

肿瘤细胞生物钟同步化细胞模型建立及其在 时辰给药研究中的应用

秦文娟¹, 潘梅萍², 苏泽杰², 侯茹蓉¹, 陆海杰^{1*}, 乐志操^{3*}

(1. 厦门大学附属中山医院肿瘤放疗科, 福建 厦门 361004; 2. 福州大学生命科学研究所, 福建 福州 350116; 3. 卡尔森国际肿瘤中心, 深圳大学医学部, 广东 深圳 518055)

摘要: 生物钟与肿瘤的发生和治疗都密切相关, 但目前体外培养的肿瘤细胞的同步化方法欠佳, 导致体外培养的肿瘤细胞很难表现出生物钟节律现象。采用悬浮培养的方法, 同时进行同步化处理, 定时取样分析, 在体外细胞培养体系中获得良好的周期性生物钟节律。将该同步化培养方法用于不同的生物钟节律阶段给药, 能引起肿瘤细胞的差异反应, 即时辰化疗给药的效果。该研究提供了一种可以在体外细胞培养体系中广泛采用的生物钟同步化新方案, 可用于探讨生物钟调控肿瘤细胞药物反应的机制。

关键词: 生物钟; 肿瘤治疗; 同步化; 药物反应; 细胞培养

中图分类号: R 73-3 **文献标志码:** A

生物钟, 即对生命活动的昼夜节律控制, 多方面影响人体健康^[1, 2]。研究表明, 生物钟节律的破坏, 与肿瘤的发生密切相关, 对肿瘤治疗也有重要影响^[1-4]。目前有很多研究试图开发调控生物钟的小分子药物, 以促进对代谢疾病和肿瘤的治疗^[5-8]。

中枢生物钟由大脑海马区的视交叉上核控制, 在光照的影响下形成周期性的基因表达模式, 并通过激素及其它信号分子调控外周组织的生物钟^[1, 9]。中枢生物钟与外周组织细胞中的生物钟如何偶联并受到调控是一个重要的问题, 其中的具体机制至今仍不清楚。通常认为生物钟的节律是在基因的转录和蛋白质的稳定性方面受到多重反馈机制的调控, 其中最重要的是 CLOCK 与 BMAL1 组成的转录活化因子复合体, 和 PERIOD (PER) 与 CRYPTOCHROME (CRY) 组成的转录抑制因子复合体, 共同调节相关基因的周期性表达^[1]。此外, 神经肽, 激素 (如褪黑素, 甲状腺素), cAMP, 钙离子信号, NF- κ B 信号等, 都可以调节生物钟的周期性和相关基因的表达^[10-15]。

收稿日期: 2019-04-25 **录用日期:** 2020-03-04

基金项目: 福建省自然科学基金 (2017J01372); 福建省教育厅科技项目 (JK2015019); 厦门市科技计划项目 (3502Z20174083)

***通信作者:** luhajiedr@163.com (陆海杰); zyue@szu.edu.cn (乐志操)

虽然生物钟相关基因在每个细胞中都有表达，但是因为其节律是单独调控的，在体外培养的情况下缺乏整体的同步化机制。为此，有人开发了单细胞报告基因的技术，在单细胞水平进行实时检测^[8]，但是这个方法并不容易进行。为了在培养肿瘤细胞的群体水平观察到周期性的生物钟相关基因表达，有研究者提出了通过添加 Forskolin 活化 cAMP 信号通路，对培养细胞的生物钟进行同步化处理^[13]。同时，为了更好的观察到周期性的生物钟相关基因表达，人们还开发了增强生物钟节律的小分子药物如 Nobiletin，以提高观察效果^[8]。但是在体外培养的细胞群体中仍然难以实现周期性的生物钟相关基因表达。

生物钟对肿瘤治疗的效果及预后具有重要影响^[16-22]。根据生物钟调节组织细胞活性的作用，人们形成了时辰化疗的概念，即根据特定的生物节律给予治疗可以看到肿瘤细胞不同的反应情况，有希望增强治疗效果并降低副作用^[23-27]。在体外培养系统中获得并维持同步化的肿瘤细胞是研究的一个难点。我们对此进行了一些探索，发现要有效实现生物钟同步化，需要维持细胞间的通讯。而采用悬浮培养的方法可以有效实现这一点，同时还可以方便地开展进一步的时辰给药研究。

1 材料和方法

1.1 材料

HCT116 人结肠癌细胞购买自上海中科院细胞库（目录号 TCHu 99）。细胞培养采用的 DMEM 购买自 ThermoFisher 中国（Gibco），胎牛血清购买自 Hyclone。Forskolin 购买自 Sigma-Aldrich（F6886），Nobiletin 购买自 MedChemExpress（HY-N0155）。提取细胞总 RNA 采用的 Trizol 试剂购买自南京诺维赞生物科技有限公司（R401-01），反转录试剂盒（RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, K1622）购买自 Fermentas，实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）反应试剂购买自北京康为世纪生物科技有限公司（CW0957），qRT-PCR 在 Roche LC-480 qRT-PCR 仪完成。其它生化试剂均购买自生工生物工程（上海）股份有限公司。细胞观察采用 Nikon Eclipse Ti 倒置荧光显微镜，台盼兰活性染色照相采用 Leica DM6000B 正置显微镜。

1.2 细胞贴壁培养

HCT116 细胞在 DMEM 培养液（含 10% 胎牛血清）中，37 °C，5% 二氧化碳湿润培养箱中培养。细胞长至 100% 后以 1:3 传代至 24 孔板中。待细胞长满后，加入含 10 μmol/L Forskolin 培养基进行 2 h 同步化处理，然后以 PBS 洗涤一次，再加入含 5 μmol/L Nobiletin 培养基增强生物钟基因表达。每 4~6 h 取样一次，每个孔为一个样品。

1.3 细胞悬浮培养

悬浮培养采用 6 cm 细菌培养板（江苏悦成），每孔加入 2×10^6 HCT116 细胞。培养 2 d 后，加入含 10 $\mu\text{mol/L}$ Forskolin 培养基进行 2 h 同步化处理，然后以 PBS 洗涤一次，加含 5 $\mu\text{mol/L}$ Nobiletin 培养基增强生物钟基因表达。每 6 h 取样一次，取样时以 200 μL 吸头取约 50 μL 细胞培养液进行基因表达分析。培养细胞的活性通过 0.1% 台盼兰染色检测。

1.4 细胞总 RNA 提取和 qRT-PCR

细胞总 RNA 提取采用 Trizol 法，按照试剂盒所附操作步骤进行。总 RNA 经 DNase 酶消化后反转录为 cDNA。经凝胶电泳检验基因扩增的特异性后，进行 qRT-PCR 基因表达定量分析。PCR 条件：95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min；95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，共 40 个循环；最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。采用 β -ACTIN 为参比基因，以 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法计算基因的相对表达量。所用引物及序列在表 1 中列出。

表 1 本研究所用引物及其序列

Tab. 1 Primer used in this study and their sequences

基因名称	基因序列号	引物序列(5'→3')
ACTB	NM_001101	正向: ACC ACC ATG TAC CCT GGC AT
		反向: TTG CTG ATC CAC ATC TGC TG
CLOCK	NM_001267843	正向: GGC ACC ACC CAT AAT AGG GTA
		反向: TGT TGC CCC TTA GTC AGG AAC
BMAL1	NM_001030272	正向: AAA GAG GAC CCA CCC CAC T
		反向: GGA GGC GTA CTC GTG ATG TT
PER2	NM_022817	正向: AGT TGG CCT GCA AGA ACC AG
		反向: ACT CGC ATT TCC TCT TCA GGG
CDKN1A (P21)	NM_001291549.1	正向: CAG GGG ACA GCA GAG GAA GA
		反向: TTA GGG CTT CCT CTT GGA GAA
FAS	NM_000043.6	正向: AAT CCT GAA ACA GTG GCA ATA
		反向: GTC ATA CGC TTC TTT CTT TCC

1.5 统计学分析

所有实验均重复 3 次，数据以平均值 \pm 标准差的方式表示。差异显著性检测采用双尾 Student's *t*-检验。不同显著性水平表示如下：* $p < 0.1$ ；** $p < 0.01$ ；*** $p < 0.001$ 。

2 结果与分析

2.1 人结肠癌细胞系 HCT116 模型中生物钟相关基因的动态表达情况

我们采用人结肠癌细胞系 HCT116 为模型，检测其生物钟相关基因的动态表达情况。传代后的细胞如果未进行处理，仅仅在不同时间点进行取样检测，发现生物钟相关基因 CLOCK、BMAL1、PER2 的表达均没有表现出明显的周期性特征（图 1A-C）。当以 10 $\mu\text{mol/L}$ Forskolin 处理 2 h 对细胞进行同步化，然后再继续培养于包含 5 $\mu\text{mol/L}$ Nobiletin 的条件下，可以看到 CLOCK 和 PER2 基因的表达表现出一定的周期性特征，即能显示一个大约 24 h 的节律，但是 BMAL1 的表达仍然没有同步化。因此，在培养的肿瘤细胞中，很难在群体水平获得周期性的生物钟基因的表达模式。

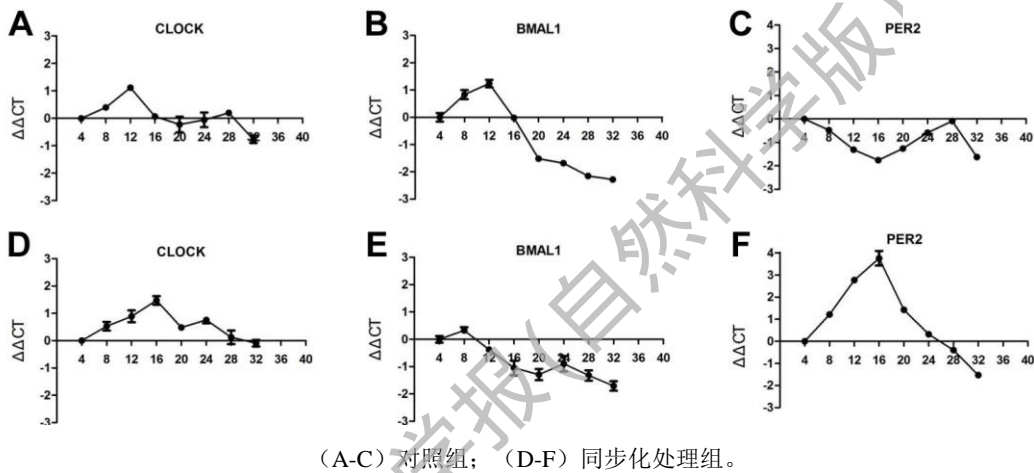
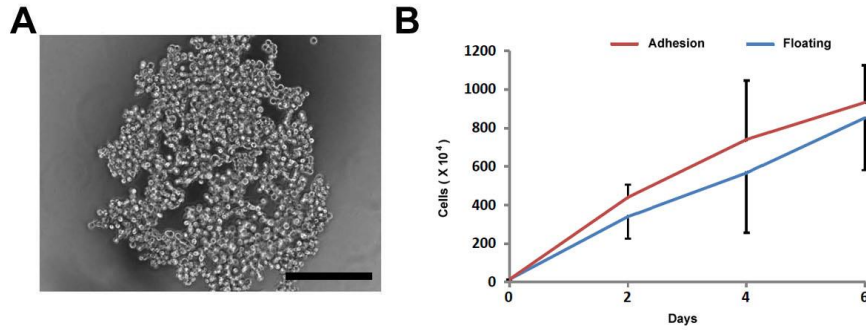


图 1 同步化处理对 HCT116 肿瘤细胞生物钟基因表达的影响

Fig. 1 Impact of synchronization on the periodic clock gene expression in cultured HCT116 tumor cells

2.2 悬浮培养的肿瘤细胞中生物钟基因的表达情况

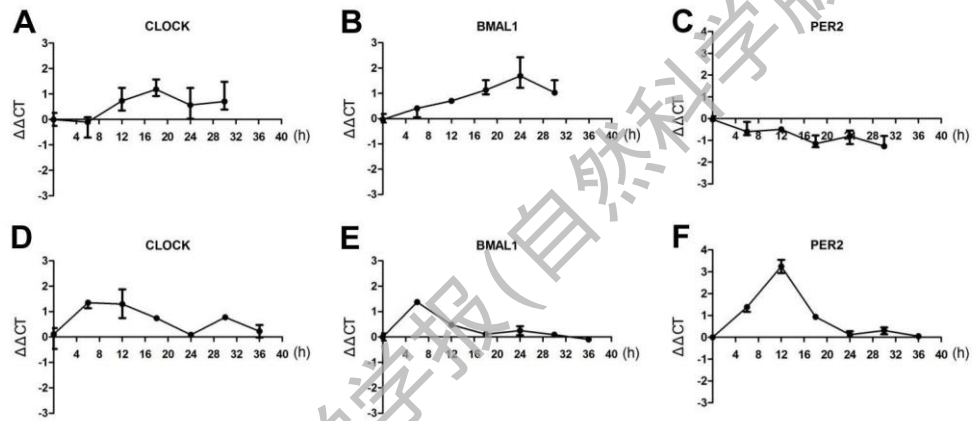
为了维持培养细胞间的联系和通讯，参考胚胎干细胞培养中在低粘附的细胞培养板上形成胚样小体以进行体外细胞分化的方法^[28]，把肿瘤细胞在低粘附的细菌培养皿中进行悬浮培养（图 2A），使细胞保持在同样的环境中，而且可以定时多次取样分析。在这种培养条件下，细胞保持悬浮状态，并正常扩增（图 2B）。可见，这个方法可以保持肿瘤细胞的活性，维持细胞处于相同的环境且一定程度上保持细胞间联系和通讯。对悬浮培养的肿瘤细胞进行基因表达检测，在未经 Forskolin 同步化处理的悬浮培养细胞中，周期性的生物钟基因表达也不明显（图 3A-C）；经同步化处理后，3 个生物钟相关基因 CLOCK、BMAL1、PER2 均表现出周期性的动态表达（图 3D-F）。因此，通过同步化处理以后，悬浮培养的肿瘤细胞可以表现出生物钟的节律性。



(A) HCT116 细胞悬浮培养形态，Bar = 100 μm ； (B) 悬浮培养与贴壁培养生长情况比较。

图 2 HCT116 肿瘤细胞悬浮培养

Fig. 2 Suspension culture of HCT116 tumor cells



(A-C) 对照组； (D-F) 同步化处理组。

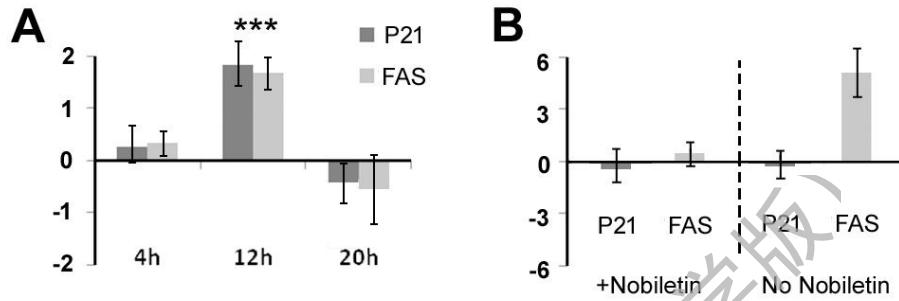
图 3. 悬浮培养 HCT 116 细胞可获得良好的生物钟基因周期性表达

Fig. 3 Suspension culture of tumor cells can obtain good periodic rhythm expression of circadian clock

2.3 悬浮培养的肿瘤细胞对化疗药物的时辰反应

为了检验上述悬浮培养方法是否能够用于评价化疗药物的时辰反应，我们将治疗结直肠癌的药物 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 在不同节律点加入，检测其引起肿瘤细胞反应的差异，包括对生长和凋亡基因 *P21/FAS* 的表达调控^[23-25]。结果显示，在同步化处理 4 h 或 20 h 后加入 5-FU，均不能引起显著的反应；而在同步化处理 12 h 后加入 5-FU 则引起了 *P21/FAS* 基因表达水平的显著上升 (图 4A)。由此表明悬浮培养的肿瘤细胞可以表现出对化疗药物的时辰反应。此外我们发现，如不进行同步化处理，5-FU 不能引起 *P21/FAS* 基因的表达变化 (图 4B)。这可能是因为在我们的培养体系中加入的 Nobiletin 具有抗氧化剂的功能，对细胞起到

了一定的保护作用。事实上，在未同步化的细胞培养体系中，如果不进行 Nobiletin 处理，可以看到 *P21* 基因的表达变化不显著，但是 *FAS* 基因的表达明显上升，说明化疗药物可以在 1 h 内引起明显的基因表达变化，虽然在具体的基因表达动态上存在一些差异（图 4B）。对实验中所有检测的基因及其使用的引物进行验证，表明该分析能够体现出正确的基因表达（结果未显示）。



(A) 同步化的 HCT116 细胞对化疗药物 5-FU 的时辰反应，*** $p < 0.001$ 。(B) 未同步化的细胞（1 h）对化疗药物 5-FU 的反应差别。

图 4 同步化肿瘤细胞对化疗药物的时辰反应

Fig. 4 Differences in response of cancer cells to chemotherapeutic drugs at different time points of biological clock rhythm

3 讨论

3.1 生物钟的同步化新方法

生物个体的生物钟，由控制昼夜节律的海马区视交叉上核中枢生物钟所调控^[1, 9]。中枢生物钟经由光照等外部环境校准，而体内各组织器官都有自己的外周生物钟，这些外周生物钟都受到中枢生物钟的调控。营养、激素和神经肽等分子都是调控外周生物钟的分子^[10-15]。这些校准和调控因素在体外培养的肿瘤细胞中是缺乏的，因此，尽管每个细胞都表达生物钟相关基因，但是在群体水平上，这些生物钟无法同步化且不能形成周期性的基因表达模式。研究表明，cAMP 信号，钙离子信号等可以有效重置细胞的生物钟节律，使培养细胞的生物钟同步化^[13]。本研究结果表明，即使进行了同步化处理，若使细胞培养于不同的条件，如在不同的培养孔中，一旦失去了相互通讯和群体水平的调控，其周期性节律也很快丢失。因此，我们推测生物钟的同步化与体内各组织器官和细胞间的通讯密切相关。

为了实现体外培养的肿瘤细胞中生物钟相关基因能够周期性表达，我们采用悬浮培养的方法。此方法是借鉴了胚胎干细胞体外分化所采用的悬浮培养方法，在低粘附的培养条件下，使

细胞成团，形成胚样小体，促进其分化^[28]。最近有报道提出，对肿瘤组织进行类器官培养（Organoid），也是在类似低粘附的情况下进行细胞团悬浮培养^[29,30]。我们对肿瘤细胞也采用类似的方法，在低粘附条件下，维持细胞在同样的培养环境中，而且保持一定的细胞间通讯。结果表明，在这种情况下，对细胞进行同步化处理后，能够很好地保持一致的生物钟基因表达动态。肿瘤细胞在获得不依赖于基质的生存和迁移能力后，在不贴壁的情况下仍然能够保持正常生长和活力，这与正常组织细胞有较大区别，也是本研究中能够进行悬浮培养的保障。我们的方法在原理上与这些方法类似，操作简单，对培养板的材料选择不需要具有细胞贴壁的功能而更加广泛。

3.2 时辰放化疗

前期较多报道^[23-27]讨论了不同时间段给药后，肿瘤对放化疗的反应有较大差异，因而形成了时辰放化疗的概念。许多临床实验发现，与常规化疗模式相比，包括卵巢癌^[31]、肺癌^[32]、胶质母细胞瘤^[33]等疾病，时辰化疗在不降低疗效的前提下，明显降低了药物毒副作用，提高了治疗的依从性。这与机体自身的生物钟节律相关，也与药物的代谢动力学密切相关。选择合适的用药时机，有望达到最大化的杀伤肿瘤细胞效果和最小毒副作用，从而改善患者生存质量。

氟尿嘧啶（5-FU）是治疗消化道肿瘤常用的化疗药。研究表明，二氢嘧啶脱氢酶（DPD）是 5-FU 代谢的限速酶，进入人体的 5-FU 多在肝脏代谢，经过 DPD 代谢成二氢氟尿嘧啶排出体外。DPD 的昼夜分泌具有明显的节律性，从 22:00 到 10:00 连续 12 h 给药，最佳给药时间是凌晨 04:00，较其他时间其活性提高了 50% 以上^[23]。我们的研究也发现，在同步化处理 12 h 后，5-FU 引起了最强的 *P21/FAS* 反应，而其它时间段或者未同步化处理的细胞则没有明显反应。因此，生物节律确实可以导致不同的药物反应，对时辰化疗的概念提供了支持证据。后续研究将针对生物节律是如何导致药物反应差别进行进一步探讨。其它药物如顺铂、草酸铂等也表现出显著的时辰治疗效应^[23-27]。本研究中基于悬浮细胞的系统也适用于探讨这些药物的生物节律反应特征。

3.3 本研究的前景和展望

本研究建立了在体外细胞悬浮培养中同步化生物钟的新方法，并基于该方法对肿瘤细胞的时辰给药反应进行了探讨，发现同步化的细胞对化疗药物表现出明显的时辰反应。作为原理验证，在此我们只检测了一种细胞类型。然而，理论上该方法可以应用于其他类型的肿瘤细胞培养中，从而有助于生物钟与肿瘤治疗的相关研究。将来通过对更多肿瘤细胞类型和化疗药物进行研究，并对肿瘤类器官的培养进行分析，可进一步丰富我们对生物钟如何影响肿瘤治疗的认识。

参考文献:

- [1] JOSEPH ST. Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock[J]. *Nat Rev Genet*, 2017, 18(3):164-179.
- [2] VILLANUEVA M T. Cancer: reset your circadian clock[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17(3):166.
- [3] PAPAGIANNAKOPOULOS T, BAUER M R, DAVIDSON S M, et al. Circadian rhythm disruption promotes lung tumorigenesis[J]. *Cell Metab*, 2016, 24(2):324-331.
- [4] KHAN S, DUAN P, YAO L, et al. Shiftwork-mediated disruptions of circadian rhythms and sleep homeostasis cause serious health problems[J]. *Int J Genomics*, 2018, 21(8):8576890.
- [5] CHEN Z, YOO SH, TAKAHASHI JS. Development and therapeutic potential of small-molecule modulators of circadian systems[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2018, 58:231-252.
- [6] CHEN Z. What's next for chronobiology and drug discovery[J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2017, 12(12):1181-1185.
- [7] GLOSTON G F, YOO S H, CHEN Z J. Clock-enhancing small molecules and potential applications in chronic diseases and aging[J]. *Front Neurol*, 2017, 15(8):100.
- [8] HE B, NOHARA K, PARK N, et al. The small molecule Nobiletin targets the molecular oscillator to enhance circadian rhythms and protect against metabolic syndrome[J]. *Cell Metab*, 2016, 23(4):610-621.
- [9] FAN S M, CHANG Y T, CHEN C L, et al. External light activates hair follicle stem cells through eyes via an ipRGC-SCN-sympathetic neural pathway[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2018, 115(29):E6880-E6889.
- [10] SELCHO M, MILLÁN C, PALACIOS-MUÑOZ A, et al. Central and peripheral clocks are coupled by a neuropeptide pathway in *Drosophila*[J]. *Nat Commun*, 2017, 8:15563.
- [11] HARDIN P E, PANDA S. Circadian timekeeping and output mechanisms in animals[J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2013, 23(5):724-731.
- [12] PALACIOS-MUÑOZ A, EWER J. Calcium and cAMP directly modulate the speed of the *Drosophila* circadian clock[J]. *PLoS Genet*, 2018, 14(6):e1007433.
- [13] O'NEILL J S, MAYWOOD E S, CHESHAM J E, et al. cAMP-dependent signaling as a core component of the mammalian circadian pacemaker[J]. *Science*, 2008, 320:949-953.
- [14] HARDMAN J A, HASLAM I S, FARJO N, et al. Thyroxine differentially modulates the peripheral clock: lessons from the human hair follicle[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3):e0121878.
- [15] HONG H K, MAURY E, RAMSEY K M, et al. Requirement for NF- κ B in maintenance of molecular and behavioral circadian rhythms in mice[J]. *Genes Dev*, 2018, 32(21/22):1367-1379.
- [16] GU D, LI S, BEN S, et al. Circadian clock pathway genes associated with colorectal cancer risk and prognosis[J]. *Arch Toxicol*, 2018, 92(8):2681-2689.
- [17] ZENG Z L, LUO H Y, YANG J, et al. Overexpression of the circadian clock gene *Bmal1* increases sensitivity to oxaliplatin in colorectal cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(4):1042-1052.
- [18] FANG L, YANG Z, ZHOU J, et al. Circadian clock gene *CRY2* degradation is involved in chemoresistance of colorectal cancer[J]. *Mol Cancer Ther*, 2015, 14(6):1476-1487.
- [19] WANG Y, SUN N, LU C, et al. Upregulation of circadian gene 'hClock' contribution to metastasis of colorectal cancer[J]. *Int J Oncol*, 2017, 50(6):2191-2199.
- [20] FUHR L, EL-ATHMAN R, SCRIMA R, et al. The circadian clock regulates metabolic phenotype rewiring via *HKDC1* and modulates tumor progression and drug response in colorectal cancer[J]. *EBioMedicine*, 2018, 33:105-121.
- [21] LESICKA M, JABŁÓŃSKA E, WIECZOREK E, et al. Altered circadian genes expression in breast cancer tissue according to the clinical characteristics[J]. *PLoS One*, 2018, 13(6):e0199622.
- [22] LU H, CHU Q, XIE G, et al. Circadian gene expression predicts patient response to neoadjuvant chemoradiation therapy for rectal cancer [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(9):10985-10994.
- [23] 周晓芳, 林能明. 抗肿瘤药物的时辰药理学与临床应用[J]. *中国肿瘤*, 2009, 9:759-763.
- [24] LÉVI F, ZIDANI R, MISSET J L. Randomised multicentre trial of chronotherapy with oxaliplatin fluorouracil, and folinic acid in metastatic colorectal cancer[J]. *Lancet*, 1997, 350 (9079):681-686.
- [25] 彭小东, 宋来, 张舰, 等. 时辰化疗对中国结直肠癌患者有效性及安全性的 Meta 分析[J]. *中国肿瘤临床与康复*, 2018, 8(2):31-35.
- [26] 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, 111:41-50.

- [27] ZHANG J, ZHU B, LIU YY, et al. High expression of circadian gene mPer2 diminishes radiosensitivity of tumor cells[J]. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 2008, 23(5):561-570.
- [28] LANZA R, ATALA A. *Handbook of stem cells*[M]. New York: Academic Press, 2013.
- [29] DROST J, CLEVERS H. Organoids in cancer research[J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(7):407-418.
- [30] VAN DE WETERING M, FRANCIES H E, FRANCIS J M, et al. Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients[J]. *Cell*, 2015, 161(4):933-945.
- [31] KOBAYASHI M, WOOD P A, HRUSHESKY W J. Circadian chemotherapy for gynecological and genitourinary cancers[J]. *Chronobiol Int*, 2002, 19: 237-251.
- [32] LI J, CHEN R, JI M, et al. Cisplatin-based chronotherapy for advanced non-small cell lung cancer patients: a randomized controlled study and its pharmacokinetics analysis[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2015, 76:651-655.
- [33] SLAT E A, SPONAGEL J, MARPEGAN L, et al. Cell-intrinsic, Bmal1-dependent circadian regulation of temozolomide sensitivity in glioblastoma. *J Biol Rhythms*, 2017, 32:121-129.

Cancer cell clock synchronization based on suspension culture and its application in the study of time administration

QIN Wenjuan¹, PAN Meiping², SU Zejie², HOU Rurong¹, LU Haijie^{1*},
YUE Zhicao^{3*}

(1. Department of Radiation Oncology, Zhongshan Hospital, Xiamen University, Xiamen 361004, China ; 2. Institute of Life Sciences Fuzhou University, Fuzhou 350116, China; 3. Carson International Cancer Center, Health Science Center, Shenzhen University, Shenzhen 518055, China)

Abstract: Biological clock is intricately linked with tumor formation and its prognosis after treatment. Cancer cell culture is an important tool for *in vitro* investigation, particularly for drug development. However, cancer cells cultured *in vitro* showed weak biological rhythm due to lack of good method to synchronize their clock. We hypothesize that cell-cell communications are important for maintaining a sustained rhythm. Here we developed a new method to overcome this problem: cancer cells are cultured in suspension and synchronized, and sampled at designated time points for analysis. Well defined biological rhythm is achieved by this method. We are able to demonstrate that under the same treatment protocol, drugs induce different responses at different rhythmic stages. Thus our method can be widely applied to characterize the mechanism of how biological clock regulates chemotherapy responses in cell culture.

Keywords: biological clock; cancer therapy; synchronize; drug response; cell culture