

【论著】

鼻咽癌细胞生物节律及时辰照射观察

范治军, 刘士煜, 李 科, 王焕坤, 陈 亮

中图分类号: R816.96 文献标识码: A 文章编号: 1004-714X(2013)05-0521-03

【摘要】 目的 探讨鼻咽癌细胞的细胞周期的生物节律和时辰照射对鼻咽癌细胞的作用。方法 体外培养人鼻咽癌细胞 CNE-2 细胞系, 在一天内不同的时间点(4AM、10AM、4PM、10PM) 取出培养的细胞, 用流式细胞仪检测细胞周期。根据细胞周期曲线一天内 G_2/M 期的高峰和低谷分别照射鼻咽癌细胞, 用微量细胞克隆形成法和平板克隆形成实验观察细胞存活率 SF(survival fraction)。结果 各细胞周期在 4AM、10AM、4PM、10PM 4 个时间点的分布, 以单因素方差分析可见随时间变化差异有统计学意义($P < 0.05$)。微量细胞克隆形成法和平板克隆形成实验均显示细胞在一天内 G_2/M 期的高峰和低谷分别照射, 细胞存活率均有统计学意义($P < 0.05$)。在高峰时照射的细胞 SF 小于低谷时照射。结论 人鼻咽癌 CNE-2 细胞系的细胞周期随昼夜呈现节律性变化, 时辰照射鼻咽癌细胞存活率的差异预示鼻咽癌时辰放疗的优越性。

【关键词】 鼻咽癌; 细胞周期; 生物节律; 时辰放疗

Circadian Rhythms of Cell Cycle in Human Nasopharyngeal Carcinoma Cell and Chronoradiation. FAN Zhi-jun, LIU Shi-yu, LI Ke, WANG Huan-kun, CHEN Liang. Radiation Therapy Department, No. 3 Hospital of Dalian, Dalian 116033 China.

【Abstract】 Objective To study the circadian rhythms of cell cycle in human nasopharyngeal carcinoma (NPC) cells and effect of chronoradiation on NPC cells in order to provide necessary data for making clinical chronoradiotherapy schedule of NPC. **Methods** Single cell suspension was obtained from NPC cell line CNE-2 cultured in vitro at different times within a day and stained with propidium iodide. The cell cycles were measured by flowcytometry. According to the cell survival curve, NPC cells were irradiated by radiation on the acrophase and nadir of G_2/M phase. The cell survival fraction (SF) was examined by microclonogenic and the clonogenic assays. **Results** One-way ANOVA showed that the proportion of cancer cells in each phase varied according to circadian time with statistical significance($P < 0.05$); Both microclonogenic and the clonogenic assays showed that the SF of cells irradiated on the acrophase of G_2/M phase was lower than that of cells irradiated on the nadir ($P < 0.05$). **Conclusion** Cell cycle of nasopharyngeal carcinoma cell line CNE-2 cells might vary according to circadian rhythms. The difference of the survival fraction (SF) of NPC cells irradiated according to circadian rhythms predicted the superiority of chronoradiotherapy.

【Key words】 Nasopharyngeal Carcinoma; Cell Cycle; Circadian Rhythms; Chronoradiotherapy

研究发现肿瘤与时间节律的关系密切, 针对各种肿瘤患者的时辰节律而实施不同的最佳的治疗方案是近年来肿瘤治疗研究的热点。由于癌细胞的增殖周期有明显的时间特征, 而且与正常细胞的增殖周期有显著的差异, 选择最佳时间放疗即时辰放疗旨在最大程度杀伤肿瘤细胞的同时保护正常组织, 即放疗疗效最高, 副作用最小。本实验用流式细胞仪分析离体的人鼻咽癌细胞周期的变化, 并进一步绘制细胞存活曲线, 测定时辰照射的细胞存活率的差异, 以期为临床制定鼻咽癌时辰放疗方案提供实验依据。

1 材料

作者单位: 大连市第三人民医院放疗科, 辽宁 大连 116033
作者简介: 范治军(1980-), 男, 辽宁大连人, 硕士, 主治医师, 主要从事放射治疗工作。

1.1 实验对象 人鼻咽低分化鳞状上皮癌细胞系 CNE-2。

1.2 试剂 RPMI 1640 培养液、小牛血清、PBS 液、胰蛋白酶消化液、Giemsa 染液、PI 染液。

1.3 器材 二氧化碳培养箱、倒置显微镜、流式细胞仪、细胞培养板、细胞培养瓶、微量加样器。

2 方法及观察指标

2.1 细胞培养 将 CNE-2 细胞系培养于含有新生小牛血清、青霉素、链霉素各 100 U/mL 及碳酸氢钠调节 pH 值至 7.2 ~ 7.4 的 RPMI 1640 培养液中, 置于 37℃ 恒温 5% CO_2 培养箱中培养, 收集对数生长期细胞进行实验。

2.2 流式细胞仪检测细胞周期 将处于对数生长期的细胞在一天内 4 个时间点(4 AM、10 AM、4 PM、10 PM)

[9] Stupp R, Dietrich PY, Ostermann Kraljevic S et al. Promising survival for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with concomitant radiation plus temozolomide

followed by adjuvant temozolomide [J]. J Clin Oncol, 2002, 20:1375-1382.

(收稿日期: 2013-05-01)

分别收集,离心沉淀于 PBS 清洗,加 70% 冰乙醇混匀,4℃ 固定。经流式细胞仪检测前按标本准备流程处理细胞,上机检测分析细胞周期,收集数据,在 MultiCycle 分析软件进行细胞周期分析,计算 G_1 、S、 G_2 /M 期的相对比例。

2.3 照射方法 根据细胞周期绘制的曲线,一天内在 G_2 /M 期细胞曲线的高峰和低谷 2 个时间点室温下单次照射细胞,用⁶⁰Co 照射,源距离细胞生长面 70 cm,射野大小 10 cm × 10 cm,照射剂量率 108 ~ 111 cGy/min,剂量点取 2、4、6、8 Gy 共 4 点。

2.4 微量细胞克隆形成法 根据照射剂量不同以不同细胞密度接种于 96 孔细胞培养板中,贴壁后照射,复置恒温条件下培养 5 d 养液,在倒置显微镜下观察并记录细胞克隆数量。克隆标准为 ≥8 个细胞组成的集落。细胞存活率 SF(%) = 计数所得克隆数 / (接种细胞数 × (空白克隆数 / 空白接种细胞数)) × 100%。

2.5 平板克隆形成实验 根据照射剂量不同以不同细胞密度接种于 6 孔细胞培养板中,贴壁后照射,复

置恒温条件下培养 14 d 弃培养液, PBS 清洗, 10% 甲醛固定, Giemsa 染液染色, 空气干燥, 肉眼计数含有 ≥ 50 个细胞组成的集落。细胞存活率计算同前。

全部实验中,各个方法均设 6 个平行样本并重复 3 批实验。

2.6 实验数据分析 采用 SPSS 软件 one-way ANOVA 各个周期细胞在 4 个时间点差异的显著性。采用 independent-sample *t* test (独立样本 *t* 检验) 对微量细胞克隆形成法和平板克隆形成实验观察不同时间点照射的细胞存活率 SF 进行分析, 检验分别在 G_2 /M 期细胞曲线高峰和低谷照射的 SF 的差异。 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各细胞周期单因素方差分析结果(表 1)

3.2 微量克隆形成法(表 2)

3.3 平板克隆形成实验结果(表 3)

表 1 不同时间点各细胞周期的相对比例

细胞周期	细胞比例($\bar{x} \pm s$, %)				F 值	P 值
	4AM	10AM	4PM	10PM		
G_1 期	61.85 ± 4.71	55.61 ± 2.64	58.06 ± 2.06	60.44 ± 3.45	3.03	0.048 ¹⁾
S 期	30.9 ± 4.47	38 ± 3.72	30.37 ± 6.37	32.07 ± 2.68	4.1	0.02 ²⁾
G_2 /M 期	9.34 ± 2.91	3.03 ± 1.11	9.07 ± 2.75	8.25 ± 3.55	3.162	0.045 ³⁾

注: 1) G_1 期中 10 AM 与 4 PM 之间($P=0.01$) 4 PM 与 4 AM 之间($P=0.039$) 差异均有统计学意义; 2) S 期中 10 AM 与 4 PM 之间($P=0.018$) 4 PM 与 10 PM 之间($P=0.006$) 4 PM 与 4 AM 之间($P=0.021$), 差异有统计学意义; 3) G_2 /M 期 10 AM 与 4 PM 之间($P=0.013$) 4 PM 与 10 PM 之间($P=0.012$) 4 PM 与 4 AM 之间($P=0.019$), 差异均有统计学意义。

表 2 G_2 /M 期细胞不同照射剂量 10AM 组与 4PM 组的细胞存活率($\bar{x} \pm s$, %)

照射剂量(Gy)	10AM 组	4PM 组	P 值
2	28.16 ± 4.45	47.93 ± 7.32	0.000
4	21.53 ± 3.13	36.93 ± 8.88	0.001
6	15.22 ± 3.76	30.33 ± 6.75	0.001
8	14.14 ± 1.83	25.99 ± 5.91	0.003

表 3 G_2 /M 期细胞不同照射剂量 10AM 组与 4PM 组的细胞存活率($\bar{x} \pm s$, %)

照射剂量(Gy)	10AM 组	4PM 组	P 值
2	55.42 ± 8.02	74.21 ± 10.06	0.005
4	20.89 ± 4.16	26.27 ± 3.98	0.045
6	4.56 ± 0.96	5.85 ± 0.85	0.034
8	2.17 ± 0.4	2.75 ± 0.39	0.032

4 讨论

在大多数生物中都可以找到生物节律, 现已证明在哺乳动物中超过 300 种生命活动呈现昼夜节律变化^[1-2]。已从细胞中克隆出与生物节律有关的生物钟基因, 基因相互作用以调节细胞的昼夜活动, 细胞周期的昼夜波动又调节其他基因的转录和转录后程序,

从而形成细胞 24 h 周期变化^[3]。关于鼻咽癌细胞 DNA 合成的时间节律变化仅见孙健等^[4]报道过, 其研究证实, 荷人鼻咽癌裸鼠的鼻咽癌细胞的 DNA 合成也有明显的昼夜节律变化。机体通过生物钟基因的表达, 使生理活动在 24 h 内呈现规律性变化, 峰值和谷值在预定时间发生, 完成正常组织细胞的生长、增殖代谢^[5]。本实验以单因素方差分析表明离体鼻咽

癌细胞的细胞周期随昼夜节律变化,在一天 24 h 内 4 AM、10 AM、4 PM、10 PM 4 个时间点细胞周期的差异有统计学意义。

肿瘤组织的昼夜时间节律表现在:①它在宿主体内的生长有时间节律;②癌细胞的增生和凋亡受生物钟基因调控;③同一种抗癌药物,仅某些时间给药是有效的^[6]。目前针对肿瘤放疗的时间治疗研究开展尚少,基础研究已经证实,细胞对射线的敏感性因细胞自身周期而有差异,当干细胞集团是同步的情况下,在昼夜节律的不同时相以放射线照射,动物致死量因放射时间不同而异^[7]。放射线对肿瘤细胞的杀伤主要作用于 G₂/M 期^[8],根据细胞周期曲线中的 G₂/M 期的高峰 10 AM 和低谷 4 PM 来照射细胞,通过微量细胞克隆形成法和平板克隆形成实验^[9,10]均可得出,在高峰时照射的细胞存活率 SF 小于低谷照射时,有统计学意义,提示选择适当的时间给予肿瘤组织照射,针对肿瘤细胞敏感期,则望达到提高治疗比的效果,即时辰放疗的意义所在,根据一天的时辰节律来照射细胞的疗效优越性。本基础实验结果为鼻咽癌时辰放疗的时间选择提供了参考。

参考文献:

- [1] Deka AC, Chatterjee B, Gupta BD, et al. Temperature rhythm - an index of tumor regression and mucositis during the radiation treatment of oral cancers[J]. Indian J Cancer,

- 1976, 13(1): 44-50.
- [2] Dunlap JC. Molecular bases for circadian clocks[J]. Cell, 1999, 96: 271-290.
- [3] Tei H, Okamura H, Shigeyoshi Y, et al. Circadian oscillation of a mammalian homologue of the drosophila period gene[J]. Nature, 1997, 389(6650): 512.
- [4] 孙健, 洗励坚, 曹弃元, 等. 移植于裸鼠的人鼻咽癌细胞 DNA 合成生物节律的初步研究[J]. 癌症, 2001, 20(2): 128-130.
- [5] 王正荣. 时间生物学[J]. 生物医学工程杂志, 1993, 10(3): 263-269.
- [6] Levi F, 孙健, 洗励坚. 肿瘤的时辰治疗[J]. 广州医药, 2001, 32(2): 9-12.
- [7] 朱彬, 王正荣. 肿瘤时间生物学研究进展[J]. 中国处方药, 2004, 7(28): 20-24.
- [8] 沈瑜, 糜福顺. 肿瘤放射生物学[M]. 中国医药科技出版社, 2002: 52-78.
- [9] Banasiak D, Barnetson AR, Odell RA, et al. Comparison between the clonogenic, MTT, and SRB assays for determining radiosensitivity in a panel of human bladder cancer cell lines and a ureteral cell line[J]. Radiat Oncol Investig, 1999, 7(2): 77-85.
- [10] Griffon G, Merlin JL, Marchal C. Comparison of sulforhodamine B, tetrazolium and clonogenic assays for in vitro radiosensitivity testing in human ovarian cell lines[J]. Anti-cancer Drugs, 1995, 6(1): 115.

(收稿日期: 2013-05-18)

【工作报告】

双侧重复肾、重复输尿管畸形合并右输尿管囊肿内结石 1 例

张新毅, 田 宁

中图分类号: R814.43 文献标识码: D

1 病历资料

患者女, 54 岁, 因发现“膀胱结石”15 d, 突发小便困难 2 h 入院。平日偶有右下腹部疼痛, 为阵发性, 有肉眼血尿, 伴有尿频、尿急、尿痛。化验室检查: 尿常规红细胞(++) 白细胞(+), 其余化验室检查正常。B 超检查: 右侧重复肾、重复输尿管, 右侧输尿管扩张, 右输尿管末端入口处结石。腹部平片: 膀胱右侧输尿管入口处约 1.8 cm × 1.5 cm 大小结石。见图 1。静脉泌尿系造影: 双侧重复肾盂、输尿管, 右侧输尿管扩张, 膀胱区右侧输尿管入口处见 1.8 cm × 1.5 cm 圆形阳性阻光影, 其周围可见“晕圈”征。印象: 双侧重复肾、重复

输尿管, 右输尿管囊肿合并结石, 右肾积水。见图 2。手术所见: 电切镜进入膀胱, 见左右两侧分别 2 个输尿管开口, 右侧一输尿管末端可见 2.0 cm × 1.8 cm 囊肿, 电切镜部分切开囊肿壁, 使囊肿呈活瓣状, 囊肿内见大小约为 1.5 cm × 2.0 cm 椭圆形黄褐色结石, 使用气压弹道针击碎结石, 超声探针清石。术后一周痊愈出院。

2 讨论

肾盂输尿管重复畸形是上泌尿道最常见先天性畸形, 在人群中发病率 0.7% ~ 4%^[1], 一般女性多于男性, 重复畸形可为部分性, 形成一个单输尿管开口, 也可完全性, 两个输尿管开口于膀胱三(下转第 526 页)