

小剂量电离辐射引起体细胞染色体不分离及其 与拓扑异构酶 II α 的关系

李华

(上海中医药大学生物教研室 上海 201203)

刘雯 李锦燕 左伋

(复旦大学医学院细胞与遗传医学系 上海 200032)

摘要 探讨小剂量电离辐射对体细胞染色体不分离的影响, 及与 DNA 拓扑异构酶 II α (Topoisomerase II α , TOPOII α) 的关系。用 ^{137}Cs γ 为辐射源与中期染色体计数法, 研究了小剂量照射与人外周血淋巴细胞有丝分裂染色体不分离关系, 发现照射对染色体不分离的影响具剂量效应、时间效应和次数累加效应; 用 Western blot 和 RT-PCR 检测了照射对 HeLa 细胞中 TOPOII α 表达的影响, 也存在剂量效应、时间效应和次数累加效应; 以 TOPOII α 抑制剂 (VP-16) 抑制 HeLa 细胞中 TOPOII α 活性, 也引起 HeLa 细胞有丝分裂染色体不分离率增加, 照射和抑制 TOPOII α 活性的协同作用加重对不分离的影响。结果提示 TOPO II α 表达的变化是小剂量照射引起有丝分裂染色体不分离的机制之一。

关键词 小剂量照射, 染色体不分离, 拓扑异构酶 II α

中图分类号 Q291, Q23, R34

大剂量电离辐射照射会引起遗传物质的改变。现实生活中, 人们受大剂量照射的几率很小。然而, 环境中小剂量的电离辐射源是否会影响机体, 其影响作用有否累加效应及其影响机制, 尚在争论中。Masao 等^[1]研究了照射累积效应, 发现长期 γ 射线照射的累积作用使胚胎细胞的非整倍体细胞数两倍于对照组^[1]。本实验室对唐氏综合征 (Down syndrome, DS) 的流行病学研究也发现, DS 的母亲生育年龄呈下降趋势, 且年轻母亲中长期接受电离辐射照射的比率显著高于对照^[2,3]。故我们认为生育染色体病的母亲年龄降低, 可能与长时间、小剂量的辐射接触有关。本文以年轻女性外周血为材料探讨了小剂量电离辐射 (尤其是多次小剂量电离辐射累积作用) 对有丝分裂过程中染色体不分离的影响。

关于辐射引起染色体不分离的机制, 尚无确切结论。未成熟的姐妹染色单体提前进入分裂, 可引起染色体不分离, 为避免该情况发生, 须将新合成的、缠绕在一起的姐妹染色单体解旋, 这需要 DNA 拓扑异构酶 II α (TOPOII α) 的参与^[4]。文献^[5]报道,

TOPOII α 活性被抑制, 可使肿瘤细胞非整倍体率增加, 在酵母和哺乳动物细胞内有丝分裂后期引起染色体的不分离。John^[6] 等发现, 抑制 DNA 拓扑异构酶 II α 活性可引起减数分裂时染色体的不分离。由此我们认为在电离辐射、TOPOII α 表达量下降和染色体不分离三者间可能存在某些联系。本文还探讨了 TOPOII α 是否是小剂量电离辐射引起有丝分裂时染色体不分离的机制之一。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 外周血 取 20—30 岁健康女性外周血 3mL, 肝素抗凝, 用于制备染色体, 分析有丝分裂染色体的不分离。

1.1.2 细胞株 HeLa 细胞系, 实验室长期冻存, 用于 TOPOII α 的表达检测。

1.1.3 试剂 RPMI 1640 培养基, 购自 Gibco 公司, etoposide (VP-16), 购自 Sigma 公司, 羊抗人 TOPOII α 多克隆抗体, 羊抗人 actin 多克隆抗体购自

国家自然科学基金 (30100037) 资助

第一作者: 李华, 女, 1975 年 4 月出生, 2003 年于复旦大学医学院获博士学位, 讲师, 从事生物学研究

通讯联系人: 刘雯

收稿日期: 初稿 2005-12-06, 修回 2006-04-07

Santa Cruz 公司, 生物素标记兔抗羊 IgG 购自博士德公司, HPR 标记的生物素-抗生物素试剂购自华美生物工程公司, DAB 购自 Sigma 公司, 其它常用试剂购自上海生工生物技术公司和上海华美生物技术公司, 照射源为上海市放射医学研究所 ^{137}Cs γ 射线发生器, 剂量率为 0.93 Gy/min。

1.1.4 RT-PCR 引物 由上海生工生物技术有限公司合成

TOPOII α 引物: CGTAACAGATTCTGGACCAA
CTTAGGTGGACTAGCATCTGA

Actin 引物: CCTGGCATTGCCGACA
TGGGGTGGCTTTTAGGA

1.2 方法

细胞培养、Western blot 和 RT-PCR 均按常规操作进行; 外周血接种后 37°C 培养 72h, 加秋水仙素继续培养 3h, 按常规方法制备染色体。

1.2.1 小剂量照射对染色体数目的影响 按照照射时间和剂量分为: ①剂量组: 取血 2mL, 分 6 份, 分别接受 0 (对照)、0.1、0.25、0.5、1.0、2.0Gy 的照射, 照射后立即接种。②时间组: 同一个体接种后分别在 0、24、48、72h 接受 0.5Gy 的照射, 对照是未经照射的外周血。③接种前次数组: 同一个体外周血分几份, 分别接受 0.5Gy 的 3、2、1、0 次 (对照) 照射, 每次间隔 24h, 最后一次照射后立即接种培养。④接种后次数组: 同一个体血样接种后, 在 0、24、48、72h 给予 0.5Gy 照射, 分别照射 4、3、2、1、0 (对照) 次。照射温度为常温。接种于含 PHA 的 RPMI1640 培养基, 常规培养, 染色体制备, 染色, 油镜下计数分裂相的染色体数。分裂相多的片子, 至少计数 100 个分裂相以上, 分裂相少的片子, 计数全部的分裂相。其中超二倍体主要是具有 47 条染色体, 少数有 48 条染色体, 而亚二倍体主要为 45 条染色体。各组数据采用 χ^2 检验进行统计分析。

1.2.2 TOPOII α 抑制剂 (VP-16) 对体细胞染色体不分离的影响 根据 VP-16 加入的时间和剂量分为: ①剂量组: 取同一个体外周血接种 5 瓶, 常规制备染色体的方法培养, 培养至 68h, 分别加入 0 (DMSO)、4、8、12、16 $\mu\text{mol/L}$ 的 VP-16, 作用 30min 后, 用培养基洗细胞 2 次, 再放入制备染色体的全培养基中继续培养满 72h, 并在收获前 3h 加

入秋水仙素将细胞抑制在分裂中期, 如前述方法计数、统计分析结果。②时间组: 取同一个体外周血接种 4 瓶, 常规制备染色体的方法培养, 培养至 68h, 加入 8 $\mu\text{mol/L}$ 的 VP-16, 作用时间分别为 0、15、30、60min, 其它操作如前。

1.2.3 小剂量电离辐射对 TOPOII α 表达的影响 实验材料为 HeLa 细胞系, 将细胞培养至培养瓶, 细胞长至支持物 70% 时, 随机分为 3 组。①时间组: 照射剂量为 5Gy, 分别在照射后 0、4、8、12、16h 提取蛋白及 RNA。②剂量组: 分别接受 0 (对照)、1、2、3、4、5Gy 照射, 12h 后提取蛋白及 RNA。③次数组: 1Gy 照射, 分别接受 3、2、1、0 次, 每次间隔 12h, 最后一次照射后 12h 提取蛋白和 RNA。蛋白用于 Western blot 检测, 采用 8%SDS-PAGE 胶将蛋白分离, 分离后蛋白转膜至 PVDF 膜, 封闭后将膜剪两半, 上半片检测 TOPOII α , 下半片检测内对照 actin, mRNA 用 RT-PCR 检测, 同样用 actin 做内对照。为客观表述实验结果, Western blot 结果用 NIH image 软件进行灰度分析, 并用配对资料 t 检验分析相邻各组间相对灰度 (TOPO II α / Actin) 的差别。

1.2.4 辐射与 TOPOII α 抑制剂 (VP-16) 协同作用对体细胞染色体不分离的影响 根据前面实验结果, 本实验仅对接种前多次小剂量的辐射与 TOPOII α 抑制剂的协同效应进行了观察。将同一个体外周血分为 8 份, 分别为接种前单纯照射 1、2、3 次组、单纯抑制剂组、不同辐射次数加抑制剂组, 辐射次数间隔 24h, 最后一次照射后立即接种, 抑制剂为 8 $\mu\text{mol/L}$ 的 VP-16, 作用 30min 后制备染色体, 计数、统计分析。

2 结果

2.1 小剂量电离辐射与细胞有丝分裂染色体不分离的关系

2.1.1 照射剂量与外周血染色体数目变化的关系 不同照射剂量作用后的结果见表 1, 从 0.25Gy 开始, 亚二倍体率 (亚二倍体数/总分裂细胞数) 较对照显著升高 ($p < 0.05$); 从 0.1Gy 开始, 超二倍体率 (超二倍体细胞数 / 总分裂细胞数) 较对照明显升高 ($p < 0.05$), 且随剂量增加呈增加趋势。

Table 1 Effect of irradiation dose on chromosome number

Dose / Gy	Euploid	Hyperdiploid	Hypodiploid	Aneuploid	Total mitotic cells	Rate of aneuploid / %	Rate of hyperdiploid / %
0	85	2	21	23	108	21.30	1.85
0.10	95	10	30	40	135	29.63	7.41 ⁽²⁾
0.25	56	9	29	38	94	40.43 ⁽²⁾	9.57 ⁽²⁾
0.50	84	14	28	42	126	33.33 ⁽²⁾	11.11 ⁽²⁾
1.0	107	37	52	89	196	45.40 ⁽²⁾⁽³⁾	18.88 ⁽¹⁾⁽²⁾
2.0	100	55	70	125	225	55.56 ⁽²⁾⁽³⁾	24.44 ⁽¹⁾⁽²⁾

⁽¹⁾Significant differences ($p < 0.01$) between 2Gy and 0.5Gy groups, and between 1Gy and 0.25Gy groups, ⁽²⁾Significant differences ($p < 0.05$) between the control group, ⁽³⁾Significant differences ($p < 0.05$) between the high dose and low dose groups

2.1.2 照射时间与外周血染色体数目变化的关系 同一个体外周血, 在接种前后不同时间给予 0.5Gy 照射, 结果见表 2, 非整倍体率及超二倍体率在照射组较对照显著升高 ($p < 0.01$), 且接种后照射组较

接种前照射组显著升高 ($p < 0.01$), 在接种后照射组间无明显差别 ($p > 0.05$)。说明染色体不分离在接种后照射组比接种前照射组明显增加。

Table 2 Chromosome number of the samples irradiated at different hours after cell culture

Time / h	Euploid	Hyperdiploid	Hypodiploid	Aneuploid	Total mitotic cells	Rate of aneuploid / %	Rate of hyperdiploid / %
Control	85	2	21	23	108	21.30	1.85
0*	101	12	37	49	150	32.67 ⁽¹⁾	8.00 ⁽¹⁾
0**	100	40	61	101	201	50.25 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾	19.90 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾
24	44	15	34	49	93	52.69 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾	16.13 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾
48	63	16	51	67	130	51.54 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾	12.30 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾
72	5	4	3	7	12	58.33 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾	33.33 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾

*Just before the irradiation, ** Just after the irradiation; ⁽¹⁾Significant differences ($p < 0.01$) between irradiated groups and control group, ⁽²⁾Significant differences ($p < 0.01$) between the groups irradiated before and after cell culture, ⁽³⁾No significant differences ($p > 0.05$) between the groups irradiated after cell culture

2.1.3 接种前照射次数与外周血染色体数目变化的关系 同一个体外周血, 分别在接种前给予 0.5Gy 的不同次数照射, 由于外周血体外放置时间不能太长, 故本实验最大照射次数为 3 次, 所有样品除照射次数的不同, 其他条件完全一致, 结果见表 3,

非整倍体率及超二倍体率在第一次照射组较对照显著升高 ($p < 0.05$), 非整倍体率照射 3 次后较照射 2 次后显著增加 ($p < 0.05$), 超二倍体率照射 3 次较 1 次组明显升高 ($p < 0.05$)。说明染色体不分离随照射次数的增加呈增加趋势。

Table 3 Chromosome number of the samples with different times of 0.5kGy treatment before cell culture

Times	Euploid	Hyperdiploid	Hypodiploid	Aneuploid	Total mitotic cells	Rate of aneuploid/%	Rate of hyperdiploid/%
0	80	2	19	21	101	20.79	1.98
1	101	12	37	49	150	32.67 ⁽¹⁾	8.00 ⁽¹⁾
2	105	14	33	47	152	30.92 ⁽¹⁾	9.21 ⁽¹⁾
3	97	38	51	89	186	47.85 ⁽¹⁾⁽³⁾	20.43 ⁽¹⁾⁽²⁾

⁽¹⁾ Significant differences($p < 0.05$) between the irradiated groups and the 0kGy group, ⁽²⁾Significant differences($p < 0.05$) between the 0.5kGy \times 2 and 0.5kGy groups, ⁽³⁾Significant differences($p < 0.05$) between the 0.5kGy \times 3 and 0.5kGy \times 2 groups

2.1.4 接种后照射次数对染色体数目的影响 同一个体外周血,分为5份,分别在接种后给予0.5Gy的不同次数照射,所有血样除照射次数的不同,其他条件完全一致,染色体制备及分析如上。结果见表

4, 细胞分裂相少,非整倍体率及超二倍体率在照射组较对照显著升高($p < 0.05$),在各照射次数组间无明显差别($p > 0.05$)。

Table 4 Chromosome number of the samples with different times of 0.5kGy treatment after cell culture

Times	Euploid	Hyperdiploid	Hypodiploid	Aneuploid	Total mitotic cells	Rate of aneuploid / %	Rate of hyperdiploid / %
0	85	2	21	23	108	21.30	1.85
1	5	2	8	10	15	66.67 ⁽¹⁾	13.33 ⁽¹⁾
2	11	11	13	24	35	68.57 ⁽¹⁾	31.43 ⁽¹⁾
3	21	8	21	29	50	58.00 ⁽¹⁾	16.00 ⁽¹⁾
4	36	12	37	49	85	57.65 ⁽¹⁾	14.12 ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Significant differences($p < 0.05$) between the irradiated groups and the 0 kGy group

2.2 TOPOII α 抑制剂对细胞有丝分裂染色体不分离的影响

2.2.1 剂量效应组 染色体制备标本在培养 68h 予

不同剂量的 VP-16 作用 30min, 实验结果如表 5, 超二倍体率随抑制剂的剂量增加而增加, 但抑制剂浓度达 10 μ mol/L 时, 已过度抑制了细胞分离, 分裂相太少。所以 VP-16 的最佳作用浓度是 8 μ mol/L。

Table 5 Effect of VP-16 dose on chromosome number

Dose / μ mol L ⁻¹	Euploid	Hyperdiploid	Hypodiploid	Aneuploid	Total mitotic cells	Rate of aneuploid / %	Rate of hyperdiploid / %
0	82	5	13	18	100	18.00	5.00
4	30	4	11	15	45	33.33 ⁽¹⁾	8.89 ⁽¹⁾
8	43	14	43	57	100	57.00 ⁽¹⁾⁽²⁾	14.00 ⁽¹⁾
10	13	8	10	18	31	58.06	25.80
12	5	3	2	5	10	50.00	30.00

⁽¹⁾ Significant differences($p < 0.05$) between the VP-16 treated groups and the control, ⁽²⁾Significant differences($p < 0.05$) between 8 μ mol/L group and 4 μ mol/L group

2.2.2 时间效应组 同一个体外周血接种4瓶,如前述方法加入8 μ mol/L的VP-16,作用不同时间制备染色体,记数分裂相。统计分析结果。超二倍体率随抑制剂的作用时间的延长而增加,但抑制剂作

用时间达60min时,已过度抑制了细胞的分离,未见分裂相。所以VP-16抑制染色体分离的最佳作用条件是8 μ mol/L、30min(见表6)。

Table 6 Chromosome number of the samples at different times after 8 μ mol/L VP-16 treatment

Time / min	Euploid	Hyperdiploid	Hypodiploid	Aneuploid	Total mitotic cells	Rate of aneuploid / %	Rate of hyperdiploid / %
0	82	5	13	18	100	18.00	5.00
15	68	6	12	19	79	24.51	7.59
30	43	14	43	57	108	57.00 ⁽¹⁾	14.00 ⁽¹⁾
60	0	0	0	0	0	0	0

⁽¹⁾ Significant differences ($p < 0.05$) between the VP-16 treated groups and the control

2.3 小剂量电离辐射对 TOPO II α 表达的影响

为取材方便,本部分实验材料为hela细胞系,由于该细胞系为肿瘤细胞,所以虽采用照射剂量较高,但对肿瘤细胞来说仍为小剂量。每组实验重复三次,结果相似。

2.3.1 1、5Gy照射后,时间对TOPO II α 表达的影响 (1) Western blot结果。给予细胞5Gy照射,分别在照射后0、4、8、12、16h提取蛋白,Western blot检测的结果见图1。照射后4h的条带开始变淡,12h的条带最淡,16h时开始回升。Actin(肌动蛋白)为内对照,表达无明显变化。说明TOPO II α 的表达在照射后具时间变化效应。

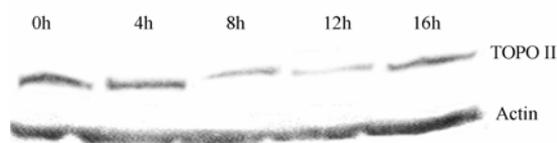


Fig.1 The expression of TOPO II α at different hours after 5Gy irradiation

(2) RT-PCR结果。给予细胞5Gy照射,分别在照射后0、4、8、12、16h提取RNA,各组取等量的RNA(4 μ g)作RT-PCR检测,由引物设计知TOPO II α 引物扩增的片段长度为700bp,actin引物扩增的片段长度为500bp,结果见图2。所扩增的两片段的长度与预期的长度一致,TOPO II α 的mRNA在4h开始下降,8h达到最低水平,12h开始回升,略早于蛋白回升时间,Actin为内对照,无明显变化。

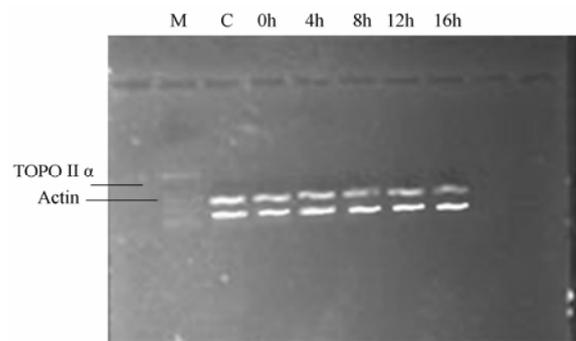


Fig.2 mRNA level of TOPO II α at different hours after 5Gy irradiation

2.3.2 不同剂量照射对TOPO II α 的表达变化的影响 (1) Western blot结果。不同剂量照射后12h提取蛋白,Western blot检测,结果见图3。随照射剂量增加,条带逐渐变淡,即TOPO II α 的表达量随照射剂量的增加下降逐渐明显。Actin无明显变化。相对灰度(TOPO II α /Actin)呈增加趋势。

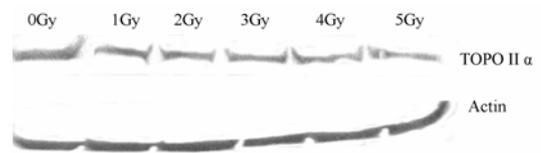


Fig.3 The expression of TOPO II α after irradiation of different doses

(2) RT-PCR结果。给予细胞0、1、2、3、4、5Gy照射,照射后12h提取RNA,各组取相同量RNA(4 μ g)作RT-PCR检测,结果见图4。随照射剂量增加,TOPO II α mRNA表达量逐渐下降。Actin mRNA变化不明显。

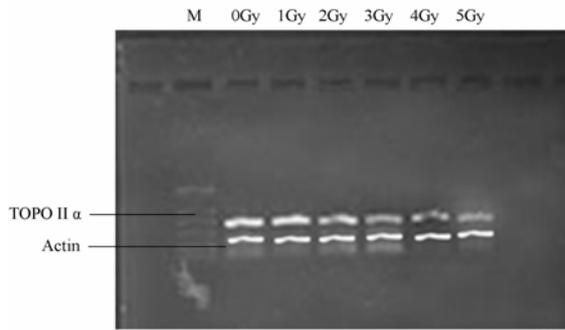


Fig.4 mRNA level of TOPO II α after irradiation of different doses

2.3.3 多次照射后累加效应对 TOPO II α 的表达的影响 (1) Western blot 结果。1Gy 照射分别为 0、1、2、3 次，间隔 12h，最后一次照射后 12h 提取蛋白，Western blot 检测其变化，结果见图 5。随照射次数增加，各条带逐渐变淡，表明 TOPO II α 表达量逐渐下降，Actin 未见明显变化。

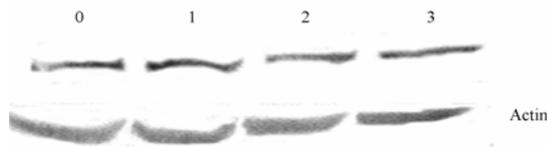


Fig.5 The expression of TOPO II α after 1Gy treatment with different times of irradiation

(2) RT-PCR 结果。予 1 Gy 照射分别为 0、1、2、

3 次，间隔为 12h，最后一次照射后 12h 提取 RNA，RT-PCR 检测其变化，结果见图 6。随照射次数增加，条带逐渐变淡，表明其表达量逐渐下降。

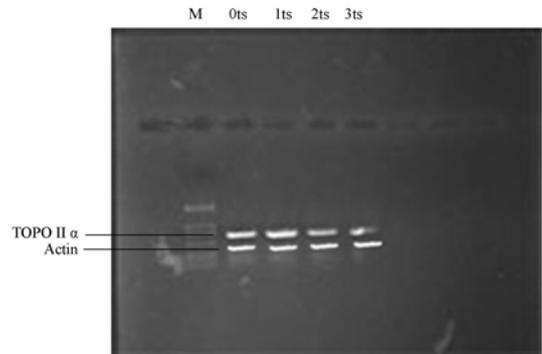


Fig.6 mRNA level of TOPO II α after 1Gy treatment with different times of irradiation

2.4 辐射与 TOPOII α 抑制剂协同作用对有丝分裂染色体不分离影响

根据以上实验结果，本实验仅对接种前多次小剂量照射与 TOPOII α 抑制剂的协同效应进行了观察。方法如前所述，本次实验与前述 VP-16 抑制实验和接种前次数组同时进行，结果见表 7。照射 1、2 次加 VP-16 组中，非整倍体率及超二倍体率均较单纯辐射时增高，但较单纯抑制剂无明显增高，照射 3 次后，较单纯辐射或单纯抑制剂时明显增高。说明照射累积 3 次后的作用才明显显示出。

Table 7 The rate of aneuploid and hyperdiploid under different conditions

Irradiation times	Rate of aneuploid / %			Rate of hyperdiploid / %		
	VP-16	Irradiation	Irradiation+VP-16	VP-16	Irradiation	Irradiation+VP-16
1	57.00	32.67	36.00 ⁽¹⁾	14.00	8.00	16.00 ⁽¹⁾
2	57.00	30.92	39.78 ⁽¹⁾	14.00	9.21	20.29 ⁽¹⁾
3	57.00	47.85	62.50 ⁽²⁾	14.00	20.43	32.50 ⁽²⁾

⁽¹⁾ Significant differences ($p < 0.05$) between the irradiated groups and VP-16 group, ⁽²⁾ Significant differences ($p < 0.05$) between 3 times group and 1 or 2 times group

3 讨论

染色体分离是近年来的研究焦点之一，关于额外染色体来源的研究，主要为近着丝粒区的微卫星 DNA 标志的高度多态性，根据父母 DNA 标记的杂合性在患者是否降为纯合决定其来源^[7]，用以上方法，David 发现 21 三体中额外染色体 88% 来源于母亲，其中 90.6% 为减数分裂 I^[8]；我国学者也得出类似结果^[9]。现有实验结果表明，染色体不分离的

生物学机制和发生率在男女两性间明显不同，在体外，也是女性高于男性，年龄对染色体分离（不分离、丢失）影响在女性均较强于男性，这可能是不同性别体内细胞微环境的差异造成的，所以本实验主要用女性外周血进行。

3.1 小剂量电离辐射引起有丝分裂染色体不分离

本研究在剂量对染色体数目的影响中发现，除

个别剂量外,非整倍体率随剂量的增加而明显增加,超二倍体率也在0.1Gy起较对照明显增加,虽然相邻剂量间差别无统计意义,但间隔剂量组间差异明显,总体趋势是随剂量增加而增加。在照射时间对染色体数目的影响实验中发现,72h照射的细胞分裂相少,亚二倍体率在接种前后照射都较对照明显增高,并且接种后照射较接种前照射也见明显增高,超二倍体率也有类似结果,但接种后各时间组间无明显差别。在接种前照射次数对染色体数目影响的实验中发现,虽然增加一次照射次数,对染色体数目的变化影响无统计学意义,但相隔两次以上照射的细胞,非整倍体率及超二倍体率均具有了明显增加。在接种后细胞给予多次照射,细胞分裂相少。综合以上结果可以得出结论:辐射对非整倍体、对染色体不分离的影响具剂量效应,次数累加效应,且接种后照射的影响较接种前照射影响大。

3.2 小剂量电离辐射引起有丝分裂染色体不分离的机制

在染色体凝集分离过程中,TOPO II α 起重要作用。TOPO II α 是细胞核内的磷蛋白,该蛋白基因定位于17q21-22。全长27.5 kb,编码蛋白为170 KD。该蛋白主要在增殖细胞表达,其催化活性也呈周期性变化,在G2/M期具有最高的蛋白量和酶活性。并非所有的TOPO II α 分子都具有催化活性,约25%的TOPO II α 是作为染色体构建的支架^[10]。TOPO II α 通过同源二聚体发挥活性,该酶发挥催化活性时,将一DNA双链一过性断点导入DNA的磷酸骨架,然后两亚单位与DNA链的5'端通过O4-磷酸酪氨酸共价紧密结合在一起,然后另一条DNA链在断点重新接合前通过该断点,从而来松解缠绕卷曲的DNA^[11]。

本文用VP-16抑制DNA拓扑异构酶II α 的活性,结果发现有丝分裂染色体不分离明显增加(见表5、表6),VP-16(etoposide)是通过与TOPO II α 和DNA形成DNA-TOPO II α -VP-16三元复合物,破坏了TOPO II α 的DNA重新连接功能发挥作用的^[12]。由以上两部分结果及对TOPO II α 的认识,我们认为小剂量的电离辐射引起染色体的不分离,可能是通过DNA拓扑异构酶II α 变化引起的,为此,本文又观察了小剂量电离辐射是否能引起DNA拓扑异构酶II α 的表达变化,结果如下所述。

细胞受5Gy的照射时,TOPO II α 的表达较对照(0Gy)在4h已开始下降,12h降为最低,16h已开始恢复,内对照actin无明显变化,RT-PCR结果显示TOPO II α mRNA在4h开始下降,8h降为最

低,12h开始恢复,较蛋白的变化早;不同剂量组结果显示了细胞受不同剂量照射后12h,TOPO II α 的表达较对照降低,且下降程度随剂量增加而增加。而在不同照射次数组的结果也显示,细胞受1Gy照射后,TOPO II α 表达在照射1次较对照降低,依次随照射次数增加,下降程度增加,说明小剂量 γ 照射引起TOPO II α 的表达变化具次数累加效应,这与本实验室曾做的多次小剂量的辐射可使DS发生率高于对照的结果相吻合,也与多次照射引起染色体不分离增加的累加效应相吻合。

实验结果表明,小剂量 γ 照射可以引起染色体的不分离,并可引起TOPO II α 的表达变化,TOPO II α 活性被抑制也可以引起染色体的不分离;现有知识已经明确TOPO II α 参与细胞有丝分裂和减数分裂时染色体的分离过程,那么我们可以确定至少TOPO II α 的改变是电离辐射引起染色体不分离的机制之一。为了进一步验证该结果,本文设计了电离辐射和TOPO II α 抑制剂的协同作用这部分实验,如果电离辐射引起染色体的不分离是通过改变TOPO II α 起作用,那么两者的协同作用应该是加重了染色体的不分离。我们的实验结果也如预期(见表7),所以我们认为TOPO II α 表达的变化是小剂量电离辐射引起有丝分裂染色体不分离的机制之一。

参考文献

- 1 Masao S, Zhi Y, Kazushiro N, *et al.* J Radiat Res, 1998, 39(3): 203-213
- 2 谢佐俊, 刘雯, 李华, 等. 中国优生与遗传杂志, 2004, 12(6): 41-43
XIE Zuojun, LIU Wen, LI Hua, *et al.* Chinese J Birth Health Hered, 2004, 12(6): 41-43
- 3 刘雯, 李华, 王世雄, 等. 中国优生与遗传杂志, 2001, 9(1): 39-40
LIU Wen, LI Hua, WANG Shixiong, *et al.* Chinese J Birth Health Hered, 2001, 9(1): 39-40
- 4 Scarpato R, Landini E, Migliore L. Mutat Res, 1996, 372(2): 195-205
- 5 Pernille G, Alexander G, Maxwell S J. Bio Chem, 1998, 273(50): 33660-33666
- 6 John B M, Francesco M, Daniel Y, *et al.* Mutagenesis, 1996, 11(4): 357-361
- 7 Botstein D, Am. J Hum Genet, 1980, 32(2): 314-331
- 8 David G, Eulalia S, Miriam G, *et al.* Annales de Genetique, 2000, 439(1): 23-28
- 9 史庆华, 张坚宣, 潘淑娟, 等. 遗传学报, 1998, 25(6): 478-484

- SHI Qinghua, ZHANG Jianxuan, PAN Shujuan, *et al.* Acta Genet Sin, 1998, **25**(6): 478-484
- 10 Barker C, Mouchel N, Jenkins J. Biochem Biophys Res Commun, 2006, **342**(2): 596-604
- 11 Tateno, Kamiguchi H, Yujiroh, *et al.*, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2001, **476**(1):139-148
- 12 Gantchev T G, Hunting D J. Biochem Biophys Res Commun, 1997, **237**(1): 24-27

Effects of low dose radiation on chromosome non-disjunction and the relation with topoisomerase II α

LI Hua

(*Department of Biology, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203*)

LIU Wen LI Jinyan ZUO Ji

(*Department of Cellular and Genetic Medicine, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032*)

ABSTRACT To explore the effect of low dose radiation on chromosome non-disjunction, human lymphocyte were cultured and treated with ^{137}Cs γ -ray ($\leq 5\text{Gy}$) and the metaphase chromosomes were counted. The results showed that the rate of aneuploid and hyperdiploid increased markedly after irradiation, and was dose-dependent and time-dependent. RT-PCR and Western blot were used to study changes of TOPO II α expression in the irradiated HeLa cells. A transient and significant decrease of TOPO II α after 5 Gy irradiation was detected: the decrease began at 4h after irradiation, reached to the lowest level at 12h, and began to return at 16h. The decreasing rate increased with the irradiation dose, and decreasing rate was higher with multiple irradiations than a single irradiation of the same dose. The decrease of TOPO II α after irradiation was also time- and dose-dependent. The rate of aneuploid and hyperdiploid increased more significantly in HeLa cells under the co-effect of TOPO II α inhibitor (VP-16) and irradiation. The results suggest that low dose irradiation may causes chromosome non-disjunction, and its mechanism is related with the change of TOPO II α expression.

KEYWORDS Low dose irradiation, Chromosome non-disjunction, Topoisomerase II α

CLC Q291, Q23, R34