

Chem, 2003, 49(1):1521-1524.

- [18] Heath DD, Flatt SW, Thomson CA, et al. Evaluation of 25-hydroxyvitamin D quantification using a commercial HPLC kit method[J]. Br J Biomed Sci, 2011, 68(2):86-91.
- [19] Bunch DR, Miller AY, Wang S. Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for serum 25-hydroxyvitamin D₂/D₃ using a turbulent flow online extraction technology[J]. Clin Chem Lab Med, 2009, 47(4):1565-1572.
- [20] Carter GD, Jones JC. Use of a common standard improves the performance of liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods for serum 25-hydroxyvitamin-D[J]. Ann Clin Biochem, 2009, 46(2):79-81.
- [21] Herrmann M, Harwood T, Gaston-Parry O, et al. A new quantitative LC tandem mass spectrometry assay for serum 25-hydroxyvitamin D[J]. Steroids, 2010, 75(13/14):1106-1112.
- [22] Maunsell Z, Wright DJ, Rainbow SJ. Routine isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for simultaneous measurement of the 25-hydroxy metabolites of vitamins D₂

and D₃[J]. Clin Chem, 2005, 51(9):1683-1690.

- [23] Stepman HC, Vanderroost A, Van Uytvanghe K, et al. Candidate reference measurement procedures for serum 25-hydroxyvitamin D₃ and 25-hydroxyvitamin D₂ by using isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Clin Chem, 2011, 57(3):441-448.
- [24] Chen H, McCoy LF, Schleicher RL, et al. Measurement of 25-hydroxyvitamin D₃ (25OHD₃) and 25-hydroxyvitamin D₂ (25OHD₂) in human serum using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its comparison to a radioimmunoassay method[J]. Clin Chim Acta, 2008, 391(1/2):6-12.
- [25] Yates AM, Bowron A, Calton L, et al. Interlaboratory variation in 25-hydroxyvitamin D₂ and 25-hydroxyvitamin D₃ is significantly improved if common calibration material is used[J]. Clin Chem, 2008, 54(12):2082-2084.

(收稿日期:2012-08-08)

• 综 述 •

生物钟在肿瘤中的研究进展*

张霞综述, 李杰审校

(青岛大学附属烟台毓璜顶医院检验中心, 山东烟台 264000)

关键词: 生物钟; 肿瘤; 综述

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.24.041

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)24-3030-02

哺乳动物细胞具有自发的分子钟来调控很多生物化学反应的周期, 因此对周围环境因素的刺激包括遗传毒性因素发生反应。这个分子钟由一个自动调整的转录-翻译反馈回路组成, 包括 4 种基因/蛋白质: BMal1, Clock, Cryptochrome 和 Period。生物钟本质的周期是 24 h, 它指挥着很多生化反应的进度。最近, 越来越多的研究表明生物钟在在肿瘤的发生发展过程中发挥作用, 对肿瘤的治疗具有重要的指导意义。

1 生物钟的结构及其分子机制

生物钟是细胞自发产生和维持的, 它不依赖于外界因素维持着时间节律性。然而, 细胞自发产生的生物钟在哺乳动物的外周器官的同步性是依赖于大脑中的管家钟通过神经和体液来调节的。管家钟位于视交叉上核, 它的基本分子结构和外周器官的生物钟是一样的, 所不同的是, 它可以发出信号, 这样就可以使所有的生物钟同步化。

在分子水平, 生物钟由 4 种基因/蛋白质组成一个转录-翻译负反馈回路: Clock, BMal1, Crys 和 Pers。Clock 和 BMal1 是转录激活因子, 他们共同形成异源二聚体结合到 Cry 和 Per 基因的启动子上从而激活它们的转录。反过来, Cry 和 Per 基因, 形成二聚体或高阶复合体, 通过一段时间进入到细胞核内, 抑制 Clock-BMal1 的转录活性。Clock-BMal1 还可以控制大约 10% 的基因转录, 引起他们的节律性表达, 称这些基因为节律控制基因, 其编码的蛋白不直接参与上述的转录翻译负反馈回路^[1]。然而, 核心的节律加上附加的转录回路以及翻译后修饰共同保证更广阔和高精度的节律调节。

2 生物钟和细胞凋亡

生物昼夜节律的基本分子机制就是生物钟基因及其蛋白产物构成的自主调节的转录-翻译反馈回路, 钟基因 Clock 或者 NPAS2 与 Bmal 1 形成 Clock/Bmal 1, NPAS2; BMAL1 异二聚体, 通过与 Cry, Per 和 Re-Erb 基因启动子部位的 e 盒结合, 激活这些基因的转录。这个蛋白二聚体同样负向调节细胞的凋亡。大量的研究充分证明了肿瘤发生发展与细胞凋亡状态密切相关, 凋亡受到抑制时细胞大量增殖, 使肿瘤发生、发展、复发, 也可使肿瘤产生化疗耐药。

细胞凋亡的信号通路主要分为死亡受体和线粒体/细胞色素 C 介导的信号通路。最近有研究表明生物钟可以调节 TNF- α 的合成从而参与了死亡受体通路的凋亡^[2]。此外, TNF- α 还参与了炎症反应, 在 Cry1-/-Cry2-/-双敲基因小鼠中过表达 TNF- α 使其对炎症刺激更加敏感并且显示类风湿样的症状^[3]。抑癌基因 p53 在线粒体通路的凋亡中发挥重要作用, p53 作为一个抑癌基因在很大程度上是由于 p53 在癌转化的细胞中可以上调促凋亡蛋白 Bax 和 Bak 的表达从而诱导细胞凋亡。生物钟和 p53 也有直接的关系: BMal1 可以上调 p53 表达^[4], 而 Cry 可以下调 p53 表达^[5], 然而由于很多因素参与了 p53 表达的调节使其没有稳定的昼夜节律性。生物钟 p53 凋亡的关系是很复杂的, 下调 p53 可以减低昼夜节律的振幅^[6], 但是 p53 基因突变小鼠却显示正常的昼夜节律性。特别的是, p53-/-Cry1-/-Cry2-/-比 p53-/-的成纤维细胞对遗传毒物诱导的凋亡更加敏感, 暗示了在 p53 敲除的背景下, Cry 可以负调

* 基金项目: 烟台市科技发展计划资助项目(2012071)。

控不依赖于 p53 的凋亡通路^[5]。另有研究表明昼夜节律调控可以通过节律性表达抗凋亡蛋白 Bcl-2 以及促凋亡蛋白 Bax 来调控凋亡^[7]。

3 生物钟和肿瘤发生

机体通过近日节律调控原癌基因、抑癌基因及凋亡基因的表达,对肿瘤发生具有直接或间接的作用,一旦生物钟基因表达异常引发节律改变即可促使肿瘤生长或患癌风险增加。研究表明,在电离辐射诱导下,Per2 突变型小鼠比野生型的小鼠 10 倍高的几率更容易产生淋巴瘤,主要是由于癌基因 c-myc 的表达上调和抑癌基因 p53 的表达下调,因此降低了突变型小鼠中变异细胞的凋亡。在 Per2 敲基因小鼠中短暂表达一些细胞周期调节和抑癌基因,例如 Cyclin D1 和 CyclinA, c-Myc, Mdm2 和 Gadd45 α 会解除这种情况^[8]。然而, Cry 基因在节律,凋亡和肿瘤转化中的作用比较复杂。Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}小鼠(缺乏生物钟)与野生型小鼠相比无论自发性还是电离辐射诱导的肿瘤的几率都没有差别^[9]。p53 基因突变容易诱发肿瘤,预期 Cry 和 p53 联合突变的小鼠其肿瘤发生的几率会明显增加,然而研究发现:Cry 基因突变可以保护 p53 基因突变导致的肿瘤发生,并且延长小鼠的生存周期^[5]。关于 Clock 或 BMal1 基因突变小鼠的研究更加证实了生物钟本身的破坏不能使肿瘤容易发生。即使 Clock 基因突变小鼠与野生型小鼠相比,对环磷酸胺的治疗更加敏感(可能是由于对 B 淋巴细胞的毒性增强),就肿瘤的自发和电离辐射诱导的肿瘤发生率而言,Clock 基因突变小鼠与野生型小鼠没有明显的差别^[10]。同样的, BMal1 基因突变对小鼠的肿瘤发生率没有影响,而是呈现过早衰老的状态,可能由于反应性活性氧的产生增多和慢性的氧化应激^[11]。

4 生物钟和血液肿瘤

生物钟基因在不同的小鼠和人类造血系统包括干/组细胞中暂时表达,然后在发育过程中被调节。另外,和其他组织相似,昼夜节律器官和生物钟特异性蛋白同样调节造血细胞周期和凋亡通路^[7]。血细胞生成同样不能逃脱生物节律的调节。生物节律调节对正常血细胞生成非常重要,昼夜节律紊乱和造血系统肿瘤相关。

Per2 敲除的基因小鼠一直放在黑暗的环境中会丧失节律, Per2 敲除的基因小鼠更易于发生肿瘤,在射线作用下,这些小鼠与野生小鼠相比发生淋巴瘤的几率增加 10 倍^[8]。分析患者原始样本显示 Per 基因在多种类型的白血病和淋巴瘤中表达下调。例如, per 基因在 CML 患者的外周血比正常人的表达降低。此外,在 CML 患者中经常发现 per2 和 per3 启动子的 CpG 发生甲基化,在原始细胞危象的患者中 per3 甲基化的频率比在慢性期的患者中明显要高^[12]。研究大量白血病和淋巴瘤患者以及正常对照骨髓和扁桃腺中 per2 的表达显示, per2 的表达在 AML 和 DLBCL 中表达明显下调^[13]。生物钟基因的遗传变异表型和 NHL 的危险度相关,研究提出晚上工作的人发生 NHL 的危险度增加。体外细胞培养实验表明在人类和小鼠 AML 和前 B 淋巴细胞中强迫表达 per2 可以引起细胞生长抑制,细胞周期阻滞,凋亡和丧失克隆能力^[14]。

5 生物钟和肿瘤治疗

尽管生物钟可能没有直接参与肿瘤的发生,由于无论是恶性肿瘤细胞还是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,某些抗癌药物的药代动力学参数也随着给药时间位相的不同而发生波动,已经证实,机体对大约 30 余种抗癌药物的耐受性或疗效随昼夜节律的改变而波动,波动范围可

达 50 % 以上^[15]。化疗是在容许一定范围的副作用下,在特定的时间内给予抗肿瘤药物使患者有更好的预后。具有遗传毒性的药物如顺铂对肿瘤细胞的作用是确切的,除了药物代谢动力学和药效学,对 DNA 损伤的细胞应答包括 DNA 修复, DNA 损伤检查点和细胞凋亡。由于这些应答在不同程度上受生物钟的控制,根据人体的生物节律用药治疗肿瘤(即时间化疗)具有显著的科学性。

事实上,一些小规模临床试验证明时间化疗法确实具有戏剧性的疗效^[16]。然而,大规模临床试验表明时间疗法作用不大^[17],可能是由于过去的临床试验是完全根据经验的。切除修复的昼夜摆动对顺铂时间疗法具有指导意义。在小鼠的器官中,除了睾丸之外,顺铂加合物的切除修复在下午 5 点达到顶点,在上午 5 点为最低点。因此,在上午 5 点使顺铂-DNA 加合物的形成达到最大限度可以使顺铂对小鼠肿瘤的治疗更为有效^[18]。此外,研究表明腹腔内注射单剂量顺铂 1 h 之后,在小鼠的肝脏和其他主要的器官除了大脑达到最大浓度。因此,忽略可能影响药物细胞毒性的其他因素,上午 5 点用顺铂治疗小鼠肿瘤是最佳时间。因为昼夜节律基因表达和人类生理性节奏和夜行的小鼠有 12 h 的差别,因此对人类肿瘤除了睾丸肿瘤的治疗在下午 5 点的时候给药能得到最理想的效果。确实有研究表明用顺铂治疗卵巢癌在下午 6 点给药比上午 6 点给药更为有效^[19]。然而,这一发现并未被后来的研究所证实。因此,要搞清楚肿瘤和正常组织的昼夜节律周期可以使时间疗法更为完美,成为一个标准的肿瘤治疗方法。

6 展望

人体内在的生理活动,细胞的新陈代谢和增殖分化均表现出 24 h 的节律性,癌细胞也同样遵循这个规律。生物钟基因可以通过调控癌基因、抑癌基因、细胞凋亡通路及转录因子来调控细胞凋亡,多方面参与了肿瘤的发生和发展。尽管动物实验表明生物钟基因可能并没有直接参与肿瘤的发生,基于生物钟为基础的时间疗法对肿瘤的治疗有一定的疗效^[20-25]。进一步了解肿瘤与昼夜节律、生物钟基因间的关系,为临床应用肿瘤的时间治疗,即协调生物节律与药物治疗提供了理论依据,指导临床选择放化疗治疗肿瘤的最佳时期,优化肿瘤治疗方案。

参考文献

- [1] Hughes M, Deharo L, Pulivarthi SR, et al. High-resolution time course analysis of gene expression from pituitary[J]. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2007, 72(1): 381-386.
- [2] Hashiramoto A, Yamane T, Tsumiyama K, et al. Mammalian Clock Gene Cryptochrome Regulates Arthritis via Proinflammatory Cytokine TNF- α [J]. J Immunol, 2010, 184(3): 1560-1565.
- [3] Keller M, Mazuch J, Abraham U, et al. A circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(50): 21407-21412.
- [4] Mullenders J, Fabius AW, Madiredjo M, et al. A large scale shRNA barcode screen identifies the circadian clock component ARNTL as putative regulator of the p53 tumor suppressor pathway[J]. PLoS One, 2009, 4(3): e4798.
- [5] Ozturk N, Lee JH, Gaddameedhi S, et al. Loss of cryptochrome reduces cancer risk in p53 mutant mice[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(8): 2841-2846.
- [6] Zhang EE, Liu AC, Hirota T, et al. A genome-wide RNAi screen for modifiers of the circadian clock in human cells[J]. Cell, 2009, 139(1): 199-210.

应对干式法检测血浆样品 ALT 的影响。

从图 1 可知,检测血清 ALT 时,Reflotron 快速干式生化分析仪和罗氏 Cobas P800 全自动生化分析仪的检测结果,在 6~123 U/L 的浓度范围内具有良好的线性关系,40U/L 水平浓度处估算的 SE 远远小于允许误差的 1/2,说明检测血清样品时,罗氏干式法和全自动生化分析的 ALT 检测值具有可比性;而抗凝血浆的检测值,随着浓度变高,其偏倚越大,大部分检测超出了 Y 估计回归值 95%可信区间的下限,说明 EDTA-K₂ 抗凝标本使用 Reflotron 快速干式生化分析仪检测时具有明显的基质效应;由基质效应产生的系统误差在 40U/L 水平浓度不可接受。

EDTA-K₂ 抗凝剂引入基质效应的原因可能是 EDTA-K₂ 为常用螯合剂,具有较强的络合金属离子的作用。而干式化学法检测 ALT 的原理是丙酮酸氧化酶法,在丙酮酸氧化酶法中的第 2 步酶促反应所用催化剂丙酮酸氧化酶,其分子需结合黄素腺嘌呤二核苷酸、焦磷酸硫酸素及 2 价金属离子(如 Mg²⁺) 等辅酶或辅基构成全酶方可表现催化活性。当 EDTA 与 Mg²⁺ 络合形成螯合物后丙酮酸氧化酶活性便会随之降低,故而对被测物检测产生干扰。笔者认为,使用 Reflotron 快速干式生化分析仪检测 ALT 时,理想情况下,尽量采用血清标本;但从实际工作角度,选用 EDTA-K₂ 抗凝标本也是可以的,从图 1 可看出,尽管抗凝剂引入的基质效应带来不可接受的系统误差,但其误差呈良好的线性关系,可以根据回归式进行校正。

参考文献

[1] 冯仁丰, 临床检验质量管理技术基础[M]. 2 版. 上海:上海科学

(上接第 3031 页)

[7] Granda TG, Liu XH, Smaaland R, et al. Circadian regulation of cell cycle and apoptosis proteins in mouse bone marrow and tumor [J]. FASEB J, 2005, 19(2): 304-306.

[8] Fu L, Pelicano H, Liu J, et al. The circadian gene Period2 plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo[J]. Cell, 2002, 111(1): 41-50.

[9] Gauger MA, Sancar A. Cryptochrome, circadian cycle, cell cycle checkpoints, and cancer [J]. Cancer Res, 2005, 65(15): 6828-6834.

[10] Gorbacheva VY, Kondratov RV, Zhang R, et al. Circadian sensitivity to the chemotherapeutic agent cyclophosphamide depends on the functional status of the CLOCK/BMAL1 transactivation complex[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(9): 3407-3412.

[11] Antoch MP, Gorbacheva VY, Vykhovanets O, et al. Disruption of the circadian clock due to the Clock mutation has discrete effects on aging and carcinogenesis [J]. Cell Cycle, 2008, 7(9): 1197-1204.

[12] Yang MY, Chang JG, Lin PM, et al. Downregulation of circadian clock genes in chronic myeloid leukemia: alternative methylation pattern of hPER3[J]. Cancer Sci, 2006, 97(12): 1298-1307.

[13] Gery S, Gombart AF, Yi WS, et al. Transcription profiling of C/EBP targets identifies Per2 as a gene implicated in myeloid leukemia[J]. Blood, 2005, 106(8): 2827-2836.

[14] Hoffman AE, Zheng T, Stevens RG, et al. Clock-cancer connection in non-Hodgkin's lymphoma: a genetic association study and pathway analysis of the circadian gene cryptochrome 2 [J]. Cancer Res, 2009, 69(8): 3605-3613.

[15] Levi F. Cancer chronotherapy [J]. J Pharm Pharmacol, 1999, 51

技术文献出版社, 2007: 39-50.

[2] CLSI. EP14-A2 Evaluation of matrix effects, approved guideline, second edition[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2005.

[3] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 58-64.

[4] 王志国, 临床检验质量控制技术[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 55-61.

[5] 王志国, 临床检验方法确认与性能验证[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 66-82.

[6] 郑松柏, 王建兵, 黄宪章. 血清 ALT 与 AST 测定的基质效应评价 [J]. 临床检验杂志, 2011, 29(5): 391-393.

[7] 吕赛平, 伍志杰, 邹学森. 基质效应的评价 [J]. 现代检验医学杂志, 2008, 23(5): 113-114.

[8] 阿拉法特, 邢文革. 制备样品基质效应的评估与控制 [J]. 中国医药导刊, 2007, 9(2): 158-159.

[9] 吕礼应. 质控材料的基质效应对三酰甘油测定的影响 [J]. 临床检验杂志, 2004, 22(2): 141.

[10] 熊传银, 朱秋玲, 潘小平. 基质效应对钾、钠、氯比色法测定结果的影响 [J]. 长江大学学报(自然科学版), 2009, 6(2): 57-58.

[11] 邹荣良. 基质效应在临床化学检测中的影响研究 [J]. 中国误诊学杂志, 2009, 9(34): 8491-8492.

(收稿日期: 2012-06-12)

(8): 891-898.

[16] Kobayashi M, Wood PA, Hrushesky WJ. Circadian chemotherapy for gynecological and genitourinary cancers [J]. Chronobiol Int, 2002, 19(1): 237-251.

[17] Levi F, Okyar A, Dulong S, et al. Circadian timing in cancer treatments [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2010, 50(1): 377-421.

[18] Kang TH, Lindsey-Boltz LA, Reardon JT, et al. Circadian control of XPA and excision repair of cisplatin-DNA damage by cryptochrome and HERC2 ubiquitin ligase [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(11): 4890-4895.

[19] Levi F, Schibler U. Circadian rhythms: mechanisms and therapeutic implications [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2007, 47(2): 593-628.

[20] 邓香群, 张鹏飞, 贺印旋. 生物钟基因 hClock hBmal1 在肿瘤中的表达研究 [J]. 中国肿瘤临床, 2011, 38(10): 556-559.

[21] 邓香群, 贺印旋. 生物钟基因 hClock, hBmal1 在结直肠癌中的意义 [J]. 中华消化杂志, 2010, 30(12): 916-918.

[22] 邓香群, 张灿云, 刘保安. 生物钟基因 hClock 蛋白在结直肠癌中的表达研究 [J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2009, 18(4): 369-370.

[23] 王朝霞, 李莉. 生物钟基因 Per2 与肿瘤 [J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2009, 28(6): 377-379.

[24] 晨晨, 江舟, 王正荣. 生物钟基因与心血管病的关系 [J]. 四川生理科学杂志, 2009, 31(2): 80-83.

[25] 戴弘季, 陈可欣. 生物钟基因与女性乳腺癌发生的关系 [J]. 肿瘤, 2008, 28(4): 360-362.

(收稿日期: 2012-09-09)