

鼻咽癌时辰化疗的研究和探索

韩云炜综述,范娟审校

关键词:鼻咽癌;时辰疗法;生物节律;昼夜节律;临床应用

中图分类号:R730.53; R739.62 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2008)10-0755-04

0 引言

鼻咽癌是我国南部,特别是两广地区高发的一种恶性肿瘤。放射治疗为治疗鼻咽癌的主要手段。但初诊时晚期患者占约 70% 以上,单纯放疗后有一半以上的患者将出现复发和(或)转移,因此综合治疗晚期鼻咽癌成为目前的研究热点。近年来,对肿瘤时间节律性的研究,为肿瘤的发生、发展及诊断治疗提供了新的思路和方法,并已成为国内外肿瘤研究领域内的热点。目前时辰化疗已在多种恶性肿瘤治疗中应用,并已取得一定成效。针对鼻咽癌时辰疗法的研究,无论在基础和临床均引起众多学者的关注。

1 鼻咽癌时辰疗法的理论基础

1.1 肿瘤时辰疗法概述

肿瘤时辰疗法(tumor chrono-therapy)是根据人体昼夜节律,以及肿瘤细胞在昼夜不同时间生长特性的差异,制定最佳的治疗方案,从而提高疗效,降低副作用。1960 年就已经开始了肿瘤时辰疗法的研究,当时由于缺乏肿瘤时辰疗法与昼夜节律相互关系的直接证据,所以研究一直进展缓慢。但进 10 年来“生物钟”的研究成为生命科学的研究的热点。研究表明:昼夜节律不仅影响肿瘤的发展进程,还与临床患者预后密切相关,有可能成为肿瘤治疗的新指标。

1.2 生物节律

生物节律主要有:昼夜节律(20~28 h,即近日节律 circadian rhythm);近月节律 30 ±7 d(circannual rhythm);近年节律 12 ±2 月(circannual rhythm)。但目前研究得最多的是昼夜节律。

昼夜节律钟基因(circadian clock genes)是生命活动的时序控制器,它们的活动使得器官组织和细胞水平的生命活动高度有序、协同,并呈现明显的昼夜节律。尤其重要的是,它们影响着细胞增殖周期和凋亡、神经内分泌和免疫功能等与恶性肿瘤的发

生、发展、治疗和预后等关系密切的各个方面,昼夜节律紊乱促使肿瘤发生,加速肿瘤进展,遵循时间生物学的时辰化疗能增加疗效。昼夜节律基因的深入研究,提供了认识肿瘤的新视角,可能成为治疗干预的新靶点,催生循时治疗肿瘤的新模式。

在整体水平,哺乳动物下丘脑视交叉上部具有特化神经核团视交叉上(suprachiasmatic nucleus, SCN),是生命活动的时序控制器,它们通过神经递质、内分泌和体液途径影响周围器官和组织,控制和调节着睡眠和觉醒、代谢、内分泌、细胞增殖分裂和凋亡,以及免疫等的各个层面,使生命活动在时序上协调有序^[2]。在分子水平,SCN 神经元、周围器官组织细胞、甚至离体培养传代的细胞均存在相同的昼夜节律时钟基因,其基本机制是转录及转录后水平的反馈调节。时钟基因可通过控制其下游钟控基因(clock controlled genes, CCG)使之呈现节律性^[4],CCG 的特征之一是含有供 CLOCK 和 BMAL1 结合的 E-box。有多项研究^[5]使用 DNA 微阵列技术对不同时点、各器官组织细胞转录本的比较发现,细胞活动的几乎每一个层面,从能量代谢、细胞分裂增殖和凋亡,到离子通道、信号转导等均存在显著的昼夜节律,而且这种节律协调一致,使生命活动具有适应性和前瞻性^[6]。

1.3 癌细胞的昼夜节律

恶性肿瘤的特征之一是细胞失控制性、失序性的增殖,这种失序性也必然体现在时间维度方面的紊乱。由于昼夜节律钟基因与神经内分泌、免疫以及细胞周期调控密切关联,尤其是影响着细胞增殖周期和凋亡,故与肿瘤密切相关。

昼夜节律生物钟控制着细胞周期。昼夜节律和细胞周期两大周期性活动,其本质上的关联及其机制随着昼夜节律基因的发现而揭开。在分子水平,昼夜节律和细胞增殖周期两大调节通路之间存在交叉点和共同构件^[7]。有多个研究组使用 DNA 阵列独立发现 WEE 基因是两大通路的共同构件^[4]。昼夜节律基因控制着 Wee 1,使其呈现昼夜节律表达。在白日,当 Bmall 基因表达呈现峰值时能激活 Wee 1,继之 Wee 1 使细胞周期蛋白 Cdk 1 和 Cdk 2

收稿日期:2007-12-28;修回日期:2008-03-13

作者单位:646000 四川泸州医学院附属医院肿瘤科

作者简介:韩云炜(1979-),男,硕士,住院医师,主要从事肿瘤的综合治疗

磷酸化并失活,而 cyclin E 和 cyclin B1 则被激活,分别推动细胞周期从 G 到 S、G,到 M 的转换,这就能够解释在每昼夜的后半夜,标志着 DNA 合成的 cyclin E 的峰值以及细胞的有丝分裂总是在时相上固定伴随。另一方面,Per1 则在每昼夜的光照时相即白昼的中点达到最高峰,使得 P53 表达上调,既抑制 cyclin B1 表达,直接抑制细胞有丝分裂;又刺激 P21 蛋白的生成,抑制 Cdk2 并且刺激 cyclin E 表达,恰与白昼中点 DNA 合成达到高峰的现象相吻合^[1,8-9]。

Lundkvist 等^[10]发现昼夜节律基因 mPer2 基因敲除鼠昼夜节律消失,与野生鼠比较,自发肿瘤发生率显著增加,且经射线处理后肿瘤发生率明显增高,其 P53 介导的细胞凋亡和 DNA 修复均显示存在缺陷,细胞增殖和肿瘤抑制相关基因如 cyclin D1、cyclin A、Mdm-2 和 Gadd45 c-myc 表达增加,从而 DNA 损害累积,凋亡缺陷,并逃逸细胞周期检测点,使 c-myc 表达过度增高,淋巴瘤发病率显著上升。在整体水平,解剖性毁损实验动物的昼夜节律调节中心 SCN 会导致荷瘤实验动物瘤体生长显著加速,生存期明显缩短^[11];即使功能性扰乱荷瘤实验动物的昼夜节律,如给予持续光照,或者模拟倒时差或者夜间工作的光照模式,也观察到相似的结果^[12-13]。昼夜节律基因表达的紊乱会促使细胞增殖相关基因表达上调,而凋亡相关基因受到抑制。因此,完整的昼夜节律功能及其稳态的维持具有抑制肿瘤生长的作用。

各种具有抗肿瘤活性和免疫调节功能的细胞因子,其生理状态下的分泌多数符合昼夜节律规律,与时辰化疗相似,临床应用若择时而行可能达到最大疗效。肿瘤坏死因子、白介素-2、干扰素和促红细胞生成素等生物制剂的给药时间与疗效相关,呈时间依赖规律。Carrillo 等^[14]将荷黑色素瘤 B16 的 C57BL/6 小鼠按每 4h 间隔分为 1 组,不同时点予以同样剂量 rHuIFN-alphaA/D 或者 rMuIFN-gamma,结果 rHuIFN-alpha A/D 组最小和最大活性点分别为 HALO 12~16 h 和 0~4 h,而 rMuIFN-gamma 组则为 HALO 0~8 h 和 16 h。rHuIFN-alpha A/D 在最低有效时点需要约 5 倍的剂量才能够达到在最高有效时点给予同样剂量所达到的疗效。rMuIFN-gamma 组结论相似,最高有效时点药效相当于最低时点的 8.5 倍,证明动物实验中干扰素的给药时点影响其抑瘤效果。

昼夜节律紊乱会导致多种疾病或者机体生理功能失调,且与肿瘤的关系密切。因此,昼夜节律稳态是神经内分泌和免疫功能与癌症关联的中介,也是

重要的量度。有研究提出“时生素(chronobiotics)”的概念,希望通过纠正和调整昼夜节律,使得抗肿瘤治疗遵循昼夜节律以增加疗效、减少不良反应、增进生活质量。目前的研究主要针对褪黑素,褪黑素作为体现中枢昼夜节律的主要激素,由于其对于免疫系统的广泛的调节作用,将神经内分泌系统、精神和躯体、以及免疫系统联结成为一个整体,影响着肿瘤的发生、发展和转移。既往实验动物肿瘤模型的研究支持褪黑素抑制肿瘤细胞增殖,抑制 EGFR 和 MAPK 通路分化和凋亡的作用^[15];新近的研究还发现其抑制瘤细胞摄取亚油酸继而抑制增殖;此外,多种免疫活性细胞具有褪黑素受体,体现了褪黑素的免疫调节作用。尽管褪黑素单独或者联合用于肿瘤治疗的临床试验结论不一,目前认为可能既往的临床试验未特别注重给药时间这一关键变量,因此,尚需进一步验证。有学者甚至希望用于经流行病学研究初步证实其发生与夜间光照有关的乳腺癌、结肠癌等癌症的一级预防^[16]。

既往有关时间化疗的机制认为,与细胞毒性药物代谢相关的酶如胸腺嘧啶合成酶的活性呈现的昼夜节律是主要原因,新近的研究则利用昼夜节律基因突变鼠(Cry1/-/Cry2/-双基因敲除鼠,Clock 突变鼠以及 Bmal1 基因敲除鼠)与野生鼠对于环磷酰胺毒性的时辰敏感性比较,发现 Clock 突变鼠以及 Bmal1 基因敲除鼠,无论何时均对环磷酰胺敏感而 Cry1/-/Cry2/-双基因敲除鼠则反之,无论何时均呈现抵抗,推论化疗药物毒性的时辰差异的分子本质是 Clock/Bmal1 转录的状态,尤其是与 B 细胞中的昼夜节律基因的转录功能状态决定了化疗后生存和恢复的不同结局,修正了既往认为的仅仅是药代动力学的昼夜差异的机制^[17]。

研究表明,人体肿瘤细胞有丝分裂的指数在个体之间有很大的差异,但在群体水平上亦有时辰节律,最高点接近 3PM,最低点接近 3AM。将 DNA 合成作为参数,卵巢癌的 DNA 合成高峰为 11:00~15:00,肺癌为 06:00~12:00 或 00:00~06:00,头颈部癌为 10:00。如果选择合适的化疗时间,使其避开正常组织 DNA 合成高峰,而选择肿瘤组织 DNA 合成高峰给药,则在最大程度杀灭肿瘤细胞的同时保护了正常组织,减小毒性。但同一癌组织存在多种癌细胞,可以推测癌细胞的昼夜节律较正常细胞复杂。由此可见,了解每个癌症患者的昼夜节律,可以充分发挥抗癌药物的作用^[18]。

2 鼻咽癌的时辰疗法

多宗研究显示鼻咽癌诱导化疗较单纯放疗显著

提高无瘤生存率^[19~20]。目前传统的化疗方法疗效不尽人意,不良反应也大。实现药物时辰化疗在特定时间给予传统药物或根据疾病(患者)节律特点给予特定的药物,疗效可显著提高。

2.1 鼻咽癌细胞的生物节律

国内学者孙健等在国际上首次报道了鼻咽癌肿瘤细胞 DNA 合成的时间节律变化,证实移植于裸鼠的人鼻咽癌细胞 DNA 合成随昼夜呈节律变化,而且这种差异有统计学意义。用 Cosinor(余弦)分析表明 G₁、G₂/M 期细胞变化符合余弦曲线,S 期曲线相比之下较为平缓,未达显著性,鼻咽癌细胞 DNA 合成 S 期的高峰在 11.5 HALO。接着,孙健等又报道了荷人鼻咽癌裸鼠骨髓细胞 DNA 合成的生物节律,证实荷人鼻咽癌裸鼠骨髓细胞 DNA 合成随昼夜交替呈节律性变化,而且这种差异有统计学意义。用 Cosinor(余弦)分析表明 G₁、G₂/M 期细胞 24 h 变化符合余弦节律,峰值分别位于 10.8 HALO 和 1.8 HALO。S 期末达显著性,骨髓细胞 DNA 合成 S 期的高峰在 21.5 HALO。比较鼻咽癌细胞与骨髓细胞 DNA 合成,两者 S 期的峰值有 10 h 的时间差,这就为我们选择合适的给药时间使得避开骨髓合成高峰,集中杀灭 S 期肿瘤细胞提供了契机^[21]。

2.2 鼻咽癌时辰化疗的实验研究

随着对鼻咽癌细胞生物节律研究的不断深入,国内外学者研究证实小鼠肝组织中二氢嘧啶脱氢酶(DPD)的表达呈现出明显的昼夜节律性,其峰值时间位于 16 HALO 左右,即位于小鼠的活动相^[22];人外周血单核细胞 DPD 的活性同样也存在昼夜节律性变化,其峰值在 22 00~02 00^[23]。胸苷酸合成酶的活性变化也存在昼夜节律性,其峰值时间出现在光周期,节律与 DPD 刚好相反。DPD 是 5-Fu 体内代谢的一个起始酶和限速酶,其活性影响到 5-Fu 对机体的毒性。无论在健康人体还是在癌症患者中,从凌晨到早 10 h,DPD 的活性较其它时间提高 50% 以上,恰好在 DPD 的这一活性高峰期,健康人体进入 S 期的骨髓、小肠、皮肤、及口腔粘膜细胞的比例为 24 h 周期的低谷,导致对 5-Fu 的最佳耐受性。动物和人体实验均证明在 DPD 的分泌高峰期给予大剂量的 5-Fu,可以减轻毒性提高疗效。谷胱甘肽(GSH)的活性与顺铂的毒性有关,国外 Levi 研究表明,GSH 含量呈昼夜变化,各时相中差异明显,其峰值相位在 13 00^[22]。这些研究为鼻咽癌的时辰化疗提供了理论依据。

2.3 鼻咽癌时辰化疗的临床应用

郭灵等^[23]报告 30 例晚期鼻咽癌进行时间调节

化疗,应用 Melodie 多通道编程输液泵进行电脑调控的正弦曲线形式时间调节给药,诱导化疗组 20 例,5-Fu 750~850 mg/m²,由 22 00 至第二日上午 10 00 给药,浓度高峰为凌晨 4 00,连续 5 天;DDP 20 mg/m²,由 10 00~22 00 给药,浓度高峰为 16 00,连续 5 天,行 2 个疗程诱导化疗后,第 5 周开始放疗;单纯化疗组 10 例,5-Fu 600 mg/m²,LV 200 mg/m²,DDP 20 mg/m²,连续 5 天,每 3 周重复,给药方法和达峰时间与诱导化疗组相同,其中 LV 与 5-Fu 给药方法一致,行 2~6 疗程化疗。结果:诱导化疗组 2 疗程化疗后有效率(PR)达 100%;全疗程结束 CR 达 95%(19/20);单纯化疗组 PR 80%(8/10),SD 10%(1/10),PD 10%(1/10),两组不良反应主要为 ~ 度迟发性血小板减少,发生率为 26.7%(8/30)。

杨兴龙等^[24]报告 50 例局部晚期复发转移的鼻咽癌患者随机分为时辰化疗和常规化疗二组。时辰化疗组 27 例,常规化疗组 23 例。时辰化疗组采用顺铂(DDP)联合 5 氟尿嘧啶(5-Fu)静脉输入,DDP 20 mg/m²,10 00~22 00 给药,5-Fu 600 mg/m²,22 00 至第二日 10 00 结束,疗程 5 天,间歇 16 天后重复;常规化疗组用药及剂量与前者相同,但 2 种药物天上午 10 时同时应用,持续 24 h 后第 2 天重复,疗程及周期也相同。结果:时辰化疗组完全缓解率和有效率分别为 18.5% 和 66.7%;常规化疗组完全缓解率和有效率分别为 8.7% 和 39.1%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。时辰化疗组白细胞、血红蛋白、血小板等骨髓毒性反应发生率也显著低于常规化疗组($P < 0.05$)。

金风等^[25]报告了 60 例初治鼻咽癌患者,随机分为时辰化疗组 30 例,常规化疗组 30 例,所有病例均采用两周期化疗后放疗。时辰化疗组应用 BRAUN 泵 DDP 80 mg/m²,(5 ml/h,3 天)于每天 10 00~22 00;5-Fu 750 mg/m² 于 22 00 至第二日 10 00,CF 200 mg/m²,每天 10 00 开始给药,按常规输液速度,连用 3 天,14 天 1 周期,共 2 周期;常规化疗组用药量同时辰组,每天 10 00 开始,DDP 和 CF 按常规输液速度进行,5-Fu 每天 24 h 持续输注,连用 3 天,14 天 1 周期,共 2 周期。结果:时辰化疗组中,CR 率为 28%, $(7/25)$ PR 率为 68%(17/25),有效率为 96%(24/25);常规化疗组 CR 率为 15.4%(4/26),PR 率为 53.8%(14/26),有效率为 69.2%(18/26)。两组比较有效率(CR + PR)差异有统计学意义($P < 0.05$),但两组 CR 率差异无统计学意义($P > 0.05$)。对免疫功能的影响,时辰化疗组治疗前后 CD3、CD4、CD8、CD19、CD16+56 都

存在显著性差异,常规化疗组治疗前后各指标差异无统计学意义。

3 展望

近年来时间生物医学在基础研究和肿瘤临床治疗上的进展为肿瘤的早期诊断、治疗提供了新的手段和方法。毫无疑问,时辰化疗的应用与常规化疗方法相比,在病人的有效率和耐受性方面都有很大进展,且适应范围也随着临床实践经验的总结在不断地扩大。与此同时,时间药理学以及肿瘤时间化疗发展带动了一些相关技术的进步,例如,便携式多通道时间程控输液泵已用于临床,腕式活动变化记录仪、药物控释技术也逐步得到开发和应用。腕式活动变化记录仪记录每个患者的休息-活动节律,并制定相应的时间化疗方案。时辰化疗专用药泵-多通道编程输液泵亦为时辰化疗提供了方便,应用该泵进行电脑调控,严格控制药物达峰时间,近年来也在鼻咽癌肿瘤患者中广泛应用。时辰化疗方案的实施,将会为推动“老药新用”的临床研究和新药品种的开发和利用,呈现更加广阔前景,也可能将带来更大的社会效益和经济效益。总之,时辰化疗是一门新的治疗方法,还有许多问题需要进一步探讨,应用前景广阔。

参考文献:

- [1] Okamura H. Clock genes in cell clocks: Roles, actions, and rays—series[J]. *J Biol Rhythms*, 2004, 19(5):388-399.
- [2] Panda S, Hogenesch JB. It's all in the timing: Many clocks, many outputs[J]. *J Biol Rhythms*, 2004, 19(5):374-387.
- [3] Duffield GE. DNA microarray analyses of circadian timing: The genomic basis of biological time [J]. *J Neuroendocrinol*, 2003, 15(10):991-1002.
- [4] Sato TK, Panda S, Kay SA, et al. DNA arrays: Applications and implications for circadian biology [J]. *J Biol Rh~hms*, 2003, 18(2):96-105.
- [5] Panda S, Antoch MP, Miller BH, et al. Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock [J]. *Cell*, 2002, 109(3):307-320.
- [6] Burns ER. Circadian rhythmicity in DNA synthesis in untreated and saline-treated mice as a basis for improved chronochemotherapy . *pyl J*. *Cancer Res*, 1981, 41(7):2795-2802.
- [7] Qu Y, Wang Z, Huang X, et al. Circadian telomerase activity and DNA synthesis for timing peptide administration [J]. *Peptides*, 2003, 24(3):363-369.
- [8] Davis S, Mirick DK, Stevens RG. Night shift work, light at night, and risk of breast cancer [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2001, 93(20):1557-1562.
- [9] Chen ST, Cho KB, Hou MF, et al. Deregulated expression of the PER1, PER2 and PER3 genes in breast cancers[J]. *Carcinogenesis*, 2005, 26(7):1241-1246.
- [10] Lundkvist GB, Robertson B, Mhlanga JD, et al. Expression of alloscillating interferon-gamma receptor in the suprachiasmatic nuclei[J]. *Neuroreport*, 1998, 9(6):1059-1063.
- [11] Koren S, Whorton EB Jr, Fleischmann WR Jr. Circadian dependence of interferon antitumor activity in mice [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1993, 85(23):1927-1932.
- [12] Perez-Lopez FR, Guillen V, Hergueta J, et al. Chronochemotherapy of N-nitrosomethylurea-induced mammary tumors in rats. . Circadian treatment with cyclophosphamide [J]. *Rev Esp Oncol*, 1984, 31(4):583-589.
- [13] Levi F. Chronotherapeutics: The relevance of timing in cancer therapy[J]. *Cancer Causes Control*, 2006, 17(4):611-621.
- [14] Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Lardone PJ, et al. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system [J]. *Endocrinology*, 2005, 146(2):189-200.
- [15] Blask DE, Sauer LA, Dauchy RT. Melatonin as a chronobiotic/anticancer 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.
- [16] Anisimov VN. Light pollution reproductive function and cancer risk[J]. *Neuro Endocrinol Lett*, 2006, 27(1-2):35-52.
- [17] Gorbacheva VY, Kondrator 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 USA*, 2005, 102(9):3407-3412.
- [18] Geara FB, Glisson BS, Sanguineti G, et al. Induction chemotherapy followed by radiotherapy versus radiotherapy alone in patients with advanced nasopharyngeal carcinoma: Results of a matched cohort study[J]. *Cancer*, 1997, 79(7):1279-1286.
- [19] 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.
- [20] 孙健,洗励坚,曹弃元,等.荷人鼻咽癌裸鼠骨髓细胞DNA合成及凋亡相关基因表达的生物节律的初步研究[J].癌症,2002,21(8):833-837.
- [21] 吴明玮,洗励坚,李晓梅,等.二氢嘧啶脱氢酶、胸苷酸合成酶、c-myc 和 p53 基因在小鼠肝组织中表达的昼夜节律性研究 [J]. 癌症, 2004, 23(3):235-242.
- [22] Levi F. Cancer chronotherapy[J]. *J Pharm Pharmacol*, 1999, 51(8):891-898.
- [23] 郭灵,林焕新,邱枋,等.5-Fu 与 DDP 时间调节化疗治疗晚期鼻咽癌的初步临床观察 [J]. 中国肿瘤临床, 2004, 31, (13): 721-724.
- [24] 杨兴龙,刘杰.一种晚期复发鼻咽癌(NPC)的时辰化疗方案疗效观察[J]. 中国肿瘤临床, 2001, 28, (1):42-45.
- [25] 金风,欧阳金陵,董红敏,等.鼻咽癌 DDP + 5-Fu/CF 方案时辰化疗的临床前瞻性随机研究 [J]. 中国肿瘤临床, 2004, 31, (19):1123-1125.

[编辑:贺文;校对:杨卉]