

血清维生素 D 与肿瘤的关系及其检测方法的研究进展

姜烈君(综述), 黄华艺(审校)

作者单位: 530021 南宁, 广西壮族自治区人民医院检验科

作者简介: 姜烈君(1970-), 女, 医学硕士, 副主任技师, 研究方向: 血液学检验。E-mail: nndd_lz@163.com

通讯作者: 黄华艺(1964-), 男, 医学博士, 研究员, 研究方向: 医学检验。E-mail: huayih@yahoo.com; Huayih.Huang@Roswellpark.org

[摘要] 维生素 D 是一类甾体化合物, 具有多种生物学功能, 包括促进小肠对钙和磷的吸收、构建和维持骨质的硬度等。近年的研究发现, 维生素 D 能抑制肿瘤细胞增殖和诱导分化、凋亡以及对某些癌症的发生有预防作用。因此, 测定血清维生素 D 浓度可能对肿瘤的发生和发展判断有帮助。然而, 除了乳腺癌外, 血清维生素 D 与肿瘤的关系仍然存在很大的争议, 研究结果很不一致, 因此仍需进一步深入开展相关探讨。该文就血清维生素 D 浓度与肿瘤的关系及其检测方法进行综述。

[关键词] 血清维生素 D; 肿瘤; 液相色谱-串联质谱法; 化学发光免疫测定法

[中图分类号] R 73-7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2014)10-0986-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2014.10.33

Association between serum vitamin D level and cancer and its detection methods JIANG Lie-jun, HUANG Hua-yi. The People's Hospital Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

[Abstract] Vitamin D (VD) is a group of steroid compounds, which plays an important role in a variety of biological functions including promoting the intestinal absorption of calcium and phosphorus, building and maintaining the bone hardness. Recently studies have found that VD exerts cell proliferation inhibition, cell differentiation and apoptosis induction, and chemoprevention properties. Studies showed that there is a clear association between serum VD level and breast cancer. However, in other types of cancer, study results on the relationship between serum VD and cancers are still controversy, inconclusive or contradictory. This article discuss and summarize the relationship between serum VD concentration and cancer and its detection methods.

[Key words] Serum Vitamin D; Cancer; LC-MS/MS; Chemiluminescence immunoassay

维生素 D (Vitamin D, VD) 为固醇类衍生物, 是一组脂溶性维生素。VD 主要存在两种形式: 麦角钙化醇 (ergocalciferol, VD₂) 和胆钙化醇 (cholecalciferol, VD₃)。VD₂ 是在植物体内合成, 而 VD₃ 是由人皮肤在接受阳光中的紫外线照射时合成, 体内合成被认为是维持 VD 水平的主要方式。因此, 对血清 VD 水平的检测反映内源性合成和食物 VD 的摄入量。血清 25-羟胆钙化醇 [25(OH)D] 是合成 1, 25(OH)₂D₃ 的前体, 是维生素 D 的主要循环形式, 其半衰期较长, 血中浓度较稳定, 可直接反映机体维生素 D 的水平。而 1, 25(OH)₂D₃ 是最具活性的维生素 D 代谢物^[1]。

1 维生素 D 的生理功用及其代谢

VD 对小肠吸收钙和磷, 维持血液中正常的钙

和磷浓度起到构建和维持骨质硬度的作用。此外, VD 对细胞增殖、分化、凋亡的维持起重要的调节作用。VD₃ 可影响神经肌肉功能和炎症的发生^[2], VD 缺乏也可能是一个潜在的心血管疾病的危险因素^[3]。然而除了防止佝偻病发生和软骨病的作用得到肯定以外, VD 在其他方面的作用仍存在很大的争议。VD 经血液运输到达肝脏后被转化为 25(OH)D, 然后被运输到肾脏。在肾脏, 部分的 25(OH)D 被转化为 1, 25(OH)₂D₃。VD₃ 在肾脏合成后就被释放到血液循环中并与血浆中的 VD 结合蛋白 (VDBP) 结合而被运输到各个效应器官。VD₃ 通过与靶细胞核中的维生素 D 受体 (VDR) 结合而介导细胞生物学功能^[4]。VD₃ 与 VDR 结合后使后者成为转录因子, 对转运蛋白类基因的表达起调节作

用,而这些转运蛋白与小肠对钙的吸收有关。已知 VDR 参与细胞增殖、分化和免疫调节等作用,VD 缺乏和低钙摄入被认为与数种癌症的发生有关。肾脏中的 25-羟 VD1-羟化酶(CYP27B1)能使皮肤合成或食物中得到的 VD 激活,而 1,25-羟 VD 24-羟化酶(CYP24A1)则降解活化的 VD 产生数个代谢产物。肾脏中的这两种 VD 羟化酶控制血清 VD3 水平,维持正常的血清 VD 浓度。所以,血清中低 25(OH)VD 浓度与多种癌症和慢性疾病的发生有关^[5]。

2 血清 VD 水平与肿瘤的关系

血清 25(OH)VD 浓度被认为与数种疾病的死亡率有关,但结果仍有争论。有人对 5 469 例 50 ~ 74 岁德国人进行为期 5 年的血清 25(OH)VD 浓度跟踪分析,期间共有 1 083 名被调查者发生死亡,其中 350 例死于心血管疾病,433 例死于癌症,55 例死于呼吸系统疾病。统计结果发现,与血清 25(OH)D 缺乏(<30 ng/ml)或不足(30 ~ 50 ng/ml)相关的总体死亡率明显升高。因此,认为 VD 缺乏也与心血管病、癌症和呼吸系统疾病死亡率升高有关^[6]。Rosen 等^[7]对存活的儿童癌症患者血清中 25(OH)D 水平进行了观察,以比较各种癌症间的血清 VD 浓度的差别。结果发现,不同癌症中的血清 25(OH)D 水平差别很大,以骨肉瘤、视网膜母细胞瘤、肝胚细胞瘤和髓系白血病为最低。年龄与 25(OH)D 水平呈反比关系。25(OH)D 平均水平是 29.8(5 ~ 79.7)ng/ml。14.4% 的患者有 VD 缺乏,39.3% 有 VD 不足,而 46.3% 的患者血清 VD 正常,不到一半的儿童癌症存活患者血清 25(OH)D 正常,并随病程进展而降低,患实体瘤的儿童受影响最大。Grant 等^[8]对非洲人和美国白人的调查发现,高血清 25(OH)D 浓度与 20 多种癌症的发生率和(或)死亡率呈负相关关系,并与 8 种癌症的存活率改善有关。太阳光的紫外线 B(UVB)和血清 25(OH)D 浓度与膀胱癌、乳腺癌、大肠癌、子宫内膜癌、肺癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、直肠癌、睾丸癌、阴道癌、何杰金淋巴瘤和皮肤癌这 13 种癌症的发生和死亡率有负相关关系。这个发现提示将来的研究应考虑测定血清 25(OH)D 浓度来解释人种间癌症存活差别,以及诊断后增加 25(OH)D 摄入以改善存活率。

VD 对基因组中靶基因活性的调节已经得到鉴定。在 VD3 干预的临床试验中,治疗组、基础组和随访组间的 miRNAs 有明显差别。在所调查的人群血清中,特定 miRNAs 的差异与血清 25(OH)VD 水平有关。这些发现提示患者饮食中的 VD3 和体外

实验中的 1,25(OH)D 不仅调节特定的 miRNA,同时也调节全基因组的 miRNA 水平^[9]。此结果给人的提示是,体内的 VD3 水平可反馈调节基因组靶基因的活性,而在癌症或其他慢性疾病中,这种反馈调节环节中的某个因素发生了失调。下面就 VD 与人类各系统癌症之间的关系进行综述。

2.1 VD 与男、女性生殖系统肿瘤的关系 实验室和临床数据提示 VD 有防止乳腺癌发生和进展的作用。血清 25(OH)D 在 ER、PR 和 HER2 三重阴性的欧洲血统乳腺癌妇女中是最低的。而在非癌症患者中,非裔妇女的血清 25(OH)D 水平比欧裔的低。因此,低血清 25(OH)D 水平被认为可能与非裔妇女易获得更具侵袭性癌有关。VD 代谢酶 CYP24A1 的两个单核苷酸多态性与非裔妇女更易患 ER 阴性乳腺癌有关^[10]。Hatschek 等^[11]对 1 800 例早期乳腺癌患者血清 25(OH)D 和 VD 相关基因的变异情况进行观察后发现,低浓度的血清 25(OH)D 水平与乳腺癌肿块大小高度相关,但与淋巴结侵袭无关。CYP2R1 和 VDBP 基因变异显著地影响血清 25(OH)D 水平,但不影响其与肿瘤大小的关系。初始诊断血清 25(OH)D 水平高(>30 ng/ml)则病人的总体存活率高。血清 25(OH)D 对绝经后妇女乳腺癌预后有明显影响,但在绝经期前则无此影响。因此认为,乳腺癌早期高血清 25(OH)D 水平体现肿瘤体积小、总体存活率高,改善乳腺癌预后,尤其是绝经后乳腺癌妇女。Peppone 等^[12]观察了 194 例乳腺癌手术患者中血清 25(OH)D 水平并与 194 非癌患者进行比较。结果发现,乳腺癌患者血中 25(OH)D 水平明显低于对照组(32.7 ng/ml vs 37.4 ng/ml)。低血清 25(OH)D 患者有更高的 ER-机率和三重受体阴性癌的现象。基底样组织型的乳腺癌妇女血清 25(OH)D 水平比导管型乳腺癌妇女低(24.2 ng/ml vs 32.8 ng/ml)。这是关于血清 VD 浓度与乳腺癌组织学类型之间的关系的报告。VD 与乳腺癌治疗预后的关系仍然不明了,Villaseñor 等^[13]观察了 585 例乳腺癌治疗后存活者血清 25(OH)D 含量。在平均 9.2 年的随访后发现,其中 48 例患者死亡,且 25(OH)D 缺乏者病死率高于 25(OH)D 正常者,但差异无统计学意义。在前列腺癌患者中,Schwartz^[14]发现低血清 25(OH)D 增加前列腺癌的病死率。此外,高血钙浓度也与前列腺癌的发生有关。然而,Weinstein 等^[15]新近的报告显示,血清 25(OH)D 浓度与前列腺癌间存在正相关关系。他们对 950 例前列腺癌患者和 964 名对照者的血清 VD 结合蛋白浓

度也进行了测定。血清 DBP 改变了血清 25(OH)D 与前列腺癌的相互作用。血清 DBP 高于平均值、血清 25(OH)D 升高者前列腺癌发生的危险性增加。由此看来,关于血清 VD 浓度与前列腺癌间的关系的报道目前还不一致,有待进行更多的观察。

2.2 VD 与消化系统肿瘤的关系 结直肠癌是西方国家中发病率很高的恶性肿瘤,而我国的结直肠癌发病率也在逐年升高。在病因学方面,VD 不足是其中的一个发病原因。Hummel^[16]观察了通过提高饮食中的 VD 是否有防止或延迟小鼠化学致大肠癌发生的作用。结果发现,饮食中的 VD 浓度与大肠癌发生指数呈负相关关系。饮食中的高 VD 浓度诱导肾脏中的 CYP24A1 mRNA 表达,这是一种负反馈作用机制。提示增加饮食中的 VD 摄入可预防化学致大肠癌的发生。

2.3 VD 与泌尿系统肿瘤的关系 紫外线照射与膀胱癌的发生有负相关关系,因此被推测与其增强了 VD 的合成有关。Peiris 等^[17]对 1999~2008 年的膀胱癌老兵数据进行回顾性分析。结果发现,25(OH)D 水平与膀胱癌的生存率有明显相关性。25(OH)D 水平与寿命延长和生存率有关。基础血清 25(OH)D 高或经常补充 25(OH)D 的膀胱癌老兵预后更好。基础 25(OH)D 水平比补充的 25(OH)D 与预后的关系更密切。这些结果提示,基础 25(OH)D 水平的维持有利于改善膀胱癌患者的预后。移植后恶变是肾移植的一个限制因素。为了探讨 VD 在这种病理发生过程中是否起作用,Obi 等^[18]跟踪观察了 2007~2010 年肾移植后门诊患者 VD 复合物的使用情况并进行统计分析。218 例被观察对象平均年龄为 50 岁,63.3% 是男性病人。接受肾移植后的平均时间是 11.2 年。在跟踪观察过程中,92 例使用 VD 复合物的肾移植病人中有 5.4% 发生移植后恶变,而 126 例未用 VD 复合物的病人中有 8.7% 发生移植后恶变。低血清 VD 是这些移植后病人的常见现象。因此,VD 复合物是一种潜在的肾移植后病人化学预防药物。肾移植病人补充 VD 可能有助于预防移植后恶变的发生,从而延长移植患者的生存期。

2.4 VD 与其他肿瘤的关系 默克尔细胞瘤(MCC)的发生与多种因素有关。但 VD 缺乏是否与 MCC 肿瘤特性和预后有关仍未清楚。Samimi 等^[19]对 89 例默克尔细胞瘤患者血清 VD 水平进行了测定。结果发现,65.1% 的患者有 VD 缺乏,并与肿瘤大小和复发呈正相关,但与死亡无相关。此结果提示,VD

与 MCC 肿瘤的特征和预后有关,因此 VD 可能影响 MCC 发生过程的细胞生物学行为。其详细机制有待阐明。

3 血清 VD 及其代谢物检测的新进展

3.1 高效液相色谱法 高效液相色谱法(HPLC)测定血清 VD 含量是经典的方法。其原理:样品中的 VD(脂溶性维生素)在皂化过程中与脂肪分离。VD 以石油醚提取后,再用正相色谱柱提取富集,用反相色谱柱,紫外检测器定量测定。本法的灵敏度可达 0.1 国际单位。HPLC 法可分离 25(OH)D 及其代谢产物,经过与标准品进行对比,通过计算样品的峰面积而计算出样品含量。该法稳定性高,回收率和重复性较好。从样品分离到结果的获得需数小时。

3.2 液相色谱-串联质谱法 液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)具有特异性强、准确性高的特点,被认为是评价 VD 营养状况的“金标准”测定法。与高分离快速液相色谱(RRLC)/组合离子源的三重串联四极杆液质联用可使血清中 25(OH)D₂ 和 25(OH)D₃ 得到快速定量分析^[20]。在 5~100 ng/ml 的浓度范围内具有优异的定量线性度响应($R^2 > 0.99$),而且分析时间只需 5 min,日间精密度远远低于 10%。血清中的检测限(LOD)和定量限(LOQ)分别是 2 ng/ml 和 3 ng/ml^[21]。该法的样本前处理方法较复杂。

3.3 酶联免疫吸附法 酶联免疫吸附法可测定血清或血浆中的 25(OH)D 及其代谢产物,标准品、质控品和样品被标记有 25(OH)D 的生物素稀释,稀释后的样品在包被了高特异性的羊抗 25(OH)D 抗体的微孔中室温孵育 2 h 后冲洗。加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗生物素蛋白并有选择地与复合生物素结合,再冲洗,然后利用底物 TMB 显色。终止反应后用酶标仪读取吸光度,颜色强度与 25(OH)D 浓度成反比。酶联免疫吸附法的主要缺陷是抗体之间交叉反应导致其特异性不足。

3.4 化学发光免疫测定法(chemiluminescence immunoassay, CIA) 化学发光免疫分析包含两个部分,即免疫反应系统和化学发光分析系统。免疫反应系统是将发光物质(在反应剂激发下生成激发态中间体)直接标记在抗原(化学发光免疫分析)或抗体(免疫化学发光分析)上,或酶作用于发光底物。化学发光分析系统是利用化学发光物质经催化剂的催化和氧化剂的氧化,形成一个激发态的中间体,当这种激发态中间体回到稳定的基态时,同时发射出

光子,利用发光信号测量仪器测量光量子产额。化学发光免疫测定法操作简单、快速、结果重现性好,适于临床检测应用。

4 结语

综上所述,血清 VD 水平与肿瘤的关系,特别是在预防及治疗肿瘤疾病上,逐渐被重视。VD 的毒性作用主要是高钙血症的发生,因此限制了其应用剂量,也因此会影响其抗肿瘤作用的发挥。随着血清 VD 水平检测新方法的出现,在有效监测的情况下,VD 将成为预防和治疗肿瘤很有前景的药物。

参考文献

- Zerwekh JE. Blood biomarkers of vitamin D status [J]. Am J Clin Nutr, 2008, 87(4): 1087-1097.
- Anastasion CA, Yannakonlia M, Scarmeas N. Vitamin D and cognition: An update of the current evidence [J]. J Alzheimers Dis, 2014, 42: S71-S80.
- Micho ED, Melamed ML. Vitamin D and cardiovascular disease risk [J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2008, 11(1): 7-12.
- Carlberg C, Campbell MJ. Vitamin D Receptor signaling mechanisms: integrated actions of a well-defined transcription factor [J]. Steroids, 2013, 78(2): 127-136.
- Höbaus J, Thiem U, Hummel DM, et al. Role of calcium, vitamin d, and the extrarenal vitamin d hydroxylases in carcinogenesis [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2013, 13(1): 20-35.
- Schöttker B, Haug U, Schomburg L, et al. Strong associations of 25-hydroxyvitamin D concentrations with all-cause, cardiovascular, cancer, and respiratory disease mortality in a large cohort study [J]. Am J Clin Nutr, 2013, 97(4): 782-793.
- Rosen GP, Beebe KL, Shaibi GQ. Vitamin D levels differ by cancer diagnosis and decline over time in survivors of childhood cancer [J]. Pediatr Blood Cancer, 2013, 60(6): 949-952.
- Grant WB, Peiris AN. Differences in vitamin D status may account for unexplained disparities in cancer survival rates between African and white Americans [J]. Dermatoendocrinol, 2012, 4(2): 85-94.
- Giangreco AA, Nonn L. The sum of many small changes: microRNAs are specifically and potentially globally altered by vitamin D3 metabolites [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2013, 136: 86-93.
- Yao S, Ambrosone CB. Associations between vitamin D deficiency and risk of aggressive breast cancer in African-American women [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2012, 136: 337-341.
- Hatse S, Lambrechts D, Verstuyf A, et al. Vitamin D status at breast cancer diagnosis: correlation with tumor characteristics, disease outcome, and genetic determinants of vitamin D insufficiency [J]. Carcinogenesis, 2012, 33(7): 1319-1326.
- Peppone LJ, Rickles AS, Janelins MC, et al. The association between breast cancer prognostic indicators and serum 25-OH vitamin D levels [J]. Ann Surg Oncol, 2012, 19(8): 2590-2599.
- Villaseñor A, Ballard-Barbash R, Ambros A, et al. Associations of serum 25-hydroxyvitamin D with overall and breast cancer-specific mortality in a multiethnic cohort of breast cancer survivors [J]. Cancer Causes Control, 2013, 24(4): 759-767.
- Schwartz GG. Vitamin d, sunlight, and the epidemiology of prostate cancer [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2013, 13(1): 45-57.
- Weinstein SJ, Mondul AM, Kopp W, et al. Circulating 25-hydroxyvitamin D, vitamin D-binding protein and risk of prostate cancer [J]. Int J Cancer, 2012, 132(12): 2940-2947.
- Hummel DM, Thiem U, Höbaus J, et al. Prevention of preneoplastic lesions by dietary vitamin D in a mouse model of colorectal carcinogenesis [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2012, 136: 284-288.
- Peiris AN, Bailey BA, Manning T. Relationship of vitamin D monitoring and status to bladder cancer survival in veterans [J]. South Med J, 2013, 106(2): 126-130.
- Obi Y, Ichimaru N, Hamano T, et al. Orally active vitamin d for potential chemoprevention of posttransplant malignancy [J]. Cancer Prev Res (Phila), 2012, 5(10): 1229-1235.
- Samimi M, Touzé A, Laude H, et al. Vitamin D deficiency is associated with greater tumor size and poorer outcome in Merkel cell carcinoma patients [J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2014, 28(3): 298-308.
- Su Z, Slay BR, Carr R, et al. The recognition of 25-hydroxyvitamin D2 and D3 by a new binding protein based 25-hydroxyvitamin D assay [J]. Clin Chim Acta, 2013, 417(18): 62-66.
- Roth HJ, Schmidt-Gayk H, Weber H, et al. Accuracy and clinical implications of seven 25-hydroxyvitamin D methods compared with liquid chromatography-tandem mass spectrometry as a reference [J]. Ann Clin Biochem, 2008, 45(2): 153-159.

[收稿日期 2014-02-08][本文编辑 谭毅韦颖]

参考文献中英文作者姓名的著录方法

医学期刊的论文中,引用英文文献的比例很高,但有不少作者将英、美人的姓名搞错,以至用光盘核对时出现错姓、错名或姓名全错。英、美人姓名的习惯写法是:“名”可以有 1 个、2 个或 3 个,但“姓”只有一个。姓是不可以简写的;“名”可以缩写,第一个字母大写,不用缩写点。

例如:John Quincy Public 写为 Public JQ

· 本刊编辑部 ·