

基础研究

DOI: 10.11699/cyxb20130726

口腔鳞状细胞癌体内生长的昼夜生物节律特征

杨 凯,赵宁波,陈 丹,赵 丹,唐 洪,赵春蓉

(重庆医科大学附属第一医院口腔颌面外科,重庆 400016)

【摘要】目的:探讨口腔鳞状细胞癌体内生长的昼夜生物节律改变特征。**方法:**32 只裸鼠置于 12 h 光照、12 h 黑暗交替的环境中,将人颊鳞状细胞癌 BcaCD885 细胞接种于裸鼠颊部,建立颊鳞状细胞癌模型,3 周后在 24 h 内,按灯亮后 4、10、16、22 h 4 个时间点分别处死 8 只裸鼠时间以开灯后的小时数为参考(hours after light onset,HALO),即 4 HALO、10HALO、16HALO、22HALO。取出肿瘤测量体积,用流式细胞仪测定肿瘤细胞的增殖指数(proliferation index,PI)和凋亡指数(apoptosis index,AI)。用余弦分析法检验肿瘤体积、肿瘤细胞 PI 和 AI 是否具有昼夜节律性,用方差分析各指标在 4 个时间点差异的显著性。**结果:**肿瘤体积和肿瘤细胞 PI 具有明显的昼夜节律变化特征,肿瘤体积在不同时间点的差异具有统计学意义,肿瘤体积的峰值和谷值分别出现在 3.23HALO、15.23HALO,肿瘤细胞 PI 的峰值和谷值分别出现在 6.60HALO、18.16HALO。肿瘤细胞的 AI 无昼夜节律性,但在不同时间点差异具有统计学意义。**结论:**体内生长的口腔鳞状细胞癌的细胞增殖活性和肿瘤体积具有昼夜节律变化特点,肿瘤体积和细胞 AI 在昼夜不同时间点差异变化较大。

【关键词】口腔;癌;鳞状细胞;生物节律;增殖;凋亡

【中国图书分类法分类号】R739.8

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-09-04

Circadian rhythm of oral squamous cell carcinoma in vivo

YANG Kai,ZHAO Ningbo,CHEN Dan,ZHAO Dan,TANG Hong,ZHAO Chunrong

(Department of Oral and Maxillofacial Surgery,The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective:To investigate the change of circadian rhythm in oral squamous cell carcinoma(OSCC)in vivo. **Methods:**Totally 32 nude mice were maintained in 12 h light alternating with 12 h dark. Human oral squamous cell carcinoma cell line BcaCD885 was transplanted subcutaneously into nude mice cheeks to develop an OSCC animal model. Mice were sacrificed at 4 different time points 4, 10, 16, 22 h(4 hours after light onset(HALO), 10HALO, 16HALO, 22HALO) of 24 h 3 weeks after transplantation, with 8 mice of each group. Tumors were dissected away and tumor sizes were measured. Tumor cell proliferation index(PI) and apoptosis index(AI) were determined by flow cytometry. Cosine analysis was used to detect circadian rhythm of tumor size, tumor cell PI and AI. Variance of significant difference in the four time groups was tested by ANOVA. **Results:**Tumor size and tumor cell PI exhibited significant circadian rhythm. Tumor sizes had significant differences at indifferent time points. Peak and trough values of tumor size appeared at 3.23HALO and 15.23HALO, respectively. Peak and trough values of tumor cell PI appeared at 6.60HALO and 18.16HALO, respectively. AI of tumor cells showed no circadian rhythm, but the differences of different time points were significant. **Conclusions:**Cell proliferation and tumor size of OSCC in vivo show circadian rhythm. Tumor size and AI have significant differences at different time points.

【Key words】oral cavity; carcinoma; squamous cell; circadian rhythm; proliferation; apoptosis

随着地球的自转,昼夜节律的交替,人体的许多生理活动,如体温、心率、血压、激素分泌及细胞新成代谢等均表现出周期的昼夜节律特点^[1]。“生物钟”和“时间生物学”已经成为生命科学研究的热点。不仅正常人体和正常细胞的生理活动具有昼夜节律性,肿瘤细胞的生长也具有昼夜节律性^[1-3]。恶性肿瘤的基本特征就是细胞失控制、失序性地增殖,这种失序和失控性也必然体现在时间维度方面。周

期昼夜节律性的变化对肿瘤的发生发展密切相关,并且不同肿瘤细胞生长的节律差异相差较大^[2-4],对肿瘤细胞昼夜节律的研究将为探索肿瘤的发生发展和个体化诊治提供新的思路和方法。目前还未查见有关口腔癌细胞生长的昼夜节律改变的相关文献报道。本研究将人口腔颊鳞状细胞癌 BcaCD885 细胞植入裸鼠颊部,建立裸鼠 BcaCD885 颊鳞状细胞癌模型,检测在 24 h 内肿瘤细胞的增殖、凋亡和肿瘤体积大小的昼夜节律改变情况,希望从肿瘤生长昼夜节律改变的角度为研究口腔鳞状细胞癌的

作者介绍:杨 凯,Email:cqfyk@yahoo.com.cn,

研究方向:口腔颌面-头颈肿瘤。

发生发展和个体化治疗提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 主要材料

1.1.1 仪器和试剂 人颊鳞状细胞癌 BcaCD885 细胞株(重庆医科大学生命科学院),流式细胞仪(BD,美国),冷冻低速离心机(Z233MK-2, Hermle, 德国)。

1.1.2 实验动物 SPF 级雄性 BALB/C-nu/nu 裸鼠 32 只,鼠龄 5~6 周,体质量 18~20 g/只(购自重庆医科大学实验动物中心),恒温恒湿条件下饲养,垫料、饲料和饮水均经灭菌处理。所有实验操作程序均经过重庆医科大学实验动物研究所实验动物使用管理委员会批准。

1.2 实验方法

1.2.1 裸鼠 BcaCD885 颊鳞状细胞癌模型的建立 32 只裸鼠随机分笼饲养,每笼 4 只,实验前先将裸鼠放置于 12 h 光照、12 h 黑暗交替的环境中饲养 2 周,室温(24 ± 1) °C,湿度(60 ± 10)%。在 12 h 光照/黑暗的周期中,时间以开灯后的小时数(hours after light onset, HALO)为参考,设置 0HALO 为开灯时间,12HALO 为关灯时间。2 周后取对数期生长期的 BcaCD885 细胞,经 0.5%胰蛋白酶消化,冷冻低速离心 4 min (800 r/min, 离心半径 3.0 cm, 4 °C)后,细胞悬于无菌 PBS 中,将含有 2×10^6 个 BcaCD885 细胞的 PBS 悬液 0.2 ml 注射于裸鼠颊黏膜下,建立裸鼠颊鳞状细胞癌模型。继续置于以上光照/黑暗的周期中饲养,3 周后在 24 h 内的 4 个时间点,即灯亮后第 4、10、16、22 h (4HALO、10HALO、16HALO、22HALO)的 4 个时间点用颈椎脱臼法分别处死 8 只裸鼠,共 32 只,立即解剖取出肿瘤。

1.2.2 体内肿瘤体积测定 将以上取出的肿瘤用 PBS 液冲洗后用滤纸吸干,然后用游标卡尺(精确度:0.02 mm)测量肿瘤的最大长径(a)和最小短径(b),按公式计算肿瘤体积(V): $V=1/2ab^2$ 。

1.2.3 体内肿瘤细胞增殖和凋亡的检测 将以上取出的 32 块新鲜肿瘤组织分别制成肿瘤细胞悬浮液,用流式细胞仪检测肿瘤细胞的增殖和凋亡。步骤简述如下:清除肿瘤周围坏死组织,D-Hanks 液洗 3 遍,用青霉素(5×10^5 U/L)和链霉素(100 mg/L)液浸泡 20 min,然后将肿瘤切成 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小组织块,置于消化液(胶原酶 2 g/L、DNase 1 g/L、透明质酶 0.000 2 g/L)中 40 min,用 200 目的钼网过滤,将滤过液离心 5 min (1 000 r/min, 离心半径 3.0 cm),去除上清液后用 PBS 漂洗 3 次,然后加 RPMI1640 制成肿瘤细胞悬浮液后用流式细胞仪检测。细胞增殖检测:将各细胞浓度调整为 1×10^6 个/ml,分别取 1 ml 肿瘤细胞悬液离心 5 min (1 000 r/min, 离心半径 3.0 cm, 4 °C)后去除上清液,将肿瘤细胞加入 -20 °C 浓度为 70% 的乙醇固定,放于 4 °C 冰箱过夜,离心 5 min (1 000 r/min, 离心半径 3.0 cm, 4 °C)、用 PBS 洗涤细胞 2 次,加入碘化丙啶染液 1 ml, 4 °C 避光 30 min,用流式细胞仪检测。用下列公式计算肿瘤细胞的增殖指数(proliferation index, PI), $PI=(S+G2/M)/(G0/G1+S+G2/M) \times 100\%$ 。细胞凋亡

检测:将各细胞浓度调整为 1×10^6 个/ml,分别取 1 ml 肿瘤细胞悬液离心 5 min (1 000 r/min, 离心半径 3.0 cm, 4 °C)后去除上清液,用 4 °C 的 PBS 洗涤细胞 2 次,加入 200 μ l Annexin V 染色液后于室温下放置 15 min,再加入碘化丙啶染液 1 ml 混合均匀 5 min 后用流式细胞仪检测。用下列公式计算肿瘤细胞的凋亡指数(apoptosis index, AI)=(凋亡细胞数/所测细胞总数) × 100%。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件行数据处理,计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。用方差分析单侧检验 24 h 昼夜周期内的 4 个时间点肿瘤生长各指标差异并行 LSD-*t* 组间两两比较分析。用 CircWave 1.4 软件(荷兰)行单余弦分析检验肿瘤生长的各指标是否有昼夜节律性。检验水准 $\alpha=0.05$ (单侧)。

2 结果

2.1 肿瘤体积的昼夜节律改变

在 24 h 内不同时间点口腔颊鳞状细胞癌肿瘤体积昼夜变化情况见表 1。余弦分析表明:肿瘤体积的昼夜变化其波动符合余弦函数规律,经单余弦法检验证明具有昼夜节律性($F=20.06, P=0.000$),余弦拟合曲线见图 1,根据余弦拟合曲线显示肿瘤体积大小的峰值出现在 7.23HALO,谷值在 19.23HALO。方差分析表明:肿瘤体积大小的昼夜变化差异具有统计学意义($F=27.87, P=0.000$),并且在昼夜各不同时间点之间肿瘤体积的变化差异均有统计学意义,即:4HALO 和 10HALO ($LSD-t=57.34, P=0.002$)、4HALO 和 16HALO ($LSD-t=89.80, P=0.000$)、4HALO 和 22HALO ($LSD-t=43.98, P=0.014$)、10HALO 和 16HALO ($LSD-t=147.22, P=0.000$)、10HALO 和 22HALO ($LSD-t=101.31, P=0.000$)、16HALO 和 22HALO ($LSD-t=45.90, P=0.011$)之间肿瘤体积的大小差异均有统计学意义。

2.2 肿瘤细胞增殖的昼夜节律改变

在 24 h 内不同时间点口腔颊鳞状细胞癌细胞 PI 昼夜变化情况见表 1。余弦分析表明:肿瘤细胞 PI 的昼夜变化其波动符合余弦函数规律,经单余弦法检验证明具有昼夜节律性($F=3.46, P=0.045$),余弦拟合曲线见图 2,根据余弦拟合曲线显示肿瘤细胞增殖的峰值出现在 5.42HALO,谷值在 17.42HALO。方差分析表明:在不同时间点肿瘤细胞 PI 昼夜变化差异无统计学意义($F=2.30, P=0.100$)。

2.3 肿瘤细胞凋亡昼夜节律改变

在 24 h 内不同时间点口腔颊鳞状细胞癌细胞 AI 昼夜变化情况见表 1。余弦分析表明:肿瘤细胞 AI 的昼夜变化经单余弦法检验证明不具有昼夜节律性($F=0.64, P>0.05$)。方差分析表明:不同时间点口腔颊鳞状细胞癌细胞 AI 昼夜变化差异有统计学意义($F=138.80, P=0.000$),其中 4HALO 和 10HALO ($LSD-t=49.10, P=0.000$)、10HALO 和 16HALO ($LSD-t=47.26, P=0.000$)、10HALO 和 22HALO ($LSD-t=12.57, P=0.000$)、16HALO 和 22HALO ($LSD-t=34.69, P=0.000$)、4HALO 和 22HALO ($LSD-t=36.53, P=0.000$)时间点之间肿瘤细胞 AI

差异具有统计学意义, 4HALO 和 16HALO ($LSD-t=1.85, P=0.540$) 之间肿瘤细胞的凋亡指数差异无统计学意义。

表 1 昼夜不同时间点肿瘤体积、细胞增殖指数和凋亡指数的变化
($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab.1 Changes of tumor volume, cell proliferative index and apoptotic index at different time points during a 24 h period
($\bar{x} \pm s, n=8$)

处死小鼠时间	肿瘤体积 (mm ³)	细胞 PI	细胞 AI
4HALO	428.89 ± 23.78	42.72 ± 8.04	24.60 ± 1.49
10HALO	486.24 ± 37.05	41.67 ± 4.27	73.70 ± 4.33
16HALO	339.01 ± 30.57	37.21 ± 0.28	26.44 ± 10.79
22HALO	384.93 ± 40.71	39.56 ± 0.29	61.13 ± 1.92

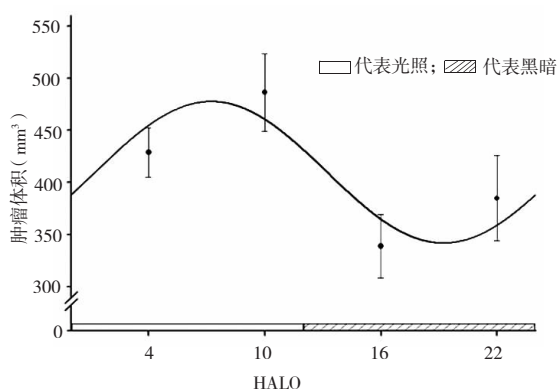


图 1 肿瘤体积昼夜变化的余弦拟合曲线

Fig.1 Cosine fitting curve of the circadian variation of tumor volume

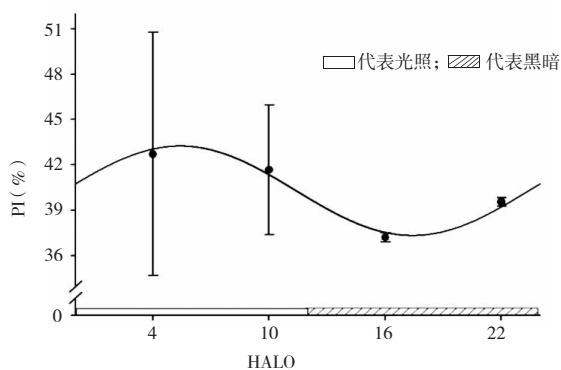


图 2 肿瘤细胞 PI 昼夜变化的余弦拟合曲线

Fig.2 Cosine fitting curve of the circadian variation of tumor PI

3 讨论

有规律的周期性活动是生物界的普遍规律。昼夜节律是生物长期进化形成的内源性适应机制, 是生命活动的基本特征。目前已知人体内有 300 多种生命活动随昼夜交替呈节律波动, 昼夜节律使人类在休息-活动时相表现出细胞的新陈代谢和增殖等

生理活动均呈明显的生物节律^[1-2]。哺乳动物下丘脑视交叉上部的视交叉上核 (suprachiasmatic nucleus, SCN) 是昼夜节律的控制器^[5], SCN 产生休息-活动节律主要是根据白天和夜晚的光线变化并结合其它刺激如温度、激素分泌等产生昼夜节律, 它们通过神经递质、内分泌等途径影响周围组织和细胞, 调节生物体的睡眠、觉醒、代谢、内分泌、细胞增殖以及免疫等生命的各个层面, 使生命活动在时序上协调有序^[3-5]。因此昼夜节律的时间是用 HALO 来表达, 而不是用时钟时间来表达。由于生物体的生物节律个体差异较大, 容易受到各种因素的干扰, 以余弦函数为模型发展起来的余弦分析法是分析生物节律性资料的有效方法, 它可排除其他生物性因素的干扰, 将一种需要研究的生物节律分离并将其特征用余弦拟合曲线直观地表示出来^[6]。

鼠类是目前用来研究生物节律常用的动物模型, 尽管鼠类是夜行动物, 其休息-活动相与人类相反, 但目前人们通过对细胞代谢、抗癌药物及相关代谢酶类在体内生物节律变化的研究证明^[7-9]: 从鼠类的休息相和活动相所获得的实验结果可以外推到人的相应休息相和活动相, 即从休息相-活动相的概念来判别, 鼠类在休息相和活动相其体内肿瘤生长的昼夜生物节律特征与人类相应的休息相和活动相是高度关联的。

昼夜节律的改变影响肿瘤的生长, 与肿瘤的发生、发展、治疗和预后等密切相关, 并且不同肿瘤细胞之间的昼夜节律差异较大^[1-4]。目前还未查见有关口腔癌细胞生长的昼夜节律改变的相关文献报道。本研究选择肿瘤大小、肿瘤细胞增殖和凋亡这 3 个最能代表肿瘤生长特征的指标来检测口腔鳞状细胞癌在 24 h 内的昼夜节律变化, 研究表明: 口腔颊鳞状细胞癌肿瘤体积的改变具有昼夜节律性, 在实验所选休息相的两个时间点 (4HALO 和 10HALO) 和活动相的两个时间点 (16HALO 和 22HALO) 之间肿瘤体积的改变均有显著性差异, 肿瘤体积昼夜变化在 $(339.01 \pm 30.57) \sim (486.24 \pm 37.05)$ mm³; 细胞增殖分析显示癌细胞的 PI 改变具有昼夜节律波动性, 但在休息相和活动相之间其 PI 改变无显著性差异; 细胞凋亡分析显示癌细胞的凋亡指数虽然在不同的时间点变化很大, 具有显著性差异, 但变化无昼夜节律性。本研究首次对口腔癌生长的昼夜生物节律进行研究, 虽然是一个初步探索, 但结果表明对口腔鳞状细胞癌的个体化诊治应加入时间因素。如对各种抗癌制剂的疗效评价应在 1 d 的相同时间点

基础研究

DOI: 10.11699/cyxb20130727

高效液相色谱法测定虎杖提取物中白藜芦醇的含量

吴 青¹, 罗先钦², 胡 荣³

(1. 重庆医科大学附属儿童医院药剂科, 重庆 400014; 2. 重庆市中药研究院药理毒理研究所, 重庆 400065;

3. 重庆市中药研究院制剂所, 重庆 400013)

【摘要】目的: 建立虎杖提取物中白藜芦醇的含量测定方法。方法: 采用高效液相色谱法测定虎杖提取物中白藜芦醇的含量。色谱条件: 流动相: 乙腈-水(30:70); 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 306 nm; 柱温: 室温; 进样量: 10 μ l。结果: 白藜芦醇进样量在 0.3~9.6 μ g/ml 范围内, 线性关系良好。结论: 本法简便实用、灵敏度高、重现性好, 可用于虎杖提取物中白藜芦醇的含量测定。

【关键词】虎杖提取物; 白藜芦醇; 高效液相色谱法

【中国图书分类号】R943

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-03-13

Determination of erbascoside and resveratrol in root of polygonum cuspidatum by high performance liquid chromatography

WU Qing¹, LUO Xianqin², HU Rong³

(1. Department of Pharmacy, the Children's Hospital, Chongqing Medical University;

2. Institute of Pharmacology and Toxicology, Chongqing Academy of Chinese Materia Medica;

3. Institute of Formulation, Chongqing Academy of Chinese Materia Medica)

【Abstract】Objective: To establish reserved-phase high performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of resveratrol content in root of polygonum cuspidatum. Methods: HPLC was carried out to detect resveratrol content in root of polygonum

作者介绍: 吴 青, Email: wuqing1133@126.com,

研究方向: 药物靶向制剂及其研究。

进行, 抗癌药物用药时间在口腔鳞状细胞癌细胞增殖水平最高(恶性程度相对较高)的休息相中期可能会获得更好的疗效, 而手术时间在口腔鳞状细胞癌细胞增殖水平最低(恶性程度相对较低)和体积最小的活动相中期和晚期进行可能有利于降低肿瘤复发和减小手术创伤。同时, 该研究也为进一步对口腔鳞状细胞癌细胞体内生长的昼夜节律改变的分子机理研究提供了正确的方向和基础。昼夜节律和肿瘤生长之间的关系和机理研究的深入, 不仅能对恶性肿瘤的发生、发展带来新的认识, 而且对设计新的分子治疗靶标、放疗和化疗、疗效的评价以及肿瘤手术边界的确定等诊治手段也将加入时间维度, 从而催生肿瘤防治的新模式。

参 考 文 献

[1] Eismann E A, Lush E, Sephton S E. Circadian effects in cancer-relevant psychoneuroendocrine and immune pathways[J]. Psychoneuroendocrinology, 2010, 35(7): 963-976.

[2] Huang X L, Fu C J, Bu R F. Role of circadian clocks in the development and therapeutics of cancer[J]. J Int Med Res, 2011, 39(6): 2061-2066.

[3] Jasser S A, Blask D E, Brainard G C. Light during darkness and cancer: relationships in circadian photoreception and tumor biology[J]. Cancer Causes Control, 2006, 17(4): 515-523.

[4] Fu L, Lee C C. The circadian clock: pacemaker and tumor suppressor[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(5): 350-361.

[5] Filipinski E, Lévi F. Circadian disruption in experimental cancer processes[J]. Integr Cancer Ther, 2009, 8(4): 298-302.

[6] 童 建. 余弦分析法在生物节律研究中的应用[J]. 中国卫生统计, 1991, 8(1): 23-25.

Tong J. Application of cosinor method to study of biological rhythms[J]. Chinese Journal of Health Statistics, 1991, 8(1): 23-25.

[7] Innominato P F, Lévi F A, Bjarnason G A. Chronotherapy and the molecular clock: clinical implications in oncology[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2010, 62(9-10): 979-1001.

[8] Lévi F, Okyar A, Dulong S, et al. Circadian timing in cancer treatments[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2010, 50: 377-421.

[9] Lévi F. Chronotherapeutics: the relevance of timing in cancer therapy[J]. Cancer Causes Control, 2006, 17(4): 611-621.

(责任编辑: 唐秋姗)