

荷人肺癌裸鼠上肿瘤细胞 Bcl-2 表达及其活性生物时间节律差异 *

王志东 刘湘国[△] 洪秀琴 田晓彩 孔春初

(湖南省老年医院肿瘤内科 湖南 长沙 410016)

摘要 目的 探索荷人肺癌裸鼠上肿瘤细胞 Bcl-2 表达及其活性生物时间节律差异。方法 体外培养 A549 人肺癌细胞系 移植到裸小鼠身上 ,10 天成瘤后 随机分为 6 大组 ,每组再分 2 小组 ,每组 4 只 ,一组不给任何处理 ,设为对照 ,各组小鼠分别于光照后不同时间点取肿瘤细胞制成细胞悬液 ,固定染色后 ,用流式细胞仪以每个样品检测 10000 个细胞的数量检测单个细胞的荧光强度 ,用流式细胞仪检测细胞周期情况 ,单因素方差分析法检验各期细胞在 6 个时间点差异的显著性 ,用 Cosinor 法考察 G1、S、G2、M 期细胞在 24h 的分布是否符合余弦函数 ,即是否有时辰节律。按 6 个时间点取的肿瘤细胞 ,匀浆后裂解细胞 ,Western Blot 法测定 Bcl-2 的表达。结果 1. 结果发现肿瘤的生长曲线高峰出现在睡眠期中点 ,其次在活动期中点 ,G1、S、G2 期细胞变化符合余弦节律 2. Bcl-2 的表达在光照后 7h 和 19h 达到峰值 ,变化趋势与肿瘤细胞的周期性改变一致。结论 荷人肺癌裸鼠上肿瘤细胞的细胞周期可能随昼夜交替呈节律性变化 ,Bcl-2 的表达变化与肿瘤细胞的节律性改变一致。

关键词 荷人肺癌裸鼠 ;Bcl-2 ;生物时间节律

中图分类号 :R734.2 文献标识码 :A 文章编号 :1673-6273(2012)25-4829-04

The Difference of Expression and Activity Circadian Rhythm of Bcl-2 in Tumor Cells of Nude Mice Bearing Lung Adenocarcinoma*

WANG Zhi-dong, LIU Xiang-guo[△], HONG Xiu-qin, TIAN Xiao-cai, KONG Chun-chu

(Medical Oncology department, Gerontological Hospital of Hunan Province, Changsha, Hunan, 410016, China)

ABSTRACT Objective: To explore the difference of the expression of Bcl-2 in tumor cells of nude mice bearing lung neoplasm and its activity circadian rhythm. **Methods:** Transplanted the A549 lung neoplasm cell lines which were cultured *in vitro* to nude mice. After tumorigenesis in 10 days, they were divided into 6 groups randomly. And then, every group was subdivided into 2 groups, with 4 mice each. One group served as control, and did not receive any treatments. As for other groups, the tumor cells of each group were made into cell suspension at different time points after irradiation. After fixing dye, 10000 cells in each sample were made out to detect single cell fluorescence intensity and the cell cycle by flow cytometry. Changes at six time-points of cells at each stage were detected by Single factor variance analysis test. The Cosinor method was used to investigate whether the distribution of cells in G1, S and G2, M phases during the 24h have a cosine function, that is, have an hour rhythm or not. Western Blot Determination was used to detect the Bcl-2 expression of tumor cells at six time-points after homogenate and lysis. **Results:** 1 The results showed that the tumor growth curve peaked in the sleep period mid-points, followed by mid-term point in the activity; cell changes at G1, S, and G2 stages are consistent with a cosine rhythm; 2 Bcl-2 expression reached peak at 7h and 19h after light, and changing trends were consistent with the cyclical nature of tumor cells. **Conclusion:** Tumor cells in nude mice bearing human lung cancer may have a cell cycle with rhythmic changes depending on day and night alternation. The expression of Bcl-2 changes with the rhythm of the tumor cells.

Key words: Nude mice bearing human lung cancer; Bcl-2; Circadian rhythm

Chinese Library Classification(CLC): R734.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)25-4829-04

时间生物学是研究机体乃至单细胞活动的生物节律及其时间结构和应用的科学 ,是一门新兴的交叉性生命科学的边缘科学^[1]。"生物钟"成为近代生命科学领域的研究热点 ,SCIENCE 指出 : "这种突破将产生重大社会效益和经济效益"。研究表明恶性肿瘤细胞与机体正常细胞的代谢活动 ,在昼夜中均有明显的时间位相差异。最主要的是 24 小时昼夜节律^[2-4]。为肿瘤的发生、发展及诊断提供了新的思路和方法。临床上肺癌的

药物治疗 ,在不能手术的中晚期肺癌中仍占非常重要的地位 ,但骨髓抑制和粘膜毒性等剂量限制性毒性明显 ,因此如何减毒增效成为研究热点。肺癌细胞活动的生物节律如何 ,其产生对抗药物作用的蛋白质表达时辰规律怎样等问题亟待解决。本文针对支气管肺癌的时间生物节律和时辰化疗的有关的基本参数进行基础方面的研究。根据肿瘤细胞及耐药基因表达的生物节律 ,探索选择合理用药时相 ,以达到减少毒性、提高疗效及改

* 基金项目 湖南省自然科学基金项目(11JJ5037) 湖南省科技厅计划项目(2009JT3053)

作者简介 王志东(1971-) 男 ,副主任医师 ,主要从事胸部恶性肿瘤时间生物医学和基因治疗研究。

电话 1(0731)13332522000 E-mail:jifeng19711971@sina.com

[△]通讯作者 刘湘国(1960-) 男 ,主任医师 ,主要从事肝脏肿瘤临床治疗研究。电话 1(0731)84731758,E-mail 513288581@qq.com

(收稿日期 2012-02-15 接受日期 2010-03-12)

善生存质量的可能。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

A549 人肺癌细胞的培养：将 A549 细胞用含 10% 灭活的小牛血清、100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素、100U/mL 青霉素的 DMEM 培养基调整为 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 接种于培养瓶中，置于 5% CO_2 饱和湿度，37℃ 培养箱中进行传代培养。

1.2 模型制作

BALB/c 裸小鼠由中山医科大学实验动物中心繁殖传代(实验动物合格证：医动字第 26-99A033 号 BALB/C)。饲养条件：恒温、隔音、空气层流过滤。

48 只 BALB/c 裸小鼠置于空气层流、隔音、恒温的并有 24 小时程控的光照调节的饲养柜中，在 12 小时光照、12 小时黑暗的同步化 3 周。将人肺癌细胞株 A549 移植到裸小鼠身上，10 天成瘤后，随机分为 6 大组，每组再分 2 小组，每组 4 只，一组不给任何处理，设为对照，各组小鼠分别于光照后第 3、7、11、15、19、23 小时 6 个时间点取骨髓细胞、肿瘤细胞制成细胞悬液，用流式细胞仪以每个样品检测 10000 个细胞的数量检测打靶细胞的荧光强度，从而得出每个样本的细胞周期(G1、S、G2+M)百分比。每组取 3 个样本，取其平均值。分别得出骨髓细胞和肿瘤细胞在不同时间的 DNA 含量。

1.3 模型制作

在上述时间点取的肿瘤细胞，匀浆后裂解细胞，测定蛋白；用抗 Bcl-2 的抗体，用以 β -actin 作内标 Western Blot 法测定蛋白在不同时间点的表达，结果用图像分析软件 ImageJ 计算其积分光密度，最后通过比较不同时间点的积分光密度来确定是否存在差异。

1.4 统计处理

所得数据用 ANOVA(单因素方差分析)法分析组间是否存在差异，Cosinor(余弦分析)法分析节律变化模式，得到平均值、振幅和峰值时间。

2 结果

2.1 肿瘤细胞在不同时间的 DNA 含量

各时间点肿瘤细胞流式细胞仪检测结果如图 1、2 所示，在 3、7、11、15、19、23HALO，G1 期细胞分布的峰值在 3HALO，余弦分析结果：Amplitude= $(10 \pm 2.11)\%$ ，Acrophase= $12 \pm 1.78\text{HALO}$ ， $P < 0.01$ ；G2 期细胞分布的峰值在 11、19HALO，余弦分析结果：Amplitude= $(5 \pm 0.32)\%$ ，Acrophase= $8 \pm 2.78\text{HALO}$ ， $P > 0.05$ ；S 期细胞分布的峰值在 7、19HALO，余弦分析结果：Amplitude= $(28 \pm 3.45)\%$ ，Acrophase= $12 \pm 3.48\text{HALO}$ ， $P < 0.01$ ，其中 3 与 7HALO β 与 15HALO β 与 19HALO 相比，有显著性差异， $P < 0.05$ 。

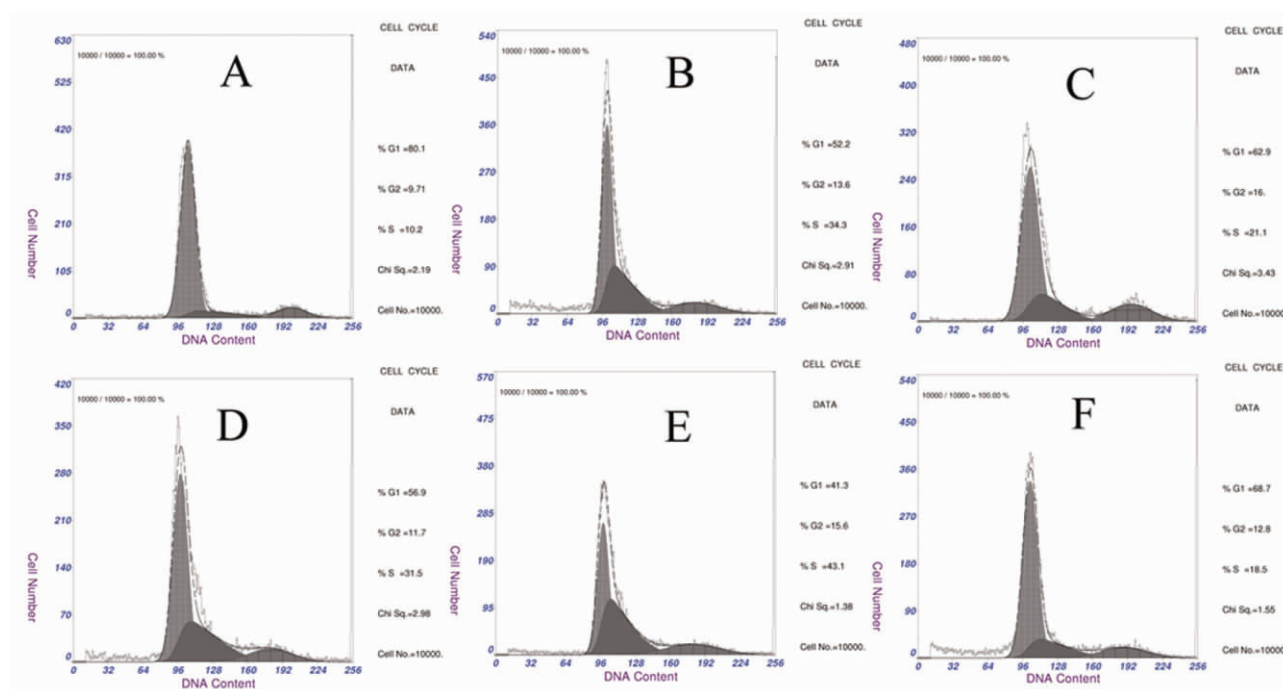


图 1 不同时间点肿瘤细胞流式细胞仪检测结果

Fig. 1 Flow cytometry detection results of tumor cells at different time-points

A, B, C, D, E, F 分别为光照后 3, 7, 11, 15, 19, 23h 细胞周期分布结果。

A, B, C, D, E, F respectively represented the results of cells at 3, 7, 11, 15, 19, 23h after light.

2.2 荷人肺癌裸鼠上肿瘤细胞 Bcl-2 不同时间表达结果

取肿瘤细胞提取蛋白后，Western 法测定 Bcl-2 在不同时间点动物肿瘤细胞上的表达，结果如图 3、4 所示：Bcl-2 蛋白的

表达峰值在 7、19HALO，且与 3HALO 比较，差异具有统计学意义， $P < 0.05$ 。

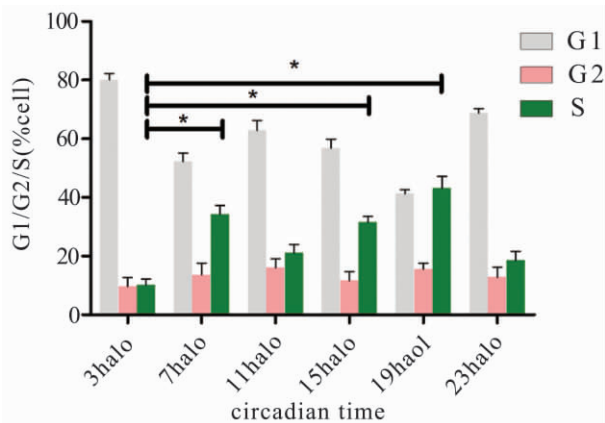
图2 肿瘤细胞在不同细胞周期时相分布的节律变化 *: $P<0.05$

Fig. 2 Circadian rhythm of tumor cells at different stages

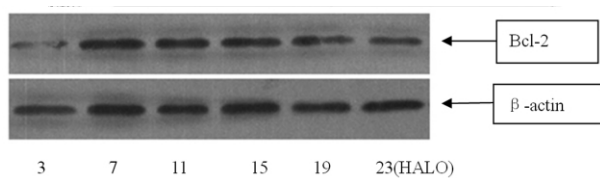


图3 不同时间点肿瘤细胞 Bcl-2 蛋白表达结果

Fig. 3 Expression of Bcl-2 tumor cells at different time-points

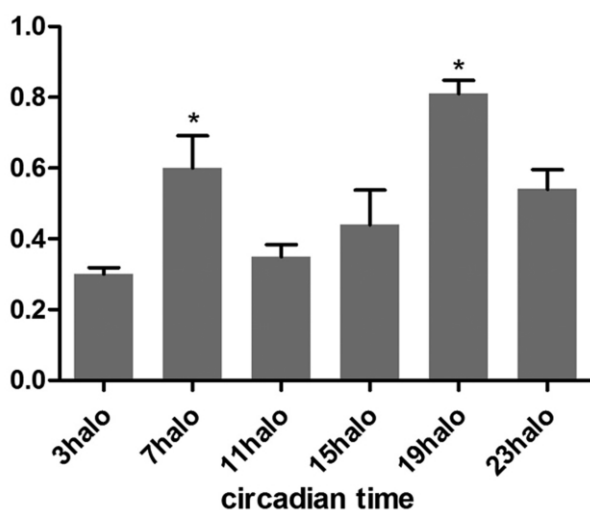
图4 不同时间点肿瘤细胞 Bcl-2 蛋白表达结果灰度值分析 $P<0.05$

Fig. 4 Gray level analysis on the Bcl-2 expression of tumor cells at different time-points

3 讨论

肺癌发病率居恶性肿瘤首位,非小细胞(型)肺癌(nonsmall-cell lung cancer, NSCLC)占大部分,1年生存率不足30%。以顺铂为主的化学治疗在不能手术的中晚期肺癌中仍占非常重要的地位,但骨髓抑制和粘膜毒性等剂量限制性毒性明显,因此如何减毒增效成为研究热点。如果“生物钟”理论引入肿瘤治疗中,认真探讨肺癌生物节律特征,并根据肿瘤组织与正常组织之间生物节律的差异,结合药代动力学节律变化,寻找治疗的最佳时间窗,提高其时间靶向性,有可能将疗效进一步提高。

目前发现下丘脑视交叉上核存在调节生物节律的中枢生物钟基因,形成昼夜节律的起搏点。生物钟影响骨髓细胞DNA的合成,甚至影响肿瘤的生长^[5-7]。本实验中肿瘤细胞DNA的合成周期分布与昼夜节律密切相关,肿瘤的生长曲线高峰出现在睡眠期中点,其次在活动期中点,G1、S、G2期细胞变化符合余弦节律。这一结果与You S等人^[8]的研究相一致。学者们接种癌细胞至小鼠,分析昼夜六个时间相小鼠肝脏细胞的钟基因的表达。结果发现肿瘤的生长曲线高峰出现在睡眠期中点,其次在活动期中点。但肿瘤细胞内的钟基因却失去了生理的节律变化。这一结果证实肺癌细胞的DNA合成受生物钟节律调控,有规律可循。可提供有效的药物治疗时间靶向性。

参与药物代谢的酶活性与相应的药物血药浓度呈反比,由于这些酶的活性呈现明显的昼夜节律变化,药物的疗效与毒性也必然随昼夜变化而节奏性的波动^[10,11]。目前,包括30种抗癌药物在实验鼠类中被证实24小时昼夜节律中剂量波动范围达50%,其中包括药物代谢动力学的变化^[12,13]。根据宿主、靶组织生物节律的变化,结合药物代谢及动力学资料,选择最佳用药时间,预料可使药物达到最大效能,对机体产生最小毒性。通过药物抑制BCL-2在肺癌患者血清和癌组织中的表达,可以使顺铂等肺癌治疗药物的药效大幅提高。

Bcl-2是近来发现的凋亡调控因子,其水平的高低与肿瘤细胞对多种化疗药物的敏感性和耐受性的大小一致。实验表明Bcl-2过量表达可使细胞更有效地耐受顺铂的作用。这可能为临床提供提高化疗药物敏感性提供一定的依据^[14,15]。作为通过调控生理性细胞死亡而表现出肿瘤细胞的耐药作用的Bcl-2,被定义为新的耐药基因。如果能证实Bcl-2的表达具有独特的时间节律,并且可以操控,将可能逆转耐药的肿瘤细胞,从而提高其化疗敏感性。本实验结果表明,Bcl-2蛋白的表达与肿瘤细胞DNA的周期性表达存在一致性,具有一定的时间节律,这与学者^[9]在小鼠实验中研究docetaxe的时辰药理学,发现的骨髓细胞Bcl-2的表达与骨髓细胞合成期的G1期同步,均具有时辰节律性,峰值与该药的最大耐受性平行的规律相符合。可以推测通过药物抑制BCL-2在肺癌患者血清和癌组织中的表达,可以使顺铂等肺癌治疗药物的药效大幅提高。

参考文献 (References)

- [1] Zeng ZL. Circadian rhythm in dihydropyrimidine dehydrogenase activity and reduced glutathione content in peripheral blood of nasopharyngeal carcinoma patients[J]. Chronobiol Int, 2005, 22(4): 741-754
- [2] Eriguchi M, Levi F, Hisa T, et al. Chronotherapy for cancer[J]. Biomed Pharmacother, 2003, 57(Suppl 1): 92-95
- [3] Mormont MC, Levi F. Cancer chronotherapy: principles, applications, and perspectives[J]. Cancer, 2003, 97(1): 155-169
- [4] Moser M, Schaumberger K, Schernhammer E, et al. Cancer and rhythm[J]. Cancer Causes Control, 2006, 17(4): 483-487
- [5] Wood PA. Circadian clock coordinates cancer cell cycle progression, thymidylate synthase, and 5-fluorouracil therapeutic index [J]. Mol Cancer Ther, 2006, 5(12): 3312
- [6] Zheng X, Sehgal A. Probing the relative importance of molecular oscillations in the circadian clock[J]. Genetics, 2008, 178(3): 1147-1155
- [7] Dardente H. Synchronization and genetic redundancy in circadian clocks[J]. Med Sci (Paris), 2008, 24(3): 270-276

- [8] You S. Daily coordination of cancer growth and circadian clock gene expression[J]. Breast Cancer Res Treat, 2005, 91(1): 47-60
- [9] Lévi F. Circadian chronotherapy for human cancers[J]. Lancet Oncol, 2001, 2(5): 307-315
- [10] 袁源, 刘保安. 昼夜节律与肿瘤的相关研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2009, 9(5): 976-978
Yuan Yuan, Liu Bao-an. Advances in the Relationship between Circadian Rhythm and Cancer [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2009, 9(5): 976-978
- [11] 赵越, 张建法. 生物节律影响巨核细胞发育和血小板产生的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(20): 3958-3960
Zhao Yue, Zhang Jian-fa. Effects of Biological Rhythm on Megakaryocyte Development and Platelet Formation [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2011, 11(20):3958-3960
- [12] Pati AK, Parganiha A, Kar A, et al. Alterations of the characteristics of the circadian rest-activity rhythm of cancer in-patients [J]. Chronobiol Int, 2007, 24(6): 1179-1197
- [13] Blask DE, Sauer LA, Dauchy RT. Melatonin as a chronobiotic/anti-cancer agent: cellular, biochemical, and molecular mechanisms of action and their implications for circadian-based cancer therapy[J]. Curr Top Med Chem, 2002, 2(2): 113-132
- [14] 张志勇, 彭耀金. Bcl-2 与急性白血病患者骨髓组织血管新生的关系[J]. 肿瘤药, 2011, 1(6): 08-11
Zhang Zhi-yong, Peng Yao-jin. Relationship of BCL-2 with bone marrow angiogenesis in patients with acute leukemia [J]. Anti-tumor Pharmacy, 2011, 1(6): 08-11
- [15] Zhong Ling, Yuan Li-ming. The impact of Xuefu Zhuyu Decoction on the Expression of Estrogen Receptor and BCL-2 in Hysteromyoma [J]. Anti-tumor Pharmacy, 2012, 2(1): 34-36

(上接第 4828 页)

- [12] Cristofari G, Lingner J. Telomere length homeostasis requires that telomerase levels are limiting[J]. Embo J, 2006, 25(3): 565-574
- [13] Sakamoto O, Toyozumi T, Kikuchi Y, et al. Telomerase activity in gynecological tumors[J]. Oncol Rep, 2000, 7(5): 1003-1009
- [14] Parkinson EK, Minty F. Anticancer therapy targeting telomerase and telomerase: current status[J]. BioDrugs, 2007, 21(6): 375-385
- [15] Crookes RE, Dyson M, Smith JF, et al. Detection of human telomerase gene (TERC) amplification in cervical neoplasia: a retrospective study of 50 patients with normal smears or mild or moderate dyskaryosis[J]. Cytopathology 2007, 18(s1): 16-16
- [16] Heselmeyer H, Sommerfeld K, White NM, et al. Genomic amplification of the human telomerase gene (TERC) in pap smears predicts the development of cervical cancer [J]. Am J Pathol, 2005, 166 (4): 1229-1238
- [17] Sui WG, Ou ML, Dai Y, et al. Gain of the human telomerase RNA gene TERC at 3q26 is strongly associated with cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma [J]. Int J Gynecol Cancer, 2009, 19 (8): 1303-1306
- [18] Tua Z, Zhang A, Wu R, et al. Genomic amplification of the human telomerase RNA gene for differential diagnosis of cervical disorders [J]. Cancer Genet Cytogen, 2009, 191(1): 10-16
- [19] 魏力, 刘冬涌, 蒋宏韵. 荧光原位杂交法检测宫颈脱落细胞端粒酶基因及其与人乳头瘤病毒感染的相关性[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2010, 26(05): 368-370
Wei Li, Liu Dong-yong, Jiang Hong-jie. The study of the relationships between hTERC gene of the women and human papillomavirus with cervical lesions by FISH [J]. Chinese Journal of Practical Gynecology and obstetrics, 2010, 26(05): 368-370
- [20] Francesc A, Blanca E, Cristina C, et al. 3q26 (hTERC) gain studied by fluorescence in situ hybridization as a persistence-progression indicator in low-grade squamous intraepithelial lesion cases [J]. Human Pathology, 2009, 40: 1474-1478