

# 丙烯酰胺诱导人白血病 HL-60 和 NB<sub>4</sub> 细胞 *hprt* 基因的分子突变谱

刘胜学<sup>1</sup>, 曹佳<sup>1\*</sup>, 杨梦魁<sup>2</sup>, 方志俊<sup>2</sup>, 安辉<sup>1</sup>

(1. 第三军医大学分子毒理学实验室, 重庆 400038; 2. 香港城市大学生物化学系, 九龙塘 83, 香港)

**摘要:** 为了研究丙烯酰胺的遗传毒理作用, 采用单细胞克隆培养, 双向筛选计数, 多重 PCR 扩增与电泳分析, 研究了诱导 HL-60 和 NB<sub>4</sub> 两种细胞 *hprt* 基因突变率及分子突变谱. 发现只有丙烯酰胺高剂量组 (700 mg·L<sup>-1</sup>) 才对两种细胞有明显的致 *hprt* 基因突变作用; 丙烯酰胺诱发突变主要由点突变和缺失两部分组成 (40.0% ~ 66.7%, 33.3% ~ 60.0%), 而自发突变几乎全是点突变 (90.0% 以上), 两种细胞均无全基因缺失型; 缺失突变可以发生于 *hprt* 基因上的每个外显子 (除外显子 7/8 以外), 较集中于基因的 3' 末端, 且诱发突变中绝大多数是点突变与单个外显子缺失 (93.3%, 86.1%), 两种细胞情况类似. 结果提示, 丙烯酰胺具有较弱的诱导 *hprt* 基因突变的作用, 且诱发突变与自发突变的分子图谱不一样, 这可能与其作用机理有关.

**关键词:** 基因, *hprt*; 丙烯酰胺; 诱变; 细胞, HL-60; 细胞, NB<sub>4</sub>

中图分类号: R994.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2001)04-0276-06

丙烯酰胺 (acrylamide) 是一种工业絮凝剂, 广泛用于建筑, 饮水净化和污水处理等, 实验室与医院在电泳和整容等工作中用其聚合物, 因而是一种重要的职业接触化合物<sup>[1]</sup>. 近年来的许多研究表明, 丙烯酰胺不仅具有较强的神经毒性作用, 而且还是致突变剂和潜在的致癌剂<sup>[1]</sup>, 但现有的研究资料主要

是在染色体水平上研究丙烯酰胺的遗传损害作用, 而对哺乳动物细胞基因损伤的研究报道较少, 并且存在一定的争议<sup>[2]</sup>. 次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶 (hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase) 基因 *hprt* 作为一个内源性结构基因, 编码产生嘌呤代谢补充途径的关键酶, 由于其本身具有的一些独特性质, 如定位于 X 性染色体上, 为非必需基因, 对于突变型与野生型细胞株均可鉴定, 以及自发突变率低等, *hprt* 基因目前最有希望成为突变与癌变研究的主要分子标记物之一<sup>[3]</sup>. 因此, 本实验采用人白血病 HL-60 和 NB<sub>4</sub> 两种细胞作为观察对象, 研究丙烯酰胺诱导 *hprt* 基因的分子突变谱, 为探讨丙烯酰胺的遗传毒性以及潜在的致肿瘤作用机理提供一定的依据.

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与材料

6-硫代鸟嘌呤 (6-thioguanine, 6-TG), 丙烯酰胺, 美国 Sigma 公司; 含有次黄嘌呤, 氨基蝶呤和胸腺嘧啶核苷的选择性培养基 (HAT), 中国科学院上海生物化学研究所.

### 1.2 细胞培养与筛选

HL-60 细胞属人急性早幼粒白血病细胞株, 核型 46(43 ~ 48), 倍增时间 12 ~ 16 h. NB<sub>4</sub> 细胞是 HL-60 细胞的变异株 (染色体 15 与 17 易位). 为了降低细胞 *hprt* 位点自发突变频率, 实验前用 1% HAT 选择培养基处理 24 h.

### 1.3 细胞毒性与突变频率的测定

将指数生长期的细胞弃去培养液, 然后加入含不同浓度丙烯酰胺的不完全培养液, 染毒 6 h. 接种存活率 (plating efficiency, PE), 克隆效率 (cloning efficiency, CE) 和突变频率 (mutation frequency, MF) 具体测定方法参见文献<sup>[4]</sup>.

### 1.4 突变细胞的筛选, 扩增与 DNA 提取

从阳性微孔中把明确的单个细胞克隆对应地转

收稿日期: 2001-01-05 接受日期: 2001-03-30

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (39970650); 军队基金项目 (98M090); 教育部优秀青年教师资助计划项目 (2000-81); 香港城市大学 RCP 资助项目 (9360017)

**作者简介:** 刘胜学 (1969 -), 男, 山东省沂水人, 讲师, 硕士; 曹佳 (1962 -), 男, 四川省江油人, 教授, 主要从事突变的检测方学及其分子机理研究.

\* 联系作者. Tel: (023)68752271, E-mail: caoqq@yahoo.com

入含有  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-TG 筛选培养液的 24 孔培养板中初次扩增。然后以每孔  $10^3$  个细胞分别接种于含 HAT 选择培养基的培养板中, 只有细胞出现明显死亡者才认为是突变克隆细胞, 其余细胞转入培养瓶中再次扩增。最后以常规方法分离提取细胞 DNA。

### 1.5 PCR 引物的设计, 合成与鉴定

引物序列参考了已报道的研究资料<sup>[5]</sup>, 并运用计算机设计 *hprt* 基因 9 个外显子相对应的 8 对引物。引物合成与鉴定由北京贝克曼示范实验室, 美国赛百盛公司和中国科学院上海细胞生物研究所共同完成。

本实验中由于 *hprt* 基因外显子 7 与 8 只间隔 163 bp, 所以二者共用一对引物, 以 379 bp 大小的片段一起被扩增合成。因此实际操作中, 将 8 对外显子引物按外显子 2, 5, 6 和 7/8 与外显子 3, 4 和 9 分为两组, 参与两个多重 PCR 反应, 而外显子 1 单独扩增合成。引物序列具体参见表 1。

Tab 1. Oligonucleotide primers for the multiplex PCR of the human HPRT locus

Exon	Primer sequence (5'-3')	Fragment size/bp
1	F TGG GAC GTC TGG TCC AAG GAT TCA R CCG AAC CCG GGA AAC TGG CCG CCC	626
2	F CCT GTA ATG CTC TCA TTG AAA CA R GCT GCT GAT GTT TGA AAT TAA CAC	211
3	F GTT TAA TGA CTA AGA GGT GTT TG R GAA AAC CTA CTG TTG CCA CTA AA	311
4	F GTG TGT GTA CAT AAG GAT ATA CA R TTC TTC CCT TTC AAG ATA CAT AC	165
5	F GGA AAT ACC GTT TTA TTC ATT GT R GTG CAT ACT AAG TTA GAA AAG TC	125
6	F GTG ACT CTG AAT TTA AAG CTA TG R CTG TGT CAA AAT GTC ATA CAT AC	150
7/8	F GTC TCT CTG TAT GTT ATA TGT CAC R TGC GTG TTT TGA AAA ATG AGT GAG	379
9	F GCT ATT CTT GCC TTT CAT TTC AG R CAA ACT CAA CTT GAA CTC TCA TC	136

HPRT: hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase.

### 1.6 多重 PCR 反应与电泳分析

取上面提取的细胞 DNA  $0.5 \sim 2.0 \mu\text{L}$ ,  $36 \sim 50$

ng, 加入  $50 \text{ pmol}$  引物,  $50 \mu\text{L}$  反应液中含 ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ): KCl 50, Tris-HCl 10 (pH 8.8),  $\text{MgCl}_2$   $0.3 \sim 1.05$ , dNTPs 0.2, 及  $2.5 \text{ U}$  Taq DNA 聚合酶。多重 PCR (外显子 2, 5, 6 和 7/8; 外显子 3, 4 和 9) 反应条件是  $98^\circ\text{C}$  预变性 7 min 后,  $94^\circ\text{C}$  1.5 min,  $52^\circ\text{C}$  1.5 min,  $72^\circ\text{C}$  2.0 min, 循环 40 次; 外显子 1 扩增条件是  $98^\circ\text{C}$  预变性 7 min 后,  $95^\circ\text{C}$  0.5 min,  $64^\circ\text{C}$  1.0 min,  $72^\circ\text{C}$  1.0 min, 循环 30 次。最后一个 PCR 循环完成后, 继续在  $72^\circ\text{C}$  温度上延伸 5 min。扩增完成后, 取  $10 \mu\text{L}$  反应液在 3% 琼脂糖凝胶中电泳。

### 1.7 统计学分析

数据主要用  $\bar{x} \pm s$  和百分率表示, 用 SPSS 医用统计程序包 *t* 检验和总体率假设检验进行统计学分析。

## 2 结果

### 2.1 丙烯酰胺的细胞毒性及致突变性的测定

从表 2 结果可以看出, 随着丙烯酰胺染毒剂量的增加, 两种细胞死亡数量均相应地增加, 细胞接种存活率明显下降,  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  (HL-60 细胞) 或  $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $\text{NB}_4$  细胞) 以上组的接种存活率与对照组比较, 相差显著或非常显著, 说明丙烯酰胺具有较强的细胞毒性。同时, 细胞发生突变的数目也相应地增多, 突变频率逐渐升高, 两种细胞只有最大剂量  $700 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组的突变频率与对照组比较相差显著。提示丙烯酰胺只有较弱的致 *hprt* 基因突变的能力。

### 2.2 *hprt* 基因分子突变谱

突变体的电泳图谱分为四种类型: ①包含点突变的“正常型”: 电泳条带与对照相比, 数目与迁移速度都一样。②全部缺失型: 与对照相比, 所有电泳条带都没有。③部分缺失型 (包括 5' 端, 3' 端或基因内部缺失): 与对照相比, 缺少一条 (或一条以上) 的电泳条带, 或者电泳条带迁移速度加快。④插入突变型: 与对照相比, 多一条 (或一条以上) 的电泳条带, 或者虽然电泳条带数目一样, 但电泳条带迁移速度变慢。表 3 列出了自发突变与丙烯酰胺诱发突变的 *hprt* 位点的变化情况。  $300 \sim 700 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  剂量组丙烯酰胺诱导 HL-60 和  $\text{NB}_4$  细胞产生的突变谱与自发突变谱之间有明显的异同点: ①丙烯酰胺诱发突变与自发突变一样, 均无全部缺失型与插入突变型; ②部分缺失型突变所占的比例不一样, 在自发突变中仅占不足 10.0%, 而在诱发突变中却占 33.3% ~ 60.0%; ③自发突变中电泳图谱“正常型” (提示

**Tab 2. The relationship between acrylamide concentration and plating efficiency(PE), cloning efficiency(CE) or mutation frequency(MF) in two kinds of cells**

Acrylamide /mg·L <sup>-1</sup>	PE/%		CE/%		MF × 10 <sup>6</sup>	
	HL-60	NB <sub>4</sub>	HL-60	NB <sub>4</sub>	HL-60	NB <sub>4</sub>
0	96.5 ± 7.0	75.0 ± 7.2	68 ± 14	62 ± 8	7.3 ± 1.0	3.6 ± 0.4
50	57.1 ± 6.1 *	69.0 ± 6.8	67 ± 10	62 ± 7	8.3 ± 1.2	3.4 ± 0.5
100	42.2 ± 8.0 *	65.4 ± 8.9	76 ± 12	60 ± 5	10.4 ± 2.0	9.4 ± 0.7
300	14.8 ± 2.0 * *	32.4 ± 7.7 *	81 ± 11	68 ± 7	13.5 ± 3.1	11.8 ± 2.0
500	4.7 ± 0.4 * *	7.2 ± 2.3 * *	81 ± 9	56 ± 4	17.6 ± 2.2	13.5 ± 3.1
700	1.2 ± 0.2 * *	2.3 ± 0.2 * *	97 ± 8	51 ± 11	36.7 ± 3.9 * *	17.8 ± 1.5 *

The cells were coincubated with acrylamide for 6 h.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$ , \* \*  $P < 0.01$ , compared with control(0 mg·L<sup>-1</sup>) group by  $t$  test.

**Tab 3. Summary of multiplex PCR analysis of spontaneous and acrylamide-induced *hprt* mutants in two kinds of cells**

Acrylamide /mg·L <sup>-1</sup>	Number of positive clones		Partial deletion				Point mutation			
	HL-60	NB <sub>4</sub>	Number		%		Number		%	
			HL-60	NB <sub>4</sub>	HL-60	NB <sub>4</sub>	HL-60	NB <sub>4</sub>	NB <sub>4</sub>	HL-60
0	20	6	2	0	10.0	0.0	18	6	90.0	100.0
50	7	5	1	0	14.3	0.0	6	5	85.7	100.0
100	6	8	1	2	16.7	25.0	5	6	83.3	75.0
300	12	11	4	6	33.3	54.5 *	8	5	66.7	45.5 *
500	9	7	4	4	44.4 *	57.1 *	5	3	55.6 *	42.9 *
700	11	5	6	3	54.5	60.0 *	5	2	45.5 * *	40.0 *

\*  $P < 0.05$ , \* \*  $P < 0.01$ , compared with control(0 mg·L<sup>-1</sup>) group by population rates' test of hypothesis.

仅为点突变)所占的比例很高,达到 90.0% 以上,而丙烯酰胺诱发突变中所占比例只在 40.0% ~ 66.7% 范围内变动。

### 2.3 缺失位点的分布

本实验中 102 个突变体 *hprt* 基因上 9 个外显子的缺失分布归纳于表 4(不同剂量与不同细胞统计在一起)。从表上可以看出,缺失突变可以发生于 *hprt* 基因的每个外显子上(除外显子 7/8 以外);丙烯酰胺诱发突变中两个外显子同时发生缺失的比例很小,分别只占 6.7% (HL-60 细胞)和 13.9% (NB<sub>4</sub> 细胞),且未见三个以上外显子缺失连锁发生,即绝大多数是单个外显子发生缺失。比较各个 *hprt* 基因突变体缺失位点在 9 个外显子的分布情况,每个外显子的绝对缺失突变发生次数(除外显子 7/8 以外)

大体相当,不存在明显的“热点”。但是如果把整个 *hprt* 基因全长等分为 3 个部分,那么缺失突变位点在整个 DNA 序列中有明显的区域分布特点,每千个碱基对 DNA 中,3'末端出现缺失突变位点的数目分别是中段,5'末端的 1.7 倍和 2.5 倍(HL-60 细胞),1.6 倍和 4.0 倍(NB<sub>4</sub> 细胞),两种细胞情况相似。

## 3 讨论

人和啮齿类动物细胞的 *hprt* 参与细胞内嘌呤核苷酸生物合成的补救途径,它可以一些嘌呤类似物(如 6-TG 等)为底物,生成核苷-5-单磷酸,后者参入到 DNA 中将引起细胞死亡。因此,在含 6-TG 的培养基中, *hprt* 基因突变的细胞可以生长,而未产生突

变的细胞则不能存活。本实验利用 *hprt* 位点正向突变试验原理检测到丙烯酰胺具有较强细胞毒性和较弱的致突变性,二者呈反向关系,实验中还发现丙烯酰胺对 HL-60 细胞克隆效率的影响是“反常”的,随着剂量的增加不仅不相应下降,反而轻度上升,与其他处理因素的报道不相同<sup>[6]</sup>,这可能由于丙烯酰胺细胞毒性较强,细胞群体中不能抵抗丙烯酰胺毒性作用的细胞被提前淘汰所致。由于丙烯酰胺既有较强的细胞毒性又有一定的致突变作用,所以在使用过程中应该注意安全防护,减少直接接触的机会,避免造成直接损伤或遗传毒性损伤。

过去的研究发现丙烯酰胺可诱导啮齿动物骨髓细胞染色体断裂,小鼠精子和次级精母细胞的致死

性突变,还可产生可遗传的易位,特异位点突变,微核(MN)等多种类型的突变<sup>[7, 8]</sup>。我室前期应用小鼠着丝粒次要卫星 DNA 探针 FISH 和 CREST 染色方法发现,丙烯酰胺诱导的 MN 着丝粒信号阳性率可达 71.6%,既可诱导小鼠骨髓细胞染色体断片,双着丝粒染色体等结构畸变,又可诱导非整倍体形成,且后者效应更明显<sup>[9]</sup>;丙烯酰胺的致突变机理可能与剂量有关,在低剂量时主要表现为断裂剂毒性,而高剂量时主要表现为非整倍体毒性,丙烯酰胺诱导的染色体断裂可能有特异位点<sup>[10]</sup>。总之,大量的研究表明,丙烯酰胺不仅具有一定的致突变作用,而且还是潜在的致癌剂,但既有的研究资料主要是在染色体与纺锤器水平上研究丙烯酰胺的遗传损害作用。

Tab 4. Schematic diagram of the distribution of exon deletion within the nine exons of the human *hprt* gene in two kinds of cells

Exon								Mutation clone			
1	2	3	4	5	6	7/8	9	Number		%	
								HL-60	NB <sub>4</sub>	HL-60	NB <sub>4</sub>
Spontaneous mutants											
								18	6	90.0	100.0
								1	0	5.0	0.0
								1	0	5.0	0.0
Total								20	6	100.0	100.0
Acrylamide-induced mutants											
								29	21	64.4	58.3
								1	2	2.2	5.6
								1	0	2.2	0
								3	1	6.7	2.8
								2	2	4.4	5.6
								1	1	2.2	2.8
								2	2	4.4	5.6
								1	1	2.2	2.8
								2	1	4.4	2.8
								1	2	2.2	5.6
								0	1	0.0	2.8
								1	1	2.2	2.8
								1	1	2.2	2.8
Total								45	36	100.0	100.0

\* Black bar indicates deletion of an exon

以前对 *hprt* 基因突变分析多采用 DNA 杂交方法,近来 PCR 技术应用于基因突变的研究,提高了基因突变分析的精确度<sup>[11]</sup>. 本实验中采用的多重 PCR 技术由于引物对较多,易造成反应体系难于控制与优化,以及突变体可能发生外显子内部的插入与缺失,所以此技术也不是引物对“越多越好”;而且产物分子量大小也应拉开一定的距离,这样才不易发生假阳性或假阴性结果. 故本实验中 8 对引物分成 3 组分别进行多重 PCR 扩增,实验取得了良好的效果. 当然,实验中发现本方法也有其局限性,不能区分无法获得某个外显子的 PCR 扩增是真正由于外显子序列的缺失,还是由于在与所设计的引物互补部位的内含子中有突变而不能有效地进行 PCR 扩增,有一定的假阳性比例. 我们正在尝试 RT-PCR 结合 cDNA 直接测序的方法来解决这个问题.

本实验用多引物 PCR 方法共分析了两种细胞的 107 个突变克隆,通过分析 PCR 电泳图谱,发现 74 个突变细胞能扩增到所有 9 个外显子(在预定的位置上),说明这些突变细胞中无外显子缺失或插入突变,可能发生的是个别碱基的突变(点突变),其比例约占 69.2%;在另外 33 个突变细胞中检测到数个外显子缺失,表现为相应部位无扩增带出现(30.8%);没有发现 9 个外显子全缺失突变克隆,即未能扩增到任何 *hprt* 基因片段. 结果提示,丙烯酰胺诱导 *hprt* 基因突变只有较小的遗传结构改变,主要表现为点突变或单个外显子缺失,这可能与丙烯酰胺本身的损伤机理有关. 现有资料表明,对于外来化合物诱导 *hprt* 基因突变是否有“热点”的问题存在争议. 一部分人认为 *hprt* 基因的断裂位点偏向于 3'末端,而另一部分学者认为突变位点在各个外显子似乎是随机分布的<sup>[5,8]</sup>. 本研究的结果表明,由于外显子在基因 DNA 结构上的不均匀分布(偏向于 3'末端),因此这种“争议”可能不是来源于实验结果的不同,而是比较方法的不同造成的,对于这个突变“热点”问题以及相关分子机理下结论还为时过早,有待进一步深入研究揭示.

由于以 PCR 为基础的分子生物学技术的快速发展,有关人 *hprt* 基因分子突变谱的数据日益增加,为了比较这些信息,国际上目前已建立起初步的 *hprt* 基因突变谱数据库以及相对应的分析软件<sup>[11,12]</sup>. 例如 Cariello 等<sup>[13]</sup>设计的软件不仅处理数据快速简便,而且功能多样:①比较两种突变谱的异同;②显示每个外显子上可突变位点与突变的数目;

③确定突变是否有 DNA 链的偏向性;④确定转换与颠换的频率;⑤显示编码区每个碱基突变的种类与数目;⑥显示 *hprt* 基因的可突变氨基酸等. 本实验的一些结果在数据库中是首次报道. 我们将在本工作的基础上,进一步采用测序等方法研究丙烯酰胺诱导 *hprt* 基因突变的序列改变性质和具体定位,为国际合作构建 *hprt* 基因突变谱数据库提供一些有益的资料.

#### 4 参考文献:

- [1] Parry JM, Parry EM, Bourner R, Doherty A, Ellard S, O'Donovan J, *et al.* The detection and evaluation of aneuploidic chemicals[J]. *Mutat Res*, 1996, **353**(1-2):11-46.
- [2] Schmid TE, Xu W, Adler ID. Detection of aneuploidy by multicolor FISH in mouse sperm after *in vivo* treatment with acrylamide, colchicine, diazepam or thiabendazole [J]. *Mutagenesis*, 1999, **14**(2):173-179.
- [3] 刘胜学. HPRT 基因突变的分子图谱及检测方法学[J]. 国外医学·卫生学分册, 2000, **27**(1):51-56.
- [4] 刘胜学, 曹佳, 安辉, 杨明杰, 敖琳, 杨录军. 昆明山海棠对人白血病细胞 HPRT 位点的影响[J]. 第三军医大学学报, 1999, **21**(2):113-115.
- [5] Wei SJ, Chang RL, Cui XX, Merkler KA, Wong CQ, Yagi H, *et al.* Dose-dependent differences in the mutational profiles of (-)-(1R, 2S, 3S, 4R)-3,4-dihydroxy-1,2-epoxy-1,2,3,4-tetrahydrobenzo [c] phenanthrene and its less carcinogenic enantiomer[J]. *Cancer Res*, 1996, **56**(16):3695-3703.
- [6] Schriever-Schwemmer G, Kliesch U, Adler ID. Extruded micronuclei induced by colchicine or acrylamide contain mostly lagging chromosomes identified in paintbrush smears by minor and major mouse DNA probes[J]. *Mutagenesis*, 1997, **12**(4):201-207.
- [7] Ehling UH, Meuhauser-Klaus A. Reevaluation of the induction of specific-locus mutations in spermatogonia of the mouse by acrylamide[J]. *Mutat Res*, 1992, **283**(3):185-191.
- [8] Gutierrez-Espeleta GA, Hughes LA, Piegorsch WW, Shelby MD, Generoso WM. Acrylamide: dermal exposure produces genetic damage in male mouse germ cells[J]. *Fund Appl Toxicol*, 1992, **18**(2):189-192.
- [9] 胡斌, 曹佳, 程天民. 丙烯酰胺非整倍体诱发效应的荧光原位杂交和 CREST 染色的研究[J]. 细胞生物学杂志, 1997, **19**(2):80-83.

- [10] 杨明杰, 曹 佳. 丙烯酰胺诱导 NIH 3T3 细胞微核染色体的双色荧光原位杂交分析[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2000, 18(1):22-24.
- [11] Steen AM, Meyer KG, Recio L. Characterization of *hprt* mutations following 1,2-epoxy-3-butene exposure of human TK6 cells[J]. *Mutagenesis*, 1997, 12(5):359-364.
- [12] Yamada Y, Park MS, Okinaka RT, Hansk T, Chen DJ. Molecular analysis and comparison of radiation-induced large deletions of the HPRT locus in primary human skin fibroblasts[J]. *Radiat Res*, 1996, 145(4):481-490.
- [13] Cariello NF. Software for the analysis of mutations at the human *hprt* gene[J]. *Mutat Res*, 1994, 312(2):173-185.

## Molecular spectra of acrylamide-induced mutation at *hprt* locus in human promyelocytic leukemia HL-60 and NB<sub>4</sub> cell lines

LIU Sheng-Xue<sup>1</sup>, CAO Jia<sup>1</sup>, Michael M YANG<sup>2</sup>, FONG Chi-Chun<sup>2</sup>, AN Hui<sup>1</sup>

(1. Department of Molecular Toxicology, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China;

2. Department of Biology and Chemistry, City University of Hong Kong, Kowloon 83, Hong Kong, China)

**Abstract:** The genotoxicity of acrylamide was investigated by methods of single cell clone culturing, two-way screening count, multiplex PCR amplification and electrophoresis technique. Acrylamide only showed clear mutagenesis until dose 700 mg·L<sup>-1</sup> in HL-60 cells. The most frequent spontaneous mutation was point mutation(≥90.0%) and acrylamide-induced mutation mainly included partial deletion and point mutation (respectively 40.0% - 66.7%, 33.3% - 60.0%). Total gene deletion was not discovered in both of cells. There was deletion mutation in all exons of *hprt* gene(except 7/8 exon), and toward the 3' end of the *hprt* gene. The most frequent acrylamide-induced muta-

tions were point mutation and single exon deletion (93.3%, 86.1%). There was no clear difference in both of cells. The results suggest that the spectra of spontaneous and acrylamide-induced mutants are different, and the smaller changes in genetic structure have something to do with mechanism.

**Key words:** genes, *hprt*; acrylamide; mutagenesis; cell, HL-60; cell, NB<sub>4</sub>

**Foundation item:** The project supported by National Natural Science Foundation of China(39970650); Military Foundation project(98M090); the Excellent Young Teachers Program of MOE, P.R.C., (2000-81); City University of Hong Kong RCP project (9360017)

(本文编辑 乔 虹)