

文章编号:1004 - 616X(2000)01 - 0015 - 03

丙烯酰胺对人白血病细胞 HPRT 位点的影响

刘胜学,曹 佳,安 辉,周紫垣,孙华明

(第三军医大学预防医学系分子毒理实验室,重庆 400038)

摘要:目的:为了研究丙烯酰胺(AA)对人白血病 HL - 60 细胞 HPRT 位点的影响作用。方法:本研究采用 AA 水溶液对 HL - 60 细胞进行浓度梯度染毒,不同时间点进行单细胞微孔接种,在含 6 - TG 培养基中筛选突变细胞,计数阳性克隆,测定接种存活率、克隆效率和突变频率。结果:AA 染毒细胞的突变频率在处理剂量范围内具有明显的剂量 - 反应关系,在最高剂量组 (700 μ g/ml) 才有明确的致 HPRT 基因突变作用,同时发现 AA 染毒细胞的克隆效率随着剂量增加有轻度升高,这一现象可能与 AA 较强的细胞毒性有关。结论:AA 具有较弱的基因损害能力。

关键词:丙烯酰胺;HPRT 基因;致突变作用;HL - 60 细胞

中图分类号:TK730.2; 0357.5

文献标识码:A

EFFECTS OF ACRYLAMIDE ON HPRT GENE OF HUMAN PROMYELOCYTIC LEUKEMIA CELLS

LIU Sheng-xue , CAO Jia , AN Hui , ZHOU Zi-yuan , SHUN Hua-min

(Department of Molecular Toxicology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Purpose:** To investigate the effects of Acrylamide(AA) on the HPRT gene of human promyelocytic leukemia cells. **Methods:** HL - 60 cells were infected with AA with different concentrations and put into single - cell wells at different time phases. Then the numbers of positive wells were counted and the cell plating efficiency, cloning efficiency and mutation frequency were determined. **Results:** the cell mutation frequency was positively correlated to the concentration. When the dose of AA rose up to the top (700 μ g/ml), there was clear

- | | |
|---|---|
| 1985,227(4685):375 - 381. | (2): 317 - 324. |
| 2 Sagripanti JL, Kraemer KH. Site - specific oxidative DNA damage at polyguanosines produced by copper plus hydrogen peroxide. <i>J Biol Chem</i> , 1989,264(3):1729 - 1734. | 6 Dizdaroglu M, Nackerdien Z, Chao Bingchun, et al. Chemical nature of in vivo DNA base damage in hydrogen peroxide - treated mammalian cells. <i>Arch Biochem Biophys</i> , 1991,285(2):388 - 390. |
| 3 翁玉椿,王秀平,卢泳才,等. 细胞和细胞膜内过氧脂质的微量定量. <i>细胞生物学杂志</i> ,1985,7(3):142 - 144. | 7 张海涛,祝其锋,莫丽儿,等. GC/FID 检测 HL - 60 细胞 DNA 中氧化损伤产物 8 - 羟基鸟嘌呤的研究. <i>色谱</i> ,1999,17(3):262 - 264. |
| 4 陈勤. 抗衰老研究实验方法 M. 第 1 版. 北京:中国医药科技出版社,1996. 476 - 483. | 8 Michaels ML, Tchou J, Grollman AP, et al. A repair system for 8 - oxo - 7,8 - dihydrodeoxyguanine. <i>Biochemistry</i> , 1992, 31(45): 10964 - 10968. |
| 5 Dizdaroglu M, Rao G, Halliwell B, et al. Damage to the DNA bases in mammalian chromatin by hydrogen peroxide in the presence of ferric and cupric ions. <i>Arch Biochem Biophys</i> ,1991,285 | |

收稿日期:1999 - 04 - 04;修订日期:1999 - 07 - 04

基金项目:重庆市应用基础研究项目

作者简介:刘胜学(1969 -),男,山东省沂水县人,讲师,硕士,毕业后一直从事突变研究。

mutagenesis on HPRT locus. Meanwhile the cloning efficiency increased slowly to follow increasing of doses, and this phenomenon might be related with the stronger toxicity of AA. **Conclusion**: The mutagenesis of AA was inferior.

Key words: acrylamide; HPRT gene; mutagenesis; HL - 60 cell

丙烯酰胺 (Acrylamide, AA) 是一种工业絮凝剂, 广泛用于建筑、饮水净化和污水处理等企业, 实验室也常用于聚丙烯酰胺凝胶电泳等工作中, 因而是一种重要的职业接触化合物¹。近年来的许多研究表明, AA 不仅具有较强的致突变作用, 而且还是潜在的致癌剂, 但现有的研究资料主要是在染色体水平上研究 AA 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^{2,3}。因此, 本研究以 HL - 60 细胞作为实验对象, 采用单细胞克隆培养与双向筛选计数, 研究 AA 对 HPRT 位点的影响作用, 为探讨 AA 的遗传毒性及其发生机制提供一定的参考与信息。

材料与amp;方法

1 细胞培养与筛选

HL-60 细胞属人急性早幼粒白血病细胞株, 呈悬浮生长, 细胞核型 46(43 ~ 48), 倍增时间 12 ~ 16h。细胞初始接种浓度 10^4 个/ml, 37 °C、5% CO₂ 条件下培养, 2 ~ 3d 传代一次。为了降低 HPRT 位点自发突变频率, 细胞使用 HAT 选择培养基处理 24h, 换成 HT 培养基 48h, 再换成 RPMI1640 完全培养基培养 7 ~ 10d, 冻存储用。

2 主要试剂与材料

RPMI1640 培养基 (美国 Gibco 公司), 小牛血清 (杭州四季青生物工程研究所), 6-硫代鸟嘌呤 (6-Thioguanine, 6-TG, 美国 Sigma 公司), HAT 培养基 (包括次黄嘌呤、氨基嘌呤和胸腺嘧啶核苷, 中科院上海生化所); AA (美国 Sigma 公司); 96 孔细胞培养板 (美国 Corning 公司)。

3 染毒与细胞毒性测定

将指数生长期的细胞弃去培养液, 然后加入含不同浓度 AA 的不完全培养液, 染毒 6h。以含一定体积双蒸水的无血清培养基作为阴性对照, 以 50μg/ml ENU 作为阳性对照 (染毒 4h), 停止染毒后用 D-Hank's 液冲洗两次, 更换正常的完全培养液。计数细胞, 用完全培养液稀释后, 接种于无菌 96 孔培养板中, 每孔约 1 个细胞 (200μl), 每板 80 ~ 90 孔, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 7d 后计数阳性孔数, 求

细胞接种存活率 (plating efficiency, PE)。

$$PE = \frac{-\ln(\text{阴性孔数} / \text{接种孔数})}{\text{每孔接种细胞数}}$$

4 表现型表达与突变频率的测定

取表达结束后 (8d) 的 HL-60 细胞, 计数稀释后, 接种于无菌 96 孔板中, 每孔 1 个细胞, 培养 7d 后, 计数阳性克隆孔, 求出克隆形成率 (cloning efficiency, CE)。

$$CE = \frac{-\ln(\text{阴性孔数} / \text{接种总孔数})}{\text{每孔接种细胞数}}$$

同时以 1×10^4 个细胞/孔接种于 96 孔板中, 每孔 200μl 筛选培养液, 含 6-TG 1μg/ml, 37 °C、5% CO₂ 培养 8d, 计数阳性孔数, 求突变频率 (mutation frequency, MF)。

$$MF = \frac{-\ln(\text{阴性孔数} / \text{接种孔数})}{\text{每孔接种细胞数} \times CE}$$

5 数据与图形处理

全部数据使用 SPMR 医用统计程序包在计算机上进行曲线拟合, 相关分析以及总体率假设检验。图形绘制采用 Harvard Graphics 软件包。

结果

AA 对 HL - 60 细胞的毒性作用如图 1 所示。随着 AA 染毒剂量的增加, 细胞接种存活率明显下降, 符合数学模型: $Y = 75.95e^{-0.41X}$, 估计标准误 SEE = 0.281, 可决系数 $R^2 = 0.988$, $P < 0.01$, 说明细胞接种存活率与 AA 染毒剂量之间有非常显著的负相关关系。假设检验结果表明, 0.3mmol/L 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 AA 具有较强的细胞毒性。

AA 对人白血病细胞 HPRT 基因的致突变作用如图 2 所示。从图中可以看出, 细胞突变频率随着 AA 剂量的增加而逐渐上升。数据经曲线拟合, 符合以下的数学模型: $Y = 8.17e^{2.07x}$, 其中估计标准误 SEE = 0.109, 可决系数 $R^2 = 0.972$, $P < 0.01$, 说明细胞突变频率与 AA 处理剂量之间有非常显著的正相关关系。总体率假设检验结果表明, 只有实验设计中的最大剂量 700μg/ml 组的突变频率与对照组比较才相差非常显著, 其余低剂量组与对照组相比无明显

差异,说明 AA 只有较弱的致 HPRT 基因突变的能力。同时测得细胞克隆效率轻度升高,但各剂量组的克隆效率与对照组比无明显差别,结果提示,AA 处理过的细胞其克隆形成能力不仅不下降而且可能有轻度提高。

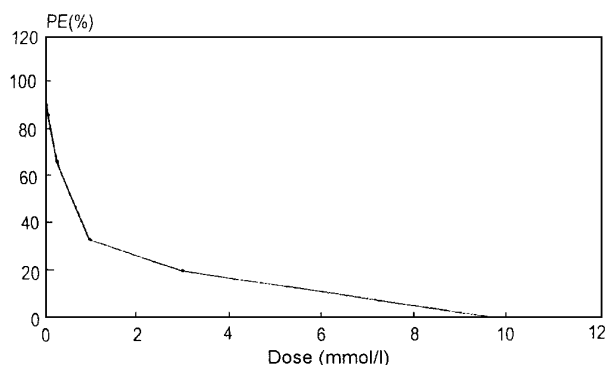


Figure 1 The relationship between plating efficiency and AA dose

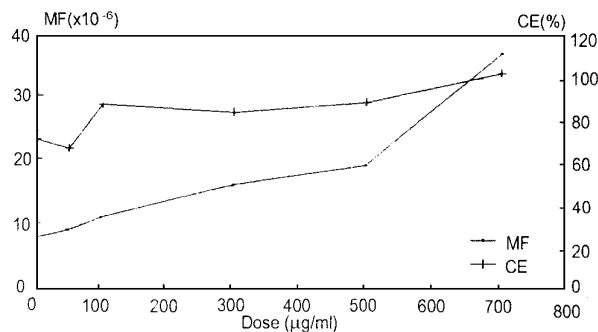


Figure 2 The relationship among mutation frequency, cloning efficiency and AA dose

讨论

人和啮齿类动物细胞的次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶 (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase, HPRT) 位点的基因产物是 HPRT,该酶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-硫代鸟嘌呤、6-巯基嘌呤及 8-氮鸟嘌呤为底物,生成核苷-5-单磷酸,后者掺入到 DNA 中将引起细胞死亡。因此,在含 6-硫代鸟嘌呤的培养基中,HPRT 位点突变的细胞可以生长,而未产生突变的细胞则不能存活⁴。本实验采用 HL-60 细胞 HPRT 位点正向突变试验检测到 AA 的细胞毒性和致突变性,发现诱变细胞的克隆效率与突变频率呈现同向关系,并得出了 AA 的剂量与 HPRT 基因突变频率的量效关系的数学模式,这一方面有利于对环境致突变剂生物危害的定量评价,另一方面使不同类型环

境致突变剂生物危害效应的定量比较成为可能。

早在 1978 年 Shiraiishi 等就发现 AA 在啮类动物骨髓细胞中能够诱发染色体断裂,随后的研究认为,它不仅诱导小鼠精子和次级精母细胞的致死性突变,还能产生可遗传的易位、特异位点突变等多种类型的突变,另外染色体畸变试验也呈阳性,表明有较强的致突变作用²。AA 诱导的微核试验也证实,处理组微核率明显升高,并随剂量的增加而增加⁵。近年来研究发现,AA 也具有非整倍体毒性^{6~8})。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,AA 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⁶。最近 Schriever-Schwemmen 等报道,AA 诱导的小鼠骨髓细胞微核着丝粒次要卫星 DNA 探针 FISH 和主要卫星 DNA 探针 FISH 的信号阳性率分别为 29% 和 28.3%,杂交信号阳性微核千分率是对照的 3 倍,表明 AA 既是一种断裂剂又有潜在的非整倍体毒⁹。我室另一项对 AA 遗传毒性的研究表明,AA 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,AA 诱导的染色体断裂可能有特异位点。总之,大量的研究表明,AA 不仅具有较强的致突变作用,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 AA 的遗传损害作用。

本实验中,6 个剂量水平 AA 处理后 HL-60 细胞存活率分别为 103.0%、85.6%、65.8%、32.9%、19.9% 和 1.3%,有非常显著的剂量反应关系。特别是随着剂量的逐渐增大,细胞接种存活率不是均匀的下降,而是先迅速降低,再平缓下降,在 0~1mM 剂量范围之内变化最为剧烈,说明小剂量 AA 就有明显的细胞的细胞毒性,这与以前有关 AA 毒性的报道相符¹,提示小剂量 AA 污染今后应引起高度重视。AA 诱导 HL-60 细胞突变频率与染毒剂量存在明显的正相关性,随着 AA 剂量的增加,细胞突变频率逐渐升高,到最高剂量 700µg/ml 组时,其突变频率与对照相比相差非常显著,结果表明 AA 不仅具有较强致染色体畸变作用,也具有较弱的致基因突变作用,这可能是 AA 在染色体畸变试验和生殖毒性试验中多为阳性结果,而在 DNA 损伤和基因突变实验中多为阴性结果的重要原因⁶。值得注意的是,被处理细胞的克隆效率随着剂量的增加不仅不相应下降、反

文章编号:1004 - 616X(2000)01 - 0018 - 05

应用蚕豆根尖微核技术和彗星试验监测扬中地表水遗传毒物污染的研究

钟远¹, 封少龙¹, 苏庆¹, 谢朝云¹, 罗屿¹, 孔志明¹, 王恒庆²

(1. 南京大学环境科学与工程系 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 江苏南京 210093; 2. 扬中市环境保护局, 江苏扬中 212200)

摘要:目的与方法:本文应用蚕豆根尖微核技术和彗星试验对扬中市不同水体的遗传毒物污染状况进行了初步调查。结果表明,扬中市的遗传毒物污染集中在汇集了乡镇工业废水和生活污水的排污河道和死水沟塘,各主要河道及通江闸口基本没有污染。对其中的新坝大桥(基本无污染)、联合粮管所塘(中轻度污染)、扬子河、红星河(严重污染)水样的有机提取物进行人外周血淋巴细胞的彗星试验,以检测其引起的DNA损伤。结果表明扬子河、红星河水样引起的DNA损伤最为严重,其次为联合粮管所塘水样,新坝大桥水样最轻,趋势与蚕豆根尖微核试验结果一致。然而彗星试验结果显示四个样点的有机提取物引起的DNA损伤与阴性对照相比均有显著差异($P < 0.01$),结论:上述结果表明彗星试验在检测遗传毒物污染方面比蚕豆根尖微核试验更为敏感。

关键词:扬中;地表水;微核试验;彗星试验

中图分类号:Q319

文献标识码:A

而轻度上升,与其它处理因素的报道不相同^{9,10},这可能由于AA细胞毒性较强,细胞群体中不能抵抗AA毒性作用的细胞被提前淘汰所致。由于AA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。

我们正在进一步采用多重PCR技术,对突变克隆DNA扩增其HPRT位点的9个外显子,以期明确突变发生的位置与性质,为深入研究AA诱导HPRT基因突变图谱与发生机制提供有益的线索。

参考文献:

- 1 贺锡雯,邓海,何凤生,等. 丙烯酰胺及其代谢产物神经毒理的研究. 卫生毒理学杂志J, 1992, 6 (2): 71 - 73.
- 2 Shiraishi Y. Chromosome aberrations induced by monomeric carylamide in bone marrow and germ cells of mice J. *Mutat Res*, 1978, 57: 313 - 316.
- 3 Alder ID, Ingwersen I, Kliesch V, et al. Clastogenic effects of acrylamide in mouse bone marrow cells J. *Mutat Res*, 1988,

206: 375 - 379.

- 4 刘毓谷. 卫生毒理学基础 M. 第2版. 北京:人民卫生出版社, 1994. 106 - 108.
- 5 Ehling DH and Meuhauer Klaus A. Reevaluation of the induction of specific-locus mutations in spermatogonia of the mouse by acrylamide J. *Mutat Res*, 1992, 283: 185 - 191.
- 6 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.
- 7 Gutierrez-Espeleta GA, Hughes LA, Piegorsch WW, et al. Acrylamide: dermal exposure produces genetic damage in male mouse germ cells J. *Fund Appl Toxicol*, 1992, 18: 189 - 192.
- 8 Alder ID, Reitmeir R, Schmoller R, et al. Dose response for heritable translocations induced by acrylamide in spermatids of mice J. *Mutat Res*, 1994, 309: 284 - 289.
- 9 Schriever-Schwemmen G. Extruded MN induced by collicione of acrylamide contain mostly lagging chromosomes identified in painbrush smears by minor and major mouse DNA probes J. *Mutagenesis*, 1997, 12 (4): 207 - 211.
- 10 Radack K. Intercorrelations and sources of variability in three mutagenetic assays: a population-based study J. *Mutat Res*, 1996, 350: 295 - 302.

收稿日期:1999 - 05 - 26; 修订日期:1999 - 09 - 12

基金项目:江苏省社会发展基金资助项目(BS97020)

作者简介:钟远(1974 -),男,广西南宁人,环境生物学专业硕士研究生,主要研究方向:遗传毒理学。