

# A549/DDP 细胞的抗凋亡特性 与其 $\text{pH}_i$ 和 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 变化相关\*

黄振华 黄有国\*\*

(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** 以临床用药剂量 (30  $\mu\text{mol/L}$ ) 的顺铂处理敏感的人肺腺癌细胞 A549 和抗顺铂的 A549/DDP 细胞, 在相同条件下培养. 对培养不同时间的两株细胞 DNA 琼脂糖凝胶电泳分析的结果表明, 前者在培养 12 h 后即呈现 DNA 梯子, 而后者在培养 48 h 后却未见凋亡特征. 用流式细胞计检测其凋亡峰也获得相似的结果. 当测定与凋亡相关的生物化学和生物物理变化时发现对顺铂敏感的 A549 细胞的线粒体膜电势显著降低, 胞内更加酸化且胞内钙离子浓度升高; 而抗顺铂药物的 A549/DDP 细胞的线粒体膜电势和 pH 值却维持在相对较高的水平, 而其胞内钙离子浓度随培养时间的延长下降. 这些结果表明, 抗顺铂的人肺腺癌 A549/DDP 细胞的抗凋亡特性与其胞内的相对碱化和较高的线粒体膜电势, 以及胞内钙离子浓度的降低相关. 这些特性可能参与了 A549/DDP 的顺铂耐药性的调节.

**关键词** 肺腺癌 A549 细胞, 细胞凋亡,  $\text{pH}_i$ ,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , 线粒体膜电势

**学科分类号** Q279

在肿瘤的化疗开始阶段, 肿瘤细胞比正常细胞对抗癌药物的反应敏感许多倍<sup>[1]</sup>, 然而在长期的化疗过程中, 肿瘤细胞却变得比正常细胞对所用化疗药物以及其他结构乃至作用机制不同的抗肿瘤药物更不敏感, 即产生多药耐药 (multidrug resistance, MDR)<sup>[2]</sup>, 它已成为化疗成功的主要障碍<sup>[3]</sup>. 最近十几年 MDR 的研究重点集中于药物泵 P-gp 或 MRP. 但基于 P-gp 和 MRP 的研究成果付诸临床实践并不能达到完满的预期效果. 目前, 一些研究提示细胞凋亡的减少可能是肿瘤细胞恶性发展的原因之一<sup>[4]</sup>, 为人们提供了思考多药耐药现象的新线索. 一定剂量范围的抗癌药物可诱导敏感的肿瘤细胞的凋亡发生<sup>[5]</sup>, MDR 细胞的抗凋亡特性可能与其能抑制胞内细胞凋亡的途径有关.

对肿瘤细胞的顺铂耐药性的生化特征变化研究还表明, 在顺铂药物长期作用下, Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> 的表达水平增加<sup>[6]</sup>, DNA 的修复能力增强<sup>[7]</sup>, 这说明受基因调控的细胞凋亡事件的抑制与肿瘤细胞维持异常增生可能相关. 因此, 探讨在抗癌药物作用下肿瘤细胞的凋亡事件变化及其特征, 对于了解肿瘤细胞是否通过抗凋亡途径以维持其细胞大量异常繁殖, 从而表现其抗药性是富于理论和实际意义的.

本文探讨了临床剂量的顺铂处理 A549 和 A549/DDP 的不同时相中, 细胞凋亡特征及其相关的生化和生物物理特性的变化, 以期进一步对人肺

腺癌细胞的抗顺铂耐药性的细胞分子机理提供新的信息.

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

顺铂 (Cisplatin), RNAase, 蛋白酶 K 购自 Sigma 公司. 2', 7'-Bis (carboxyethyl) 5, 6-carboxy-fluorescein acetoxymethyl ester (BCECF-AM), Rhodamine 123, Fluor 3/AM, 碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 购自 Molecular Probes 公司. 其他试剂均为国产分析纯.

### 1.2 细胞系与细胞培养

基本按文献 [8] 方法. 人肺腺癌细胞系 A549 及其抗顺铂的 A549/DDP 细胞系由北京市肿瘤所刘叙仪教授惠赠. 两株细胞均为单层贴壁生长细胞, 培养基为 RPMI 1640 (pH 7.35), 加入 10% 热灭活的小牛血清, 100 U/mL 青霉素, 100 U/mL 链霉素和 2 mmol/L 谷氨酰胺. 在 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 的孵箱 (Life Science, Co) 中培养. 每 2~3 天传代一次.

\* 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 (39730130).

\*\* 通讯联系人.

Tel: 010-64888518, E-mail: huang@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2000-12-27, 接受日期: 2001-02-23

按  $1 \times 10^5$  个/ml 接种, 取对数生长期的细胞进行实验.

### 1.3 顺铂作用下细胞生长曲线的测定

将 A549 和 A549/DDP 在 24 孔板上, 每孔加入 2 ml ( $2 \times 10^4$  个/ml) 细胞悬液. 待细胞贴壁之后, 在培养基内加入临床用药剂量的顺铂 ( $30 \mu\text{mol/L}$ ) 处理 4 h, 然后再换上无顺铂的培养基. 在不同的培养时间内, 用胎盼蓝染色计数活细胞数得顺铂处理后细胞的生长曲线.

### 1.4 DNA 梯子的琼脂糖凝胶电泳

取  $1 \times 10^6$  细胞,  $1\ 000 \times g$  离心 5 min, 取细胞用 PBS 洗两次, 加 500  $\mu\text{l}$  细胞裂解液 [10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA, 0.5% SDS, 蛋白酶 K (用前加)],  $50^\circ\text{C}$  水浴 3 h, 用 500  $\mu\text{l}$  酚: 氯仿: 异戊醇 (体积比为 25: 24: 1) 的抽提液抽提 3 次, 在  $6\ 000 \times g$  离心 5 min 取上清, 加入 1 ml 预冷的无水乙醇及 50  $\mu\text{l}$  3 mol/L 的乙酸钠,  $0^\circ\text{C}$  过夜.  $12\ 000 \times g$  离心 15 min, 去上清, 自然晾干, 沉淀溶于 50  $\mu\text{l}$  TE (10 mmol/L Tris-HCl, 0.1 mmol/L EDTA, 1 mol/L NaCl, pH 8.0) 中, 同时加入终浓度为 0.5 g/L 的 RNAase, 在  $37^\circ\text{C}$  消化 30 min. 以 1.8% 的琼脂糖凝胶进行 DNA 电泳.

### 1.5 胞内 $[\text{H}^+]_i$ 变化的流式细胞仪测定

取对数生长期的细胞, 在  $30 \mu\text{mol/L}$  顺铂浓度处理 4 h 后, 换成正常培养基继续培养, 并取不同培养时间的细胞, 以 Hepes 缓冲液 (25 mmol/L Hepes, pH 7.4, 140 mmol/L NaCl, 5 mmol/L KCl, 0.8 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 1.8 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ , 5.5 mmol/L 葡萄糖) 配成  $1 \times 10^6$  个/ml 的细胞悬液, 用荧光探针 BCECF-AM 于  $37^\circ\text{C}$  负载 (终浓度为  $3 \mu\text{mol/L}$ ) 细胞 30 min. 用相同的缓冲液洗 3 次之后, 于 Becton-Dickinson 流式细胞仪测胞内  $[\text{H}^+]_i$  浓度, 用氩灯在 488 nm 激发波长下测量 530 nm/640 nm 荧光强度的比值 (方法详见 Molecular Probes 手册).  $\text{pH}_i$  的校正按文献 [9], 即配制三个不同 pH (6.68, 7.26, 7.52) 的高钾 Hepes 缓冲液 (25 mmol/L Hepes, 145 mmol/L KCl, 0.8 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 1.8 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ , 5.5 mmol/L 葡萄糖), 分别悬浮细胞. 加入  $\text{H}^+$  /  $\text{K}^+$  离子通道尼日利亚菌素 (10 mg/L) 之后立即按以上方法测定 530 nm/640 nm 荧光强度的比值. 得出三个已知 pH 值的荧光强度的比值, 绘制标准曲线. 以此求出未知细胞的  $\text{pH}_i$ .

### 1.6 线粒体膜电势和胞内钙离子浓度测定

两株细胞经顺铂如上处理后, 用荧光探针 Rhodamine-123 (终浓度为  $10 \mu\text{mol/L}$ ) 测定线粒体膜电势<sup>[10]</sup>, 胞内钙离子浓度用 Fluor-3/AM (终浓度为  $6 \mu\text{mol/L}$ ) 测定<sup>[11]</sup>. 用含荧光探针的无血清 RPMI 1640 分别标记两株细胞 ( $1 \times 10^6$  个/ml), 均负载 30 min, PBS 洗三次. 于 Becton-Dickinson 流式细胞仪上在激发波长 488 nm, 发射波长 525 nm 测量荧光强度的变化.

## 2 结 果

### 2.1 顺铂对人肺腺癌细胞 A549 生长的影响

对顺铂药物敏感的人肺腺癌 A549 细胞和抗顺铂药物的 A549/DDP 细胞在培养 96 h 内的生长曲线如图 1 所示, 可以看出 A549 细胞在 48 h 之前生长迅速, 细胞数量呈线性上升, 48 h 后生长速度随培养时间的增加而减慢; 而 A549/DDP 细胞在 96 h 培养过程中一直呈现明显的增长趋势. 但当以临床用药剂量 ( $30 \mu\text{mol/L}$ ) 的顺铂药物分别处理两株细胞时, 可见 A549 细胞随培养时间增加其生长速度明显变慢, 至 96 h 时, 其细胞总数量仅为  $2 \times 10^3$  细胞; 而 A549/DDP 细胞的生长速度虽被抑制, 但相对于 A549 其生长速度仍保持较高的生长速度, 至 96 h 时, A549/DDP 细胞总数量 (约  $6.4 \times 10^4$  个) 为 A549 的 30 倍左右, 并仍处于增长趋势. 这清楚表明在临床剂量的顺铂处理条件下, 两株细胞的生长进程明显不同, 这对于分析两株细胞的凋亡变化历程提供了较好的前提.

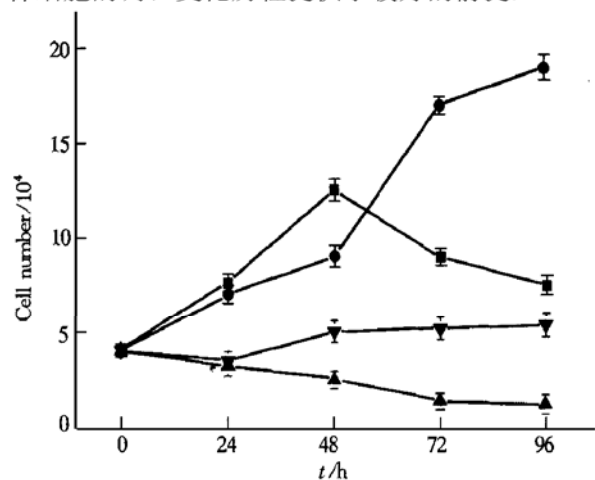


Fig. 1 Growth curve of A549 and A549/DDP treated with cisplatin ( $30 \mu\text{mol/L}$ )

■ — ■ : A549; ● — ● : A549/DDP; ▲ — ▲ : A549+cisplatin; ▼ — ▼ : A549/DDP+cisplatin.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ .

### 2.2 DNA 琼脂糖电泳结果

细胞 DNA 梯子的出现是通常检验细胞凋亡事件是否发生的一个可信的生化指标<sup>[12]</sup>。图 2 示在上述相同处理条件下两株细胞的 DNA 梯子的分析结果表明, A549 细胞在培养 12 h (图 2-6) 时即开始有凋亡特征的 DNA 梯子出现, 并随培养时间的延长 DNA 梯子的特征更趋明显。而抗顺铂的 A549/DDP 即使在用顺铂处理并培养至 48 h (图 2-2), DNA 未发生裂解无凋亡特征的 DNA 梯子出现。用流式细胞仪测定的结果也清楚的表明, 在培养至 24 h 时, A549 细胞出现明显的凋亡峰 (图略); 而培养至 48 h 的 A549/DDP 细胞也未见凋亡峰出现。这些显示细胞凋亡典型特征的实验结果说明两株细胞凋亡事件的发生不同, A549/DDP 有明显的抗凋亡特征。

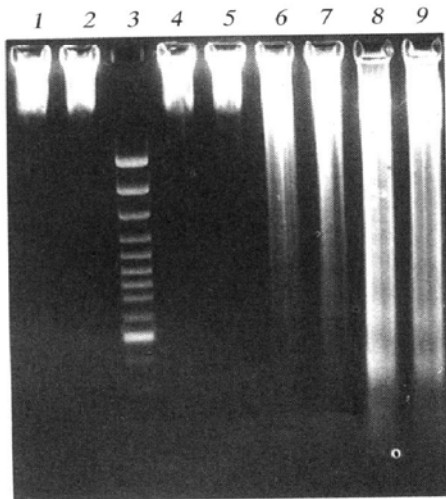


Fig. 2 Agarose electrophoresis of DNA of A549 and A549/DDP cells treated with cis-platin (30 μmol/L)

1, 2: DNA electro phoresis profiles of A549/DDP cells treated with cisplatin for 0 and 48 h; 3: the DNA marker; 4, 5, 6, 7, 8, 9: the DNA electrophoresis of A549 cells treated with cisplatin (30 μmol/L) for 0, 6, 12, 24, 36, 48 h respectively.

### 2.3 A549/DDP 的 pH<sub>i</sub> 趋于生理范围水平

BCECF-AM 是检测胞内 pH ([pH<sub>i</sub>]) 变化的灵敏荧光探针<sup>[13]</sup>。图 3 示用该探针测量的在上述相同凋亡过程中两株细胞内的 pH 变化结果。可以清楚看出, 在未用药物处理时, A549 和 A549/DDP 胞内的 pH 分别为 7.1 和 7.45。经顺铂处理后, 随培养时间的延长 A549 胞内 pH 降低的速度和程度均较 A549/DDP 快。当培养到 12 h 时 A549 胞内 pH 的发生明显的降低, 之后 pH<sub>i</sub> 继续下降, 这与 DNA 梯子出现的时相一致。而抗性的 A549/DDP

胞内的 pH 在有所下降之后还有较明显的回升趋势, 且在整个培养过程中胞内 pH 值较 A549 维持在相对较高的更近于生理范围的水平。

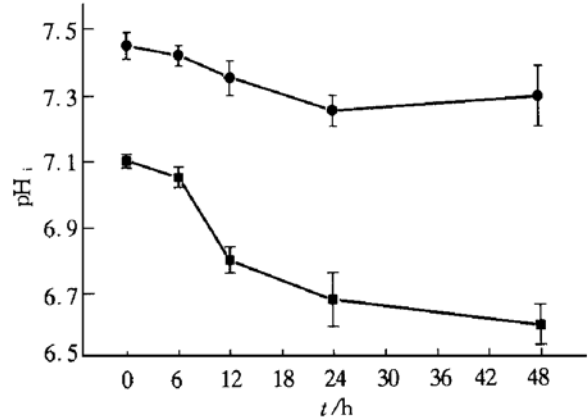


Fig. 3 Intracellular pH change with the culture times of A549 and A549/DDP cells treated with cisplatin (30 μmol/L)

### 2.4 A549/DDP 线粒体保持较高膜电势

荧光染料 Rhodamine-123 已广泛用于测定细胞或细胞器膜的膜电势的变化<sup>[10]</sup>。图 4 示在上述凋亡过程中两株细胞的线粒体膜电势的变化。可以看出, 在未用药物处理时, 两株细胞的线粒体膜电势无明显差异。用顺铂处理后 A549 细胞的线粒体膜电势随培养时间的增加其膜电势逐渐下降, 在培养至 12 h 时膜电势变化尤其明显, 这亦与 DNA 梯子的出现时相一致。A549/DDP 细胞的线粒体膜电势虽有所变化, 但其变化的相对速度和程度均较 A549 细胞明显弱。结果清楚显示, A549/DDP 的抗凋亡可能与其保持较高的膜电势密切相关。

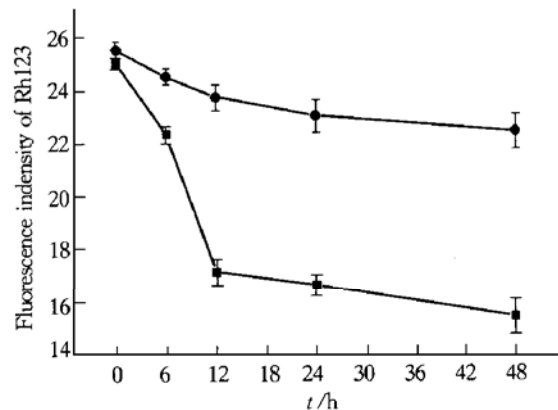


Fig. 4 Membrane potential change with the culture times of A549 and A549/DDP cells treated with cisplatin (30 μmol/L)

### 2.5 两株细胞的胞内 Ca<sup>2+</sup> 浓度的变化

Fluo-3/AM 是常用的胞内钙离子探针, 图 5 示

在未用药物之前, A549 胞内的钙离子浓度明显比 A549/DDP 高. 而且药物处理后随培养时间的增加, 两株细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  的变化也表明 A549 胞内钙离子浓度逐渐升高, 而 A549/DDP 却逐渐降低. 这亦可能暗示两株细胞内在顺铂处理后不同的时相中  $\text{Ca}^{2+}$  动态变化特征不同.

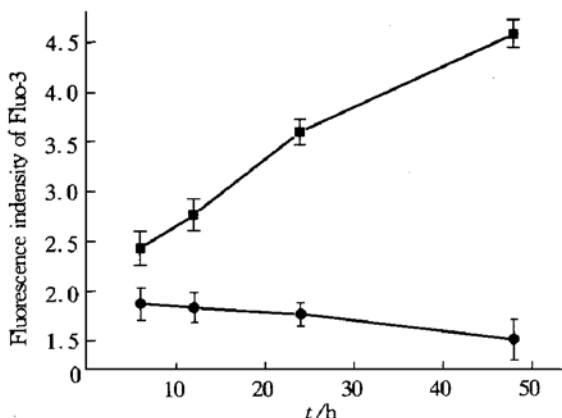


Fig. 5 Intracellular free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration change with the culture times of the A549 and A549/DDP cells treated with cisplatin (30  $\mu\text{mol/L}$ )

■—■: A549; ●—●: A549/DDP.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ .

### 3 讨 论

本文用检测 DNA 梯子和凋亡特征峰的结果清楚表明, 在临床用药剂量的顺铂 (30  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理敏感的 A549 和对顺铂抗性的 A549/DDP 细胞的条件下, 前者具有明显的凋亡特征, 在培养 12 h 和 24 h 即可分别检测出表征细胞凋亡特征的 DNA 梯子 (图 2) 和凋亡峰. 而后者在培养 48 h 后也未检测到凋亡事件的发生. 这可能表明 A549/DDP 细胞的顺铂耐药性与其在适应药物处理过程中细胞特性的改变如抗凋亡特性的形成相关.

细胞凋亡 (或程序性死亡) 是细胞生长过程中自我调控的一种方式, 它受多种因素的影响. 目前, 一般认为线粒体膜电势的降低或破坏, 是导致细胞凋亡或坏死的重要原因之一<sup>[14]</sup>. 对顺铂敏感的 A549 细胞在整个用药之后的培养过程中细胞的膜电势呈明显地下降, 且在 12 h 时膜电势的明显下降与前述的 DNA 梯子出现的时相一致. 而抗顺铂的 A549/DDP 细胞线粒体相对于 A549 一直维持较高的膜电势. 这对抗药性的 A549/DDP 细胞提供较好的能量化状态以维持其抗药性提供了生存的能量基础.

除了线粒体膜电势的变化与细胞凋亡相关外,

胞内 pH 的变化也参与细胞凋亡的调控. Barry 等<sup>[15]</sup>指出胞内的酸化可能因其激活核内依赖 pH 值变化的核酸内切酶而引起胞内 DNA 的降解. 细胞凋亡之前常有胞内的酸化<sup>[16]</sup>, 酸性的胞质环境有利于 caspase 的激活以及细胞色素 c (Cyt c) 从线粒体释放. 象 DNA 片段化等典型的凋亡事件能通过增加胞内 pH 而被抑制<sup>[17]</sup>. 本文有关两株细胞胞内 pH 值变化的实验结果清楚地表明, 对顺铂敏感的 A549 胞内 pH 值 (7.1) 较耐药性的 A549/DDP 的 pH 值 (7.45) 低. 这可能使含有两个碱性氨基的顺铂易于滞留胞内, 从而对顺铂药物表现较高的敏感性, 而且, 以临床用药剂量的顺铂处理两株细胞时, 在培养的整个过程中 A549 胞内酸化增强. 胞内  $\text{H}^+$  增加可通过激活核酸内切酶使 DNA 降解, 因而促进 A549 的凋亡事件的发生. 本文有关胞内  $\text{H}^+$  浓度变化的结果, 对近来提出的肿瘤细胞抗药性可能与细胞酸碱变化也相关的假说提供了实验证据. 应指出的是对顺铂敏感的 A549 细胞凋亡特性的明显变化与其胞内  $\text{H}^+$  浓度变化和线粒体膜电势变化的时相具有很好的一致性 (12 h). 同时, 越来越多的实验已表明细胞凋亡与胞内  $\text{Ca}^{2+}$  的升高及其诱发的特定的生化反应对细胞凋亡有重要的调控作用. 钙离子积聚可引起线粒体的功能失调并激活核中 DNA 裂解酶等从而诱发细胞的凋亡<sup>[18]</sup>. 我们曾经报道 A549/DDP 细胞在静息状态下的胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度降低<sup>[8]</sup> 以及细胞周期的改变<sup>[19]</sup> 与其耐药性相关. 本文的实验结果清楚地表明两株细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  的动态变化也呈现明显的差异, 在整个培养时间内 A549 胞内钙离子浓度明显升高, 而相同的处理条件下 A549/DDP 胞内钙离子浓度相对于 A549 者明显降低. 这表明 A549/DDP 胞内的低钙有利于防止激活与细胞凋亡相关的酶从而表现其抗凋亡特性. 本文的结果还提示耐药性的肿瘤细胞内钙离子变化与胞内 pH 以及线粒体膜电势变化的相互关系是值得深入探讨的问题.

有关肿瘤细胞抗药性与细胞凋亡的相关性研究, 目前, 在基因调控与凋亡发生的相关性方面已进行了不少研究<sup>[20]</sup>, 但其机理尚未阐明. 有关人肺腺癌细胞的顺铂耐药性形成与抗凋亡事件的相关性研究还尚未见报道. 本文实验结果对耐顺铂的 A549/DDP 细胞的抗凋亡特性与其胞内 pH 的相对碱化、胞内钙离子的降低, 以及保持相对较高的膜电势的相关性提供了较有力的实验证据, 对深入探索 A549/DDP 的顺铂耐药性的分子机制提供了新

的信息和启示。

**致谢** 对北京市肿瘤所刘叙仪教授提供人肺腺癌细胞株和杨福愉院士对此研究工作的支持以及高锦博士的帮助, 一并表示衷心感谢。

### 参 考 文 献

- Sanford S, Deborshi R, Meivin S. Intracellular pH and the control of multi-drug resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (88): 1128~ 1132
- Gottesman M M, Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochemistry*, 1993, **62**: 385~ 427
- Gottesman M M. How cancer cells evade chemotherapy: Sixteenth Richard and Hinda Risenthal foundation award lecture. *Cancer Res*, 1993, **53** (4): 747~ 754
- Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*, 1995, **267**: 1445~ 1449
- Siva C P, Oliveira C R, Lima M C P. Apoptosis as a mechanism of cell death by different chemotherapeutic drugs in human leukemic T-lymphocytes. *Biochem pharmacol*, 1996, **51** (10): 1331~ 1340
- Simonian P L, Grillot D A, Nuñez G. Bcl-2 and Bcl-X<sub>L</sub> can differently block chemotherapy-induced cell death. *Blood*, 1997, **90** (3): 1208~ 1216
- Lai G M, Ozols R F, Smyth J F. Enhanced DNA repair and resistance to cisplatin in human ovarian cancer. *Biochem Pharmacol*, 1988, **37** (24): 4597~ 4600
- 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
- Dolores P S, Dolores C E, Faustino M. Intracellular alkalinization suppresses lovastatin induced apoptosis in HL-60 cells through the inactivation of a pH-dependent endonuclease. *J Biol Chem*, 1995, **270** (11): 6235~ 6242
- Yoshihiro S, Noriaki N, Hisataka M, *et al.* Rapid loss in the mitochondria membrane potential during geranylgeranoic acid induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, **230** (1): 58~ 63
- Minta A, Kao J P, Tsien R Y. Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J Biol Chem*, 1989, **264** (13): 8171~ 8178
- Wyllie H, Keer J F R, Currie A R. Cell death: The significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*, 1980, **68** (2): 251~ 306
- Damiano A, Domenico D, Enzo W. Early cytoplasmic acidification in retinamide-mediated apoptosis of human promyelolytic leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **229** (2): 681~ 685
- Isaev N K, Zorov D B, Stelmashook E V. Neurotoxic glutamate treatment of cultured cerebellar granule cells induces Ca<sup>2+</sup>-dependent collapse of mitochondrial membrane potential and ultrastructural alterations of mitochondria. *FEBS Lett*, 1996, **392** (2): 143~ 147
- Barry M A, Reynolds J E, Eastman A. Etoposide-induced apoptosis in human HL-60 cells is associated with intracellular acidification. *Cancer Res*, 1993, **53** (10): 2349~ 2357
- Gottlieb R A. Apoptosis induced in Jurkat cells by several agents is preceded by intracellular acidification. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (2): 654~ 658
- Robinson L H. Human MDR1 protein overexpression delays the apoptotic cascade in Chinese hamster ovary fibroblasts. *Biochemistry*, 1997, **36** (37): 11169~ 11178
- Pieluigi N, Sten O. The role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium*, 1998, **23** (2~ 3): 173~ 180
- 梁兴杰, 黄振华, 露艳蒙, 等. 肺腺癌 A549/DDP 细胞周期变化及其耐药性. *生物化学与生物物理进展*, 2000, **27** (6): 616~ 620
- Liang X J, Huang Z H, Lu Y M, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2000, **27** (6): 616~ 620
- Stanley J. Korsmeyer. Bcl-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Research (Suppl.)*, 1999, **59** (7): 1693s~ 1700s

## Changes of the pH<sub>i</sub> and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> Are Responsible for the Anti-apoptotic Character of A549/DDP Cells\*

HUANG Zherr-Hua, HUANG You-Guo\*\*

(National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract** Human lung adenocarcinoma A549 cells and cisplatin-resistant A549/DDP cells were treated with clinically relevant doses of cisplatin (30 μmol/L) and then further cultured under the same conditions. DNAs of both cell lines were extracted and subjected separately to agarose gel electrophoresis. Results showed that DNA ladders could be seen in A549 cells cultured for 12 h, while no apoptotic character appeared in cisplatin-resistant A549/DDP cells even after being cultured for 48 hour. This difference between two cell lines was further confirmed by apoptotic peaks measured with flow cytometry. Biochemical and biophysical experiments indicated that the mitochondrial membrane potential and pH<sub>i</sub> of cisplatin-sensitive A549 cells decreased significantly, whereas the intracellular free Ca<sup>2+</sup> concentration increased greatly with the culture time. But the mitochondrial membrane potential and pH<sub>i</sub> remained at a relatively high level and the intracellular free Ca<sup>2+</sup> concentration was

reduced gradually with the culture time for cisplatin-resistant A549/DDP cells. It would be suggested that the anti-apoptotic character of A549/DDP cells is related with the relative intracellular basification, the persistence of mitochondrial membrane potential and decrease in intracellular free  $Ca^{2+}$  concentration which would be responsible for the resistance of A549/DDP cells to cisplatin.

**Key words** A549 cells, apoptosis,  $pH_i$ ,  $[Ca^{2+}]_i$ , mitochondrial membrane potential

\* This work was supported by grants from National Natural Science Foundation of China (39730130) and Key Research Project of The Chinese Academy of Sciences (KJ951-B1-609).

\*\* Corresponding author. Tel: 86-10-64888518, E-mail: huang@sun5.ibp.ac.cn

Received: December 27, 2000 Accepted: February 23, 2001

## mas 双向启动子

郑成超 刘石娟

(山东农业大学生命科学学院, 泰安 271018)

农杆菌 Ti 质粒上存在甘露碱合成酶 (mannopine synthase) 基因 *mas1'* 和 *mas2'*, 两基因之间 479 bp 的间隔区即为由 *mas1'* 和 *mas2'* 基因共用的双向启动子。由于 *mas* 启动子长度较短, 且在各种类型的植物中能够高效表达, 所以可用于许多植物基因表达载体的构建。

为确定 *mas1'* 启动子不同区段的作用, 将不同缺失长度的 *mas1'* 启动子与 GUS 报告基因融合。在转基因烟草中发现, 随着 *mas1'* 启动子片段的缩短, GUS 活性表达水平反而提高, 但当缺失至 -58 时便没有了活性。表明有多个 DNA 元件调节 *mas1'* 启动子的活性。进一步分析发现, 在 -100~-58 之间存在一个正调控元件, -100 bp 以上的上游序列中则至少含有两个负调控元件, 它们抑制 -100~-58 之间正调控元件的作用, 从而使 *mas1'* 转录活性降低。精细的序列分析证实, 在 -100~-58 之间的区域中有一个 20 bp 的对基因表达起重要作用的 *ocs* 元件。这表明, 对于 *mas1'* 启动子, 提高基因转录活性最主要的是 -100 至 -58 区段, 它包含有 A/T 富含区和 *ocs* 元件。

利用内部缺失策略研究发现, -293~-263 之间存在阻遏蛋白结合序列, 去掉该序列, *mas1'* 启动子转录活性大大增加。在 -262~-161 内含有 a、a' 和 a'' 三个回文结构, 这三个回文结构相继缺失, 会导致 *mas1'* 活性的逐渐下降。因此, a、a'、a'' 回文结构对维持 *mas1'* 活性有重要作用。

当 *mas2'* 启动子序列缺失至 -318 时, 能够检测到较高的转录活性; 缺失至 -138 时, 转录活性较低; 缺失至 -57 时, 则不能转录。序列分析表明, -318 至 -215 区段起关键作用, 此区段可分为三个区域, 即区域 I (-318~-298)、区域 II (-298~-284)、区域 III (-283~-215)。该区域不仅含有 *ocs* 元件序列, 而且含有 A/T 富含区。表明 *ocs* 元件和 A/T 富含区对 *mas1'* 和 *mas2'* 基因的转录活性是非常重要的。同样, 回文序列 a、a' 和 a'' 对维持 *mas2'* 的活性也起重要作用。新近实验发现, -186~-90 区段作为 *mas1'* 活性的增强子恰好是 *mas2'* 活性的抑制子, 而 -343~-256 和 -271~-172 两个区段作为 *mas1'* 活性的抑制子序列又是 *mas2'* 活性的增强子。

用多种植物材料实验均发现, *mas2'* 启动子的基因转录活性远远高于 *mas1'* 启动子, 可达 7~8 倍。这可能是因为 *mas2'* 启动子含有一个抑制子和两个增强子, 而 *mas1'* 启动子含有两个抑制子和一个增强子所致。总之, *mas* 启动子含有六个重要区段, 即一个 A/T 富含区、两个 *ocs* 元件和三个回文结构, 它们均对 *mas* 基因的转录具有重要作用, 其中两个 *ocs* 元件的作用可以相互补充。但在构建高效启动子时, 应当尽量减少 *mas* 启动子序列在空间和方向上的改变, 维持其原有构型, 并应首先考虑利用 *mas2'* 启动子。