

研究报告

肺腺癌 A₅₄₉/DDP 细胞周期变化及其多药耐药性*梁兴杰 黄振华 路艳蒙¹⁾ 李玉梅²⁾ 黄有国³⁾

(中国科学院生物物理所生物大分子国家重点实验室, 北京 100101)

摘要 用 Fura 2/AM 标记药物敏感的肺腺癌细胞 A₅₄₉ 和抗顺铂药物的肺腺癌细胞 A₅₄₉/DDP 两种细胞胞内游离 Ca²⁺, 用碘化丙锭 (PI) 标记细胞 DNA, 检测其胞内 Ca²⁺ 的变化及两种细胞增殖能力和细胞周期. 实验结果表明, 抗药性细胞株 A₅₄₉/DDP 胞浆内游离 Ca²⁺ 的浓度仅为药物敏感细胞株 A₅₄₉ 的 1/3 左右, 同时前者的细胞增殖能力较后者明显增强, 而且细胞周期也明显缩短. 当用 BAPTA-AM 和 EGTA 或 A₂₃₁₈₇ 和 Thapsigargin 处理细胞以降低或升高其胞内自由 Ca²⁺ 浓度时可改变细胞的生长周期, 二者也呈现明显差别. 这些结果表明, 对顺铂产生耐药性的人肺腺癌 A₅₄₉/DDP 细胞胞内 Ca²⁺ 浓度的降低, 可能影响细胞的增殖, 缩短细胞的生长周期, 特别是影响起决定作用的 G1 期, 从而有利于肿瘤细胞多药耐药特性的维持.

关键词 多药耐药性, 胞浆内游离 Ca²⁺, 细胞周期, 肺腺癌细胞 A₅₄₉

学科分类号 Q279

恶性肿瘤对化疗的反应表现出对多种具有不同结构、功能及杀伤机制的药物疗效作用具有抗性, 这种现象称为多药耐药性 (multidrug resistance, MDR)^[1]. 目前肿瘤细胞对药物的耐药性已成为导致恶性肿瘤化疗失败的关键, 因而世界各国肺癌的发病率和死亡率仍呈居高不下的趋势.

肿瘤多药耐药性是当前基础医学和临床医学研究的热点之一. 因为人类多药耐药基因 *mdr1* 所编码的 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P170) 和/或多药耐药相关蛋白 (multidrug resistance associated protein, MRP) 在肿瘤细胞膜上的过度表达, 使进入胞内的抗癌药物被“泵”到胞外. 所以, 胞内化疗药物浓度的降低是 MDR 细胞的主要特征^[2,3]. 除了 P170 和 MRP 蛋白外, 肿瘤对化疗的抗性机制还有不同的解释^[4]. 肿瘤发生是由于细胞增殖失控, 细胞分化异常所致. 化学结构或作用靶点不同的抗肿瘤药物可以抑制肿瘤细胞的增殖, 能否抑制肿瘤细胞的增殖失控是检验抗肿瘤药物疗效的重要标志^[5]. 显然, 一些可影响细胞增殖的物理和化学因素也会参与肿瘤细胞的耐药性的调节. 近年来, 有关药物诱导凋亡的抗性或抗凋亡是否是肿瘤细胞多药耐药产生的一种新机制正受到越来越多的关注^[6]. 顺铂是广泛应用于治疗肺腺癌的有效药物并有其本身的特性, 它在治疗肿瘤中产生的多药耐药性是否与细胞增殖分化的调控相关还知之甚

少^[7]. 本文用双波长荧光分光光度测量, 酶标测定和流式细胞术检测等多种方法, 对顺铂药物敏感的 A₅₄₉ 和抗性的 A₅₄₉/DDP 肺腺癌细胞内 Ca²⁺ 和细胞周期的变化进行了研究, 以期进一步了解人肺腺癌 A₅₄₉ 细胞的多药耐药机理.

1 材料与方法

1.1 药品及试剂

Fura 2/AM 购自 Molecular Probes 公司, 用二甲基亚砜 (DMSO) 配成 1 mmol/L 储备液, 分装后置 -20℃ 避光保存. 顺铂 (cis-dichlorodiammineplatinum, cisplatin, DDP 或 CDDP), 3-[4, 5-demethylthiazolyl]-2, 5-diphenyl tetrazoliumbromide (MTT), Ryanodine, Thapsigargin 和碘化丙锭 (PI) 购自 Sigma 公司, A₂₃₁₈₇ 和 BAPTA-AM 购自 Molecular Probes 公司. RPMI-1640 培养基, 新生胎牛血清购自 GIBCO 公司, 其他试剂均为国产分析纯.

* 中国科学院重大项目 (KJ951-B1-609) 和国家自然科学基金委重点项目资助 (39730130).

¹⁾ 第一军医大学中心实验室, 广州 510515.

²⁾ 中国中医研究院基础医学研究所, 北京 100700.

³⁾ 通讯联系人.

Tel: (010) 64888518, E-mail: Huang@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2000-01-14, 修回日期: 2000-04-10

1.2 细胞系和细胞培养

肺腺癌亲代细胞系 A₅₄₉ 及其顺铂 (cisplatin) 耐药细胞系 A₅₄₉/DDP 由北京市肿瘤研究所赠送。两种细胞均培养在含有青霉素 (100 U/ml), 链霉素 (100 U/ml) 和 10% 新生胎牛血清的 RPMI-1640 的培养基中, pH 7.35。细胞于 37℃, 湿度 94%, 5% CO₂ 孵箱中无菌培养, 两种细胞均呈单层贴壁生长。该细胞在无顺铂培养基中传代 20 次, 其耐药表型仍然稳定。A₅₄₉/DDP 对顺铂药物的抗性是 A₅₄₉ 的 8 倍。取对数生长期的细胞进行实验。

1.3 细胞内游离钙离子浓度的测定与计算

分别将肺腺癌 A₅₄₉ 和 A₅₄₉/DDP 细胞用缓冲液 A (5 mmol/L KCl, 0.5 mmol/L KH₂PO₄, 137 mmol/L NaCl, 4 mmol/L NaHCO₃, 0.2 mmol/L Na₂HPO₄) 及 0.2% BSA 溶液洗涤, 并配成为 10⁵~10⁶ 个/ml 的细胞悬液。加入 Fura-2/AM (溶于无水 DMSO 中) 使终浓度为 4 μmol/L。在 37℃, 5% CO₂ 孵箱中避光保温 45 min 后, 1 000×g 离心 10 min, 弃上清。用缓冲液 A 及 2 mmol/L CaCl₂ 溶液洗涤 2 次, 并以上述溶液配成 2 ml 细胞悬液, 为负载 Fura-2 的细胞悬液。

荧光探针 Fura-2 与 Ca²⁺ 结合后的荧光变化在 F-4500 (HITACHI 公司) 荧光光谱仪上测量。激发光波长为 340 nm 和 380 nm, 发射光波长为 500 nm, 测定温度为 37℃。胞内游离钙浓度 [Ca²⁺]_i 的测定参见文献 [8], 并由仪器内装的 Ca²⁺ 浓度测定软件计算出胞内 [Ca²⁺]_i 浓度值。

1.4 细胞增殖能力的测定

参照 Supino 等^[9] 方法将 A₅₄₉ 和 A₅₄₉/DDP 细胞各自用台盼蓝染色活细胞计数法在显微镜下计数, 并接种于 96 孔板, 每孔 200 μl (含 2×10³ 个细胞), 每组 5 个重复孔, 每种癌细胞接种 3 板, 无菌培养, 每隔 24 h 在待测组每孔中加入 20 μl (10 g/L) 的 MTT, 空白对照组加 20 μl PBS, 在避光条件下继续培养 4 h。倒去孔内液体, 每孔加入 200 μl DMSO, 置 96 孔板于 Bio-Rad 3550 型酶标仪上于 595 nm 波长测定 A 值。

1.5 细胞周期的流式细胞仪分析

将经低温处理法使细胞同步化的 A₅₄₉ 和 A₅₄₉/DDP 用 PBS 悬液各配成细胞数为 1×10⁶ 个/ml, 用细吸管将其迅速喷射到 4℃ 的 70% 乙醇中, 混匀。4℃ 冰箱中固定 18 h, 取固定后的 10⁶ 个细胞用 PBS 洗 2 次, 加入 RNA 酶至终浓度为 50 mg/L 和 PI 至终浓度为 50 mg/L, 于 PBS 中配成 1 ml 细

胞悬液, 4℃ 避光染色 30 h 后, 在氩离子激光器 (Argon Laser, 2W) 为光源的 Becton-Dickinson FACS-420 型流式细胞仪上检测被 PI 标记的细胞。激发波长为 488 nm, 用 590 nm 长通滤片检测 DNA-PI 荧光, 检测期间校正仪器 CV 值为 1.5% 以内, 测量结果输入 HP-300 Consort 30 计算机进行处理, 进行细胞周期分析。

1.6 改变胞内 Ca²⁺ 浓度后细胞周期的测定

在贴壁生长处于对数生长期的 A₅₄₉ 和 A₅₄₉/DDP 细胞培养液 (其 Ca²⁺ 浓度为 1.2 mol/L) 中分别加入 Thapsigargin (终浓度为 2 mmol/L), A₂₃₁₈₇ (终浓度为 20 mmol/L), 1, 2-bis (2-aminophenoxy) ethane-N, N, N', N', -tetraacetic acid acetoxymethyl esters (BAPTA) (终浓度为 10 mmol/L) 和 EGTA (终浓度为 3 mol/L), 在 37℃ 处理细胞 24 h 后, 收集细胞, 处理过程同上 (见 1.5)。然后, 立即在 Coulter XL 型流式细胞仪上测定细胞周期。

2 结 果

2.1 抗性细胞内游离 Ca²⁺ 浓度明显降低

Fura-2 因具有较强的亲水性难以进入细胞, 当在其负性基团部位结合一亲脂的乙酰羧甲酯成为 Fura-2/AM 后, 便易透过细胞膜。在胞浆内存在的脂酶作用下, 将 Fura-2/AM 水解成为自身荧光弱的 Fura-2, 但与胞浆内游离 Ca²⁺ 的特异性结合后而形成具有强荧光的 Fura-2-Ca²⁺ 复合物, 且荧光强度与结合的 Ca²⁺ 量呈正相关, 因此, 荧光强度的增加或减少可反映胞内 Ca²⁺ 的变化。Fura-2 和 Fura-2-Ca²⁺ 复合物的最大激发波长分别为 380 nm 和 340 nm, 因此可用双激发波长荧光分光光度计测定细胞内 [Ca²⁺]_i。并用文献 [8] 所示方法计算胞内游离钙浓度 [Ca²⁺]_i。表 1 示 A₅₄₉ 和 A₅₄₉/DDP 两株细胞在静息状态下的胞内游离 Ca²⁺ 浓度。结果清楚表明, 敏感细胞株 A₅₄₉ 胞内 Ca²⁺ 浓度是耐药细胞 A₅₄₉/DDP 中的 3.1 倍, 二者之间存在显著的差异。当用专门设计测定胞内游离

表 1 A₅₄₉ 和 A₅₄₉/DDP 两株细胞在静息状态下的胞内游离 Ca²⁺ 浓度变化

细胞株	$c ([Ca^{2+}]_i) / nmol \cdot L^{-1}$
A ₅₄₉	294.86 ± 29.89
A ₅₄₉ /DDP	94.99 ± 5.74

注: $\bar{x} \pm s$, $n = 9$, $P < 0.01$ 。

Ca^{2+} 变化的 Miracal Image System 测定两株细胞内游离 Ca^{2+} 的变化时亦获得相同的结果 (数据略)。

2.2 抗性细胞的生长增殖能力明显增强

具有药物抗性的 $\text{A}_{549}/\text{DDP}$ 细胞是在 cisplatin 长期作用下反复筛选而形成的细胞株。 A_{549} 和 $\text{A}_{549}/\text{DDP}$ 两株细胞均呈单层贴壁依赖性生长, 两者分化皆较好, 细胞形态为多角不规则形, 体积较大, 胞浆丰富, 核大且圆形居中, 细胞之间粘附性高, 成膜状生长。在传代时 $\text{A}_{549}/\text{DDP}$ 比 A_{549} 细胞较不易为胰蛋白酶所消化。

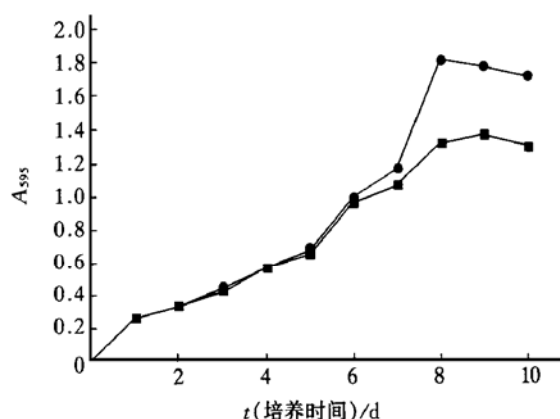


图1 A_{549} 细胞和 $\text{A}_{549}/\text{DDP}$ 细胞的生长曲线

纵坐标表示利用 Bio-Rad 3550 型酶标仪在细胞不同生长时间于 595 nm 所得到的 A 值, 其数值大小反映了细胞数量。

$n = 3, P < 0.05$. $\diamond$ — $\diamond$: A_{549} 细胞; $\bullet$ — $\bullet$: $\text{A}_{549}/\text{DDP}$ 细胞。

MTT 比色法是一种用于测定细胞增殖活性的快速、准确、半自动化的检测方法, 利用活细胞的线粒体脱氢酶类可将 MTT 转变成蓝紫色的甲臜类反应, 通过测定一定波长 (595 nm) 的光吸收可客观、真实地反映活细胞数和细胞代谢强度^[9, 10]。图 1 的结果表明, 生长到第 6 天后 $\text{A}_{549}/\text{DDP}$ 细胞的增殖明显高于 A_{549} 细胞株, 表明耐药细胞生长分裂快, 即恶性程度更高。提示具有多药耐药性的 $\text{A}_{549}/\text{DDP}$ 细胞的增殖能力较顺铂敏感的 A_{549} 细胞增强。

2.3 抗性细胞的生长周期明显缩短

图 2 表明, 在正常生长状态下药物敏感的 A_{549} 细胞株大多数处于 G1 期 (约为 $(65 \pm 6.2)\%$), S 期次之 (约为 $(26 \pm 3.8)\%$), G2/M 期最少 (约为 $(9 \pm 1.2)\%$)。而抗顺铂药物的 $\text{A}_{549}/\text{DDP}$ 细胞周期与 A_{549} 相比 G1 期细胞明显减少 (约为 $(32 \pm 2.4)\%$), S 期增多 (约为 $(54 \pm 3.6)\%$), G2/M 期也相应增多 (约为 $(14 \pm 1.8)\%$)。这说明, A_{549} 和 $\text{A}_{549}/\text{DDP}$ 两株细胞在细胞生长周期进程上

有差别。已知在细胞生长周期中, 控制细胞繁殖速度的主要是 G1 期, 生长快的细胞可很快通过 G1 期, 使 G1 期所占比例减少。因此以上结果表明具有耐药性的 $\text{A}_{549}/\text{DDP}$ 细胞其细胞周期较 A_{549} 细胞明显缩短, 这与上述用 MTT 法测得的 $\text{A}_{549}/\text{DDP}$ 细胞增殖能力的提高是一致的。

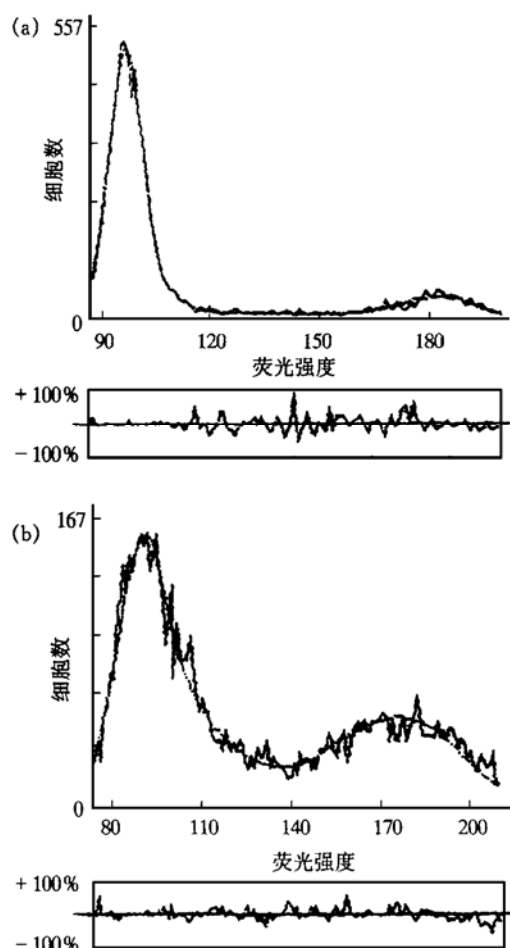


图2 A_{549} 和 $\text{A}_{549}/\text{DDP}$ 细胞生长周期变化的流式分析

(a) A_{549} 细胞; (b) $\text{A}_{549}/\text{DDP}$ 细胞。纵坐标表示细胞周期中各时期的细胞占群体总细胞数的百分比, 横坐标表示 Becton Dickinson FACS-420 型流式细胞仪在 590 nm 时检测到的被 PI 标记的细胞 DNA 的荧光强度, 其值反映了相应的细胞周期的各个不同时期。每次实验均收集 1×10^4 个细胞的荧光数据, 重复进行三次实验, 图示其中一次实验结果。

2.4 胞内 Ca^{2+} 浓度的变化改变了细胞的生长周期

上述结果表明, 抗顺铂药物的 $\text{A}_{549}/\text{DDP}$ 细胞的胞浆 Ca^{2+} 浓度明显降低, 而其细胞生长周期也明显缩短, 为了进一步了解胞内 Ca^{2+} 的变化与细胞生长周期的关系, 观察了在改变胞内 Ca^{2+} 浓度条件下两株细胞的生长周期变化。已知 Thapsigargin 可以特异地抑制内质网 Ca^{2+} -ATPase

的活性, 阻断胞内 Ca^{2+} 向内质网的转运^[11]. 而 A_{23187} 作为移动性离子载体可把胞外 Ca^{2+} 运送到胞内, 增加胞内游离 Ca^{2+} 浓度. BAPTA-AM 可以穿过细胞膜, 被胞内乙酰甲基酯酶水解为 BAPTA 的形式, 然后与胞内游离 Ca^{2+} 结合, 从而降低胞内 Ca^{2+} 浓度^[12].

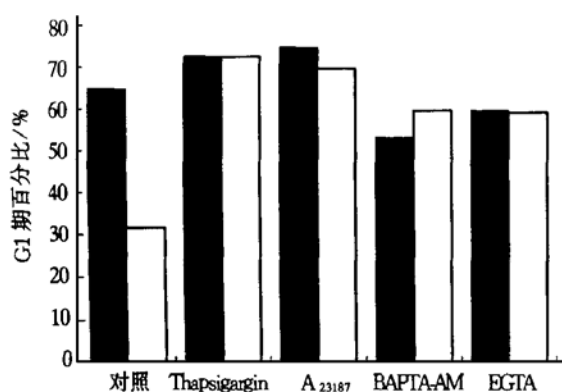


图3 胞内 Ca^{2+} 的变化对 A_{549} 细胞和 $\text{A}_{549}/\text{DDP}$ 细胞周期中 G1 期的影响

纵坐标表示细胞周期中 G1 期的细胞占群体总细胞数的百分比, 横坐标示影响 A_{549} 和 $\text{A}_{549}/\text{DDP}$ 细胞内 Ca^{2+} 变化的因素. ■: A_{549} 细胞; □: $\text{A}_{549}/\text{DDP}$ 细胞.

图3表明用上述条件分别处理 A_{549} 和 $\text{A}_{549}/\text{DDP}$ 两株细胞后, 用流式细胞仪分析的细胞生长周期变化的结果. 当 Thapsigargin 或 A_{23187} 存在的情况下, 即升高胞内游离 Ca^{2+} 浓度时, A_{549} 细胞的 G1 期百分比无明显变化, 而 $\text{A}_{549}/\text{DDP}$ 细胞的 G1 期百分比均明显增加, 即胞浆内 Ca^{2+} 的升高, 延长了 G1 期, 而用 BAPTA 或 EGTA 螯合胞内 Ca^{2+} 使其胞内 Ca^{2+} 降低时, 则 G1 期又相对缩短.

3 讨 论

细胞通过一系列时空有序的细胞内生化事件, 实现其生长、分裂、增殖的调控, 以保证细胞周期正常的有序运行. 细胞周期调控功能的失常是肿瘤细胞发生异常增殖的机制之一^[13]. Berridge 等^[14]认为正常细胞的增殖需要有 1~1.2 mmol/L 的胞外 Ca^{2+} 的存在, 缺乏外源 Ca^{2+} 的细胞不能进行 DNA 的合成和增殖. 细胞增殖对外源 Ca^{2+} 的依赖发生在 G0/G1 和 G1/S 过渡点. 胞内 Ca^{2+} 作为胞内信使分子也是细胞周期的一个重要调节因子, 在细胞周期的 G0/G1 期转换, G1/S 期转换, G2/M 期转换及 M 中期/M 后期转换等控制点处发挥作用^[15]. 但胞内 Ca^{2+} 如何调控细胞周期及其与肿瘤

抗药性的相关性研究报道不多, 其机制还不甚了解^[16]. 本文的实验结果表明, 具有抗药性的 $\text{A}_{549}/\text{DDP}$ 细胞内的 Ca^{2+} 的明显降低及其细胞周期特别是 G1 期的变化说明, A_{549} 细胞在顺铂药物长期作用下引起的胞内 Ca^{2+} 的变化也可能调节细胞周期的变化从而影响其药物的耐受性, 这对于了解肿瘤细胞的异常增殖与 Ca^{2+} 变化的相关性及其可能与抗药性的关系提供了实验证据.

Ca^{2+} 是胞内信号传递途径中重要的信使分子, 涉及胞内广泛的生物学效应. 胞内 Ca^{2+} 浓度的改变会导致细胞代谢破坏, 甚至死亡^[17]. 目前一般认为, 胞内 Ca^{2+} 浓度的升高可激活核酸内切酶导致 DNA 被降解, 并且可激活系列 Caspase 胞浆内蛋白酶, 最终促进细胞凋亡^[18]; 而阻止胞内 Ca^{2+} 浓度的升高可以阻止细胞凋亡, 降低胞内 Ca^{2+} 水平及内质网内 Ca^{2+} 水平则可抑制细胞凋亡的发展^[19,20]. 因此, 由本文的实验结果可以认为, 具有抗药性的 $\text{A}_{549}/\text{DDP}$ 细胞内游离 Ca^{2+} 较药物敏感的 A_{549} 明显降低, 可能有利于诱导抗药性的肺腺癌细胞呈现抗凋亡特性. 我们最近的初步实验结果也表明, 在相同浓度的外 Ca^{2+} 条件下, 可以观察到 A_{549} 细胞胞内 Ca^{2+} 增加和凋亡的发生, 而有抗性的 $\text{A}_{549}/\text{DDP}$ 细胞的胞内 Ca^{2+} 却降低且无凋亡发生. 综上所述, 对顺铂产生耐药性的人肺腺癌 $\text{A}_{549}/\text{DDP}$ 细胞胞内 Ca^{2+} 浓度的降低, 促进细胞的生长繁殖, 缩短细胞的生长周期, 可能使 $\text{A}_{549}/\text{DDP}$ 细胞产生抗凋亡特性, 从而有利于肿瘤细胞多药耐药特性的维持. 本文结果对肺腺癌细胞内 Ca^{2+} 的变化和细胞周期的变化及其与抗药性的相互关系提供了较好的实验证据. 有关它们的因果关系的相关研究正在深入进行.

致谢 北京市肿瘤研究所刘叙仪教授提供的肺腺癌细胞株和杨福愉院士在工作中的支持以及高锦博士的帮助, 一并表示衷心感谢.

参 考 文 献

- Garel O, Lecœur V, Guillouzo A. The P-glycoprotein multidrug transporter. *Gen Pharmacol*, 1996, **27** (8): 1283~1291
- Zaman G J, Flens M J, Vanleusen M R, *et al.* The human multidrug resistance-associated protein (MRP) is a plasma membrane drug efflux pump. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (19): 8822~8826
- Gottesman M M, Hrycyna C A, Schoenlein P V, *et al.* Genetic analysis of the multidrug transporter. *Annu Rev Genet*, 1995, **29**:

607~ 649

- 4 Simon S M, Schindler M. Cell biological mechanisms of multidrug Resistance in tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (19): 3497~ 3504
- 5 Hickman J A. Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metastasis Res*, 1992, **11** (2): 121~ 125
- 6 Johnstone R W, Cretney E, Smyth M J. P-glycoprotein protects leukemia cells against caspase-dependent, but not caspase-independent, cell death. *Blood*, 1999, **93** (3): 1075~ 1085
- 7 Daniel D, Hoff V, Elson D. Clinical results with cisplatin in lung cancer. In: Prestayko A W, eds. *Cisplatin Current Status and New Development*, New York: Academic Press, 1980. 445~ 457
- 8 Liang X J, Huang Y G. Intracellular free calcium concentration and cisplatin resistance in human lung adenocarcinoma A₅₄₉ cells. *Bioscience Reports*, 2000, **20** (3): 129~ 138
- 9 Supino R. MTT assays. *Methods Mol Biol*, 1995, **43**: 137~ 149
- 10 Freimoser F M, Jakob C A, Aebi M, *et al.* The MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide] assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65** (8): 3727~ 3729
- 11 Jan C R, Ho C M, Wu S N, *et al.* Mechanism of rise and decay of thapsigargin-evoked calcium signals in MDCK cells. *Life Sci*, 1999, **64** (4): 259~ 267
- 12 Billman G E. Intracellular calcium chelator, BAPTA-AM, prevents cocaine-induced ventricular fibrillation. *Am J Physiol*, 1993, **265** (5): 529~ 535
- 13 Lania L, Majello B, Napolitano G. Transcriptional control by cell cycle regulators: a review. *J Cell Physiol*, 1999, **179** (2): 134~ 141
- 14 Berridge M. Calcium signaling and cell proliferation. *BioEssays*, 1995, **17**: 491~ 500
- 15 Lu K P, Means A P. Regulation of the cell cycle by calcium and calmodulin. *Endocrine Reviews*, 1993, **14** (1): 40~ 58
- 16 Takuwa N, Zhou M, Takuwa Y. Calcium, calmodulin and cell cycle progression. *Cellular Signaling*, 1995, **7** (2): 93~ 104
- 17 Yang X Y, Zhang Y Z, Huang Y G, *et al.* Changes of transmembrane Ca²⁺ gradient in the formation of macrophage-derived foam cells. *Bioscience Reports*, 2000, **20** (1): 1~ 12
- 18 Michael A B, Alan E. Endonuclease activation during apoptosis: the role of cytosolic Ca²⁺ and pH. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, **186**: 782~ 789
- 19 Nicotera P, Orrenius S. The role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium*, 1998, **23**: 173~ 180
- 20 Preston G A, Barrett J C, Biermann J A, *et al.* Effects of

alterations in calcium homeostasis on apoptosis during neoplastic progression. *Cancer Res*, 1997, **57**: 537~ 542

Change of Cell Cycle and Resistance of A₅₄₉ Cells to Cisplatin. LIANG Xing-Jie, HUANG Zhen-Hua, LU Yan-Meng¹⁾, LI Yu-Mei²⁾, HUANG You-Guo (*National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;* ¹⁾ *Central Laboratory, The First Military Medical University, Guangzhou 510515, China;* ²⁾ *Institute of Basic Theory of Traditional Chinese Medicine (TCA), China Academy of TCA, Beijing 100700, China*).

Abstract The change of intracellular free Ca²⁺ in A₅₄₉ cells sensitive and A₅₄₉/DDP cells resistant to the *cis*-dichlorodiammine platinum (cisplatin) were measured by Fura-2/AM, the proliferation ability and cell cycle were measured by propidium iodide (PI) labeling cellular nuclear DNA. The results indicated that the concentration of intracellular free calcium of the sensitive A₅₄₉ cells was 2 times higher than that of the resistant A₅₄₉/DDP cells; the proliferation ability of the latter increased significantly than that of the former, the cell cycle also shortened. The proliferation ability and cell cycle of the two cell lines also clearly showed difference by decreasing or increasing their intracellular free calcium concentration if the cells were treated with BAPTA-AM or EGTA and A₂₃₁₈₇ or Thapsigargin. All of the results demonstrated that the concentration decrease of intracellular free calcium in the A₅₄₉/DDP cells resistant to cisplatin may affect the cellular proliferation, shorten the cellular cycle, which would be helpful to remain the multidrug resistance characteristics of A₅₄₉/DDP cells by specially modulating the cellular decisive G1 of cell cycle.

Key words multidrug resistance, intracellular free Ca²⁺, cell cycle, lung adenocarcinoma cancer A₅₄₉ cells