较 G₂ 期下降,这可能与特异性的甲基化转移酶 DOT1L 活性降低或者其去甲基化酶活性升高有关。当在骨肉瘤细胞有丝分裂过程中进一步用 DOT1L 特异性抑制剂抑制 H3K79me_{2,3} 的水平及有丝分裂后期的增加过程,会引起有丝分裂后期姐妹染色单体分离错误出现比例增高,提示 H3K79 甲基化可能与维持纺锤体组装检查点的正常运行有关:纺锤体组装检查点负责监控姐妹染色单体准确分向两极,其缺陷常导致姐妹染色单体在向两极分离时出现错误,造成非整倍体子代细胞的出现^[21]。文献报道,非整倍体子代细胞会根据细胞环境的不同出现凋亡或继续生长等不同表型^[22]。本实验结果显示,短期内 EPZ5676 处理没有引起细胞增殖数量的明显变化。理论上,出现姐妹染色单体分离错误与纺锤体组装检查点的提前灭活以及后期促进复合物(APC/C)的提前激活有关。本研究用 Nocodazole 激活 SAC 的方法同步化细胞到有丝分裂前中期并释放到正常培养基中至细胞出有丝分裂期,观察 SAC 灭活以及 APC/C 激活的过程,Western blot 检测以 Cyclin B1 的降解为观察指标,发现 H3K79 甲基化在有丝分裂前中期的降低对有丝分裂期纺锤体组装检查点的灭活过程影响不明显,这可能与不同细胞 Nocodazole 激活纺锤体组装检查点同步化以后,SAC 灭活与 APC/C 激活不能完全同步有关。

另有相关文献报道,甲基化的 H3K79 可间接与 DNA 损伤反应蛋白 53BP1 的 Tudor 结构域结合,招募 53BP1 定位在 DNA 损伤处而发挥 DNA 修复作用,当 H3K79 甲基化水平降低时,会影响 53BP1 在 DNA 损伤处的招募,从而造成染色体的不稳定^[23]。这可能也是 H3K79 甲基化降低使姐妹染色单体分离错误增多的原因。

关于 H3K79 甲基化在骨肉瘤细胞周期中的具体作用机制仍不明确,在有丝分裂中后期引起姐妹染色单体错误分离的相关机制目前仍需进一步研究,对 H3K79 甲基化在骨肉瘤细胞有丝分裂期中的作用机制的深入了解,将为在临床实践中骨肉瘤早期诊断与精准治疗提供实验室依据。

参 考 文 献

- [1] Gianferante DM, Mirabello L, Savage SA. Germline and somatic genetics of osteosarcoma—connecting aetiology, biology and therapy[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2017, 13(8): 480–491.
- [2] Otto T, Sicinski P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(2): 93–115.
- [3] Ciliberto A, Hauf S. Micromanaging checkpoint proteins[J]. *Elife*, 2017, 6: e25001.
- [4] Wang F, Higgins JM. Histone modifications and mitosis: countermarks, landmarks, and bookmarks[J]. *Trends Cell Biol*, 2013, 23(4): 175–184.
- [5] Wilkins BJ, Rall NA, Ostwal Y, et al. A cascade of histone modifications induces chromatin condensation in mitosis[J]. *Science*, 2014, 343(6166): 77–80.
- [6] Schulze JM, Jackson J, Nakanishi S, et al. Linking cell cycle to histone modifications: SBF and H2B monoubiquitination machinery and cell-cycle regulation of H3K79 dimethylation[J]. *Mol Cell*, 2009, 35(5): 626–641.
- [7] Black JC, Van Rechem C, Whetstone JR. Histone lysine methylation dynamics: establishment, regulation, and biological impact[J]. *Mol Cell*, 2012, 48(4): 491–507.
- [8] Farooq Z, Banday S, Pandita TK, Altaf M. The many faces of histone H3K79 methylation[J]. *Mutat Res Rev Mutat Res*, 2016, 768: 46–52.
- [9] Feng Q, Wang H, Ng HH, et al. Methylation of H3-lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain[J]. *Curr Biol*, 2002, 12(12): 1052–1058.
- [10] Kim W, Kim R, Park G, et al. Deficiency of H3K79 histone methyltransferase Dot1-like protein (DOT1L) inhibits cell proliferation[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(8): 5588–5599.
- [11] Guppy BJ, McManus KJ. Mitotic accumulation of dimethylated lysine 79 of histone H3 is important for maintaining genome integrity during mitosis in human cells[J]. *Genetics*, 2015, 199(2): 423–433.
- [12] Basavapathruni A, Olhava EJ, Daigle SR, et al. Nonclinical pharmacokinetics and metabolism of EPZ-5676, a novel DOT1L histone methyltransferase inhibitor[J]. *Biopharm Drug Dispos*, 2014, 35(4): 237–252.
- [13] den Elzen N, Pines J. Cyclin A is destroyed in prometaphase and can delay chromosome alignment and anaphase[J]. *J Cell Biol*, 2001, 153(1): 121–136.
- [14] Peters JM. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(9): 644–656.
- [15] Ubersax JA, Woodbury EL, Quang PN, et al. Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1[J]. *Nature*, 2003, 425(6960): 859–864.
- [16] Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease[J]. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(10): 1057–1068.
- [17] Vlaming H, van Leeuwen F. The upstreams and downstreams of H3K79 methylation by DOT1L[J]. *Chromosoma*, 2016, 125(4): 593–605.
- [18] van Leeuwen F, Gafken PR, Gottschling DE. Dot1p modulates silencing in yeast by methylation of the nucleosome core[J]. *Cell*, 2002, 109(6): 745–756.
- [19] Ng HH, Feng Q, Wang H, et al. Lysine methylation within the globular domain of histone H3 by Dot1 is important for telomeric silencing and Sir protein association[J]. *Genes Dev*, 2002, 16(12): 1518–1527.
- [20] Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications[J]. *Cell Res*, 2011, 21(3): 381–395.
- [21] Thomas GE, Renjith MR, Manna TK. Kinetochore-microtubule interactions in chromosome segregation: lessons from yeast and mammalian cells[J]. *Biochem J*, 2017, 474(21): 3559–3577.
- [22] Rutledge SD, Cimini D. Consequences of aneuploidy in sickness and in health[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2016, 40: 41–46.
- [23] Huyen Y, Zgheib O, Ditullio RA, et al. Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks[J]. *Nature*, 2004, 432(7015): 406–411.

(责任编辑:张辉洁)