

肝细胞癌患者外周血25-羟基维生素D测定的临床意义

解宝江¹, 李振华², 袁海峰¹, 刘祝彤³, 张雪莲³ (1. 北京第二外国语学院校医院外科, 北京 100024; 2. 首都医科大学附属北京地坛医院 妇产科, 北京 100015; 3. 北京第二外国语学院校医院 内科, 北京 100024)

摘要: 目的 检测HCC患者外周血25-羟基维生素D[25(OH)D]的水平, 探讨测定HCC患者外周血25(OH)D水平的临床意义。方法 收集本院住院的HCC患者65例, 同时选取年龄、性别与之相匹配的78例健康志愿者作为对照组。采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定HCC患者及健康志愿者的外周血25(OH)D水平, 并对测定结果及HCC不同TNM分期患者之间的外周血25(OH)D水平分别进行统计学分析。结果 HCC患者的外周血25(OH)D水平[(28.132 ± 10.82) nmol/L]显著低于健康志愿者[(45.635 ± 9.23) nmol/L] ($P = 0.000$); 不同TNM分期的HCC患者之间的外周血25(OH)D水平无显著性差异 ($P = 0.122$)。结论 上述研究表明, HCC患者的外周血25-羟基维生素D水平较健康志愿者明显降低, 提示外周血25(OH)D水平降低与HCC的发生发展可能存在着密切的联系, 这对研究HCC的发病机理以及新的诊疗方法有一定指导意义。

关键词: 肝细胞癌; 25-羟基维生素D; 酶联免疫吸附法

Clinical significance of detecting 25-hydroxyvitamin D in peripheral blood in patients with hepatocellular carcinoma

XIE Bao-jiang¹, LI Zhen-hua², YUAN Hai-feng¹, LIU Zhu-tong³, ZHANG Xue-lian³ (1. Department of Surgery, Beijing International Studies University Hospital, Beijing 100024, China; 2. Department of Gynaecology and Obstetrics, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China; 3. Department of Medicine, Beijing International Studies University Hospital, Beijing 100024, China)

Abstract: Objective To investigate the level of 25-hydroxyvitamin D in the peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma and to evaluate its clinical significance. **Methods** The 65 patients with hepatocellular carcinoma admitted in our hospital and 80 healthy volunteers were recruited, and the levels of 25-hydroxyvitamin D in their peripheral blood samples were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method, and the results were statistically analyzed. Besides, the differences of the 25-hydroxyvitamin D levels of the hepatocellular carcinoma patients with different TNM stages were also analyzed simultaneously. **Results** The 25-hydroxyvitamin D level of the peripheral blood in patients with hepatocellular carcinoma was (28.132 ± 10.82) nmol/L, which was significantly lower than that of healthy volunteers [(45.635 ± 9.23) nmol/L, $P = 0.000$]; and there were no significant difference among the different TNM staging in patients with hepatocellular carcinoma in peripheral blood of the 25-hydroxyvitamin D, the P value was 0.122. **Conclusions** The present study showed that the 25-hydroxyvitamin D level of the peripheral blood in patients with hepatocellular carcinoma is significantly lower than that of healthy volunteers, which implies that the reduction of the 25-hydroxyvitamin D level in the peripheral blood may closely associated with the occurrence and the development of hepatocellular carcinoma, and this result may be helpful to understand the pathogenesis and find new therapy for hepatocellular carcinoma.

Key words: Hepatocellular carcinoma; 25-hydroxyvitamin D; ELISA

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是世界第五大常见肿瘤, 位列全球恶性肿瘤致死率第二位^[1]。目前HCC患者的5年生存率不足10%, 是恶性程度最高的肿瘤之一, 已成为威胁人类健康的重要杀手。近年来, 其发病率及病死率呈逐渐上升趋势, 随着HCC诊断技术不断提高, 常规的肿瘤标志物检测、腹部B超及其他影像学检查手段的应用大大提高了HCC的早期诊断; 同时手术、放疗、化疗、免疫治疗等的综合应用, 使HCC预后得到了一定的改善。近年研究发现, 维生素D具有广泛的生物学效应, 1, 25-二羟基维生素D₃[1, 25-dihydroxyvitamin D₃, 1, 25(OH)₂D₃]是体内生物活性最强的维生素D活性形式, 其生物学活性对体内的钙磷平衡、内环境稳态及细胞的增殖与分化等具有一定的调节作用。已有研究表明维生素D对HCC有抑制作用, 可通过其促进细胞分化、抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡^[2]等方式来调控肿瘤细胞周期的进程而起到保护作用。25-羟基维生素D[25(OH)D]是维生素D的中间代谢产物, 在循环系统中水平稳定, 是反映人体维生素D营养状况的最佳指标, 被认为是测定全面维生素D状态的最可靠指标。笔者在临床上通过测定HCC患者的外周血25-羟基维生素D的水平, 并分析与相关指标的关系, 以探讨HCC患者25(OH)D水平的相关性变化及其临床意义。

1 材料与方法

1.1 临床资料及标本来源 实验组: 选择首都医科大学附属北京地坛医院2013年1月至2014年6月住院的HCC患者65例, 男性38例, 女性27例, 年龄25~75岁, 中位年龄为56岁, 所有患者均经手术病理证实且术前未经过化疗、放疗及内分泌治疗。对照组: 随机选取北京第二外国语学院校医院健康志愿者78例, 男性43例, 女性35例, 年龄18~70岁, 中位年

龄54岁。所有研究对象近半年内未服用过钙剂及其调节剂等。

1.2 标本的制备 所有入选者于清晨空腹抽取静脉血3 ml, 抗凝、离心, 吸取血清按105 μl/管分装, 置于-20℃低温保存, 避免样品的反复冻融, 供检测用; 血样采集前, 所有受试者签订知情同意书, 本研究方案经医院伦理委员会批准。

1.3 检测方法 采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定外周血25-羟基维生素D水平, 仪器为THERMO Multiskan FC全自动酶标仪, 试剂盒为英国 Immunocliagnostic Systems试剂盒(ELISA)。

1.4 统计学处理 采用SPSS 18.0统计软件进行数据分析: 因两组数据均为计量资料, 且符合正态分布, 故两组均数间比较用*t*检验; 三者以上的计量资料, 组间比较用方差分析, 以*P* < 0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HCC患者与健康志愿者外周血25-羟基维生素D水平的统计学分析 由表1可知, HCC患者组的外周血25-羟基维生素D水平明显低于健康志愿者组, 且其差异具有统计学意义(*P* = 0.000)。

2.2 不同TNM分期HCC患者外周血25-羟基维生素D水平的测定 由表2可知, 对不同TNM分期的HCC患者外周血25-羟基维生素D水平进行比较分析发现, 以IV期HCC组的数值最低, 但统计学分析表明, 不同TNM分期的HCC患者间的差异无统计学意义(*P* = 0.122)。

3 讨论

3.1 目前对维生素D的总体研究现状 维生素D是一组具有生物活性的脂溶性固醇类衍生物, 其中最重要的为D₂和D₃。维生素D₂是经紫外线照射植物中的麦角固醇产生, 而维生素D₃可以从食物中摄取少量(< 10%), 但其主要(> 90%)由皮肤中表皮和

表1 HCC患者与健康志愿者外周血25-羟基维生素D水平的统计学分析结果

组别	例数	血25-羟基维生素D水平 ($\bar{x} \pm s$, nmol/L)	<i>t</i>	<i>P</i>
HCC患者	65	28.132 ± 2.455	8.652	0.000
健康志愿者	78	45.635 ± 9.241		

表2 不同TNM分期HCC患者外周血25-羟基维生素D水平的比较

TNM分期	例数	血25-羟基维生素D水平 ($\bar{x} \pm s$, nmol/L)	组间 <i>F</i>	<i>P</i>
I期	17	31.650 ± 2.543	1.833	0.122
II期	12	30.403 ± 3.417		
III A期	9	26.050 ± 1.769		
III B期	8	24.658 ± 3.035		
III C期	10	24.656 ± 2.142		
IV期	9	22.244 ± 2.126		

真皮内含有的7-脱氢胆固醇经紫外线(波长265~228 nm)照射转变而成。维生素D均为不同的维生素D原经紫外照射后的衍生物。维生素D无生物活性,必须首先通过肝脏经25-羟化酶作用转化成25-羟化酶D[25(OH)D],然后在近端肾小管1 α -羟化酶的催化下进一步转化为生物活性最强的1,25-二羟维生素D[1,25(OH)₂D₃],并由细胞内特异的维生素D受体(vitamin D receptor, VDR)介导,发挥激素样的生物效应,参与多种生物学进程。已有研究表明,血清钙与肝功能损害程度呈一定的相关性^[3],临床上肝功能严重损害时,维生素D在肝脏内羟化发生障碍及因肠道吸收差而致使肠钙吸收障碍等,易导致低血钙的发生。

研究发现,25(OH)D对原发性乳腺癌、肺癌、结肠癌、骨髓肿瘤细胞等均有抑制作用;维生素D及其活性代谢产物1,25(OH)₂D₃具有潜在的免疫调节作用。此外,1,25(OH)₂D₃还能促使活化的巨噬细胞释放肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α),而后者具有广泛杀伤或抑制肿瘤细胞的抗肿瘤效应^[4]。

3.2 维生素D的检测方法 维生素D的主要循环代谢产物是25-羟基维生素D,而活性代谢物是1,25(OH)₂D₃。血循环中25(OH)D的浓度是1,25(OH)₂D₃的1 000倍,但是25(OH)D与VDR亲和力仅为1,25(OH)₂D₃的1/100。25(OH)D的半衰期可达25 d,而1,25(OH)₂D₃仅为7 h,可见25(OH)D的浓度更稳定^[5],故临床上将定量测定25(OH)D用以表示体内维生素D的水平。目前常用的检测维生素D的方法主要有高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)和ELISA两种方法。其中,酶联免疫吸附法具有灵敏、特异、简单、快速、稳定及易于自动化操作等特点及不存在HPLC对待测物蒸气压、热稳定性、卤素、发色团等理化性质的限制,故是实验室较理想的分析方法。由于试剂不统一,导致其标准还不统一,故每个实验室应建立自己的参考范围。本实验采用了THERMO Multiskan FC全自动酶标仪及英国Immunodiagnostic Systems试剂盒来定量测定外周血25(OH)D水平。

3.3 维生素D与肝细胞癌的关联性 正常细胞有增殖和分裂的能力,从而促使机体生长发育。然而,细胞增殖若未加抑制就会过度增殖导致肿瘤的发生。正常细胞和癌细胞都有使维生素D进入细胞的受体,维生素D可抑制细胞的增殖,其对肿瘤细胞的抑制和促进肿瘤细胞凋亡的作用早已被证实。

目前研究证实,活性维生素D发挥生物学作用主要是通过VDR结合,25(OH)D与VDR结合后可抑制肿瘤细胞的生长和转移^[6]。研究表明,VDR及其配体活性维生素D抗肿瘤的作用机制主要有以下三个方面^[7]:①阻滞细胞周期,诱导细胞分化。25(OH)D通过诱导抑制细胞周期蛋白CDK复合物的激活,使细胞分化不能通过R点^[8],将肿瘤细胞阻滞于G₀/G₁期,S期细胞下降;其亦可通过调节DNA结合抑制剂的表达和依赖N-末端激酶来诱导肿瘤细胞分化^[9],从而导致肿瘤细胞增殖下降。②诱导促进肿瘤细胞凋亡。活性维生素D主要通过调节在细胞凋亡过程中某些起关键作用的介质来抑制肿瘤^[10]。已有研究显示活性维生素D能使Bcl-2表达下调,进而加促肿瘤细胞凋亡^[11]。③抑制肿瘤的侵袭和转移。活性维生素D通过降低肿瘤细胞胶原酶及黏连蛋白受体的表达,抑制肿瘤血管的生成,从而减弱肿瘤细胞增殖、浸润、转移^[12,13]。

有研究发现,VDR的基因多态性与多种恶性肿瘤的发生具有相关性^[14]。VDR基因位于染色体12q13.1段,其广泛的启动子区通过控制其转录决定了其在不同组织中的组织特异性,与疾病相关的VDR基因多态性位于多个酶切位点^[15]。25(OH)D的生物学活性主要由其细胞内受体VDR介导。VDR与配体活性维生素D结合后,激活靶基因转录,通过基因和非基因两种途径介导其生物学效应^[16]。基因途径即由核内VDR介导,通过核受体激活第二信使,而非基因途径与细胞膜的活性有关,通过膜受体激活第二信使,引起一系列生物学效应,作用迅速但不持久。以上两种途径作用的结果是促进细胞凋亡和分化、抑制肿瘤细胞增殖、侵袭及转移,从而达到抗肿瘤的作用。

有研究表明,在肿瘤细胞内,25(OH)D可与靶基因上游的维生素D反应元件(vitamin D response elements, VDRE)结合形成转录调控复合体,激活或抑制下游靶基因的转录、表达^[17],导致基因转录的活化或抑制,从而影响肿瘤的发生、发展而达到抑制肿瘤细胞的作用。目前研究证实,维生素D还具有免疫调节作用,特别是T细胞,可同时影响几种细胞因子的产生和活化^[18],是一种良好的选择性免疫调节剂。恶性肿瘤可通过直接侵犯免疫器官、瘤细胞释放免疫抑制因子及激活体内抑制性细胞等作用直接或间接抑制机体免疫功能。

本研究发现HCC患者组外周血25-羟基维生素D显著低于健康志愿者组25(OH)D水平($P = 0.000$),提示HCC患者外周血25-羟基维生素D水

平降低, 但外周血25-羟基维生素D水平与HCC的不同TNM期间的差异无明显统计学意义。究其原因, 可能有以下三个方面: 一是由于肿瘤患者体质虚弱, 户外活动少, 其接受日光照射的时间亦减少, 故易导致体内维生素D合成不足; 二是HCC患者的肝功能严重损害, 其分泌、代谢等功能均降低, 导致维生素D的代谢、吸收障碍; 三可能是由于HCC患者的肝脏中25-羟化酶的活力下降, 导致维生素D在血液中与 α 球蛋白(DBP)结合后转变为25(OH)D的转运能力发生障碍, 致使循环血液中的25(OH)D生成减少。基于以上原因, 提示在临床治疗中要及时恢复肝功能, 适当增加患者的日晒时间, 同时综合改善肿瘤患者的肝脏及消化道的分泌、消化及吸收功能等, 适当给予维生素D及其类似物以提高机体内的维生素D水平, 可提高并增强其抵抗肿瘤的能力^[19]。

3.4 维生素D及其类似物的应用 医学研究已证实, 维生素D具有组织或细胞特异性, 活性维生素D通过VDR介导发挥其调节钙磷代谢平衡及稳定内环境的作用^[20], 其对细胞的增殖与分化亦有一定的调节作用, 故活性维生素D及其衍生物在免疫调节、预防肿瘤等方面的作用日益备受关注。研究表明, 1, 25(OH)₂D₃可通过抑制细胞增殖、诱导细胞分化、活化凋亡途径、抑制血管形成等途径对肿瘤产生抗增值的作用, 控制HCC在内多种恶性肿瘤细胞的生长, 故具有激素样生物活性的1, 25(OH)₂D₃及其类似物在预防及治疗肿瘤疾病方面逐渐被重视, 具有潜在的抗肿瘤作用, 成为具有潜力的肿瘤治疗药物, 故临床上可用于某些恶性肿瘤的预防及治疗。随着研究的不断深入, 除了解维生素D在调节矿物质代谢和骨稳态方面的传统作用外, 我们对其非传统作用的机制会更加明确, 可进一步为研发维生素D及其类似物在临床防治HCC应用方面提供相关的理论和实验依据。

美国Roswell Park研究中心的科研人员发现, 维生素D信号通路是潜在的抗肿瘤治疗途径之一。研究表明, 维生素D及其类似物可以改变HCC的某些特征而达到抗肿瘤的作用, 故1, 25(OH)₂D₃的单独或与其他配体联合作用将成为肿瘤治疗与预防的潜在药物, 是一种较理想的抗肿瘤药物。由此, 对于临床上采取干扰维生素D的代谢某一通路来治疗肿瘤具有一定的指导意义。

1, 25(OH)₂D₃的主要不良反应是引起人体血钙浓度的上升, 导致高钙血症和尿酸钙的发生, 因此限制了其在临床上用于抗肿瘤的治疗。随着对维

生素D及其类似物进一步的研究^[21]表明, 维生素D类似物在促进肿瘤细胞生长、分化方面有着更好的效果, 而不会引起明显的血钙上升。由于本研究存在受试群体种族单一、性别差异大、地域局限、样本量有限等不足, 虽本文结果表明HCC患者外周血25-羟基维生素D的水平降低, 但究其谁为因, 谁为果, 临床上尚需大样本多中心研究进行进一步的验证阐明。

参考文献

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61: 69-90.
- [2] 庄志刚, 余剑敏, 蒋蓓琦, 等. 乳腺癌患者外周血25羟基维生素D测定及临床意义[J]. *实用医学杂志*, 2010, 26(9): 244-246.
- [3] 房淑华, 苏彤春. 肝硬化和肝癌患者80例血清钙测定及意义[J]. *中国实用内科学杂志*, 2003, 23: 694.
- [4] Adams JS, Hewison M. Update in vitamin D[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95: 471-478.
- [5] Lips P. Relative value of 25(OH)D and 1,25(OH)₂D measurements[J]. *J Bone Miner Res*, 2007, 22: 1668-1671.
- [6] Barbareschi M, Caffo O, Veronese S, et al. Bcl-2 and p53 expression in node-negative breast carcinoma: a study with long-term follow-up[J]. *Hum Pathol*, 1996, 27: 1149-1155.
- [7] 郑敏, 刘强. 维生素D及维生素D受体的研究进展[J]. *医学综述*, 2013, 19: 3965-3967.
- [8] 李晶. 维生素D与肿瘤相关疾病的研究进展[J]. *新疆医科大学学报*, 2009, 32: 222-224.
- [9] Long E, Ilie M, Hofman V, et al. LANA-1, Bcl-2, Mcl-1 and HIF-1 α protein expression in HIV-associated Kaposi sarcoma[J]. *Virchows Arch*, 2009, 455: 159-170.
- [10] Lu J, Yang JH, Bums AR, et al. Mediation of electronegative low density lipoprotein signaling by LOX-1: a possible mechanism of endothelial apoptosis[J]. *Circ Res*, 2009, 104: 619-627.
- [11] Sakurai R, Shi E, Fonseca S, et al. 1 α , 25(OH)₂D₃ and its 3-epimer promote rat lung alveolar epithelial-mesenchymal interactions and inhibit lipofibroblast apoptosis[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2009, 297: L496-L505.
- [12] Zhi HY, Hou SW, Li RS, et al. PTPH1 cooperates with vitamin D receptor to stimulate breast cancer growth through their mutual stabilization[J]. *Oncogene*, 2011, 30: 1706-1715.
- [13] So JY, Lee HJ, Smolarek AK, et al. A novel Gemini vitamin D analog repress the expression of a stem cell marker CD44 in breast cancer[J]. *Mol Pharmacol*, 2011, 79: 360-367.
- [14] Wonq HL, Seow A, Arakawa K, et al. Vitamin D receptor start codon polymorphism and colorectal cancer risk: effect modification by dietary calcium and fat in Singapore Chinese[J]. *Carcinogenesis*, 2003, 24: 1091-1095.
- [15] 李榕, 韩宝惠. 维生素D与肺癌[J]. *肿瘤杂志*, 2010, 5: 443-445.
- [16] Randerson-Moor JA, Taylor JC, Elliott F, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms, serum 25-hydroxyvitamin D levels, and melanoma: UK case-control comparisons and a meta-analysis of published VDR data[J]. *Eur J Cancer*, 2009, 45: 3271-3281.
- [17] Conde I, Paniagua R, Fraile B, et al. Expression of vitamin D3 receptor and retinoid receptor in human breast cancer: identification

- of potential heterodimeric receptors[J]. Int J Oncol,2004,25:1183-1191.
- [18] Marques CD, Dantas AT, Fragoso TS, et al. The importance of vitamin D levels in autoimmune diseases[J]. Rev Bras Reumatol,2010,5:67-80.
- [19] 解宝江, 郑晟旻, 彭吉润. 消化道恶性肿瘤患者外周血25-羟维生素D测定的临床意义[J]. 河北医药,2011,24:3711-3712.
- [20] Brandi ML. Indications on the use of vitamin D and vitamin D metabolites in clinical phenotypes[J]. Clin Cases Miner Bone Metab,2010,7:243-250.
- [21] Durazo-Arvizu RA, Dawson-Hughes B, Sempos CT, et al. Three-phase model harmonizes estimates of the maximal suppression of parathyroid hormone by 25-hydroxyvitamin D in persons 65 years of age and older[J]. J Nutr,2010,140:195-199.

收稿日期: 2014-11-21

· 读者 · 作者 · 编者 ·

关于医学论文中的作者署名和志谢

我国著作权法公布以来,已得到社会各界的广泛重视,作为医学科技期刊必须严格执行著作权法。为此将本刊对作者署名和志谢的有关要求重申如下。

一、作者署名的意义和应具备的条件

(一)署名的意义:(1)标明论文的责任人,文责自负;(2)医学论文是医学科技成果的总结和记录,是作者辛勤劳动的成果和创造智慧的结晶,也是作者对医学事业作出的贡献,并以此获得社会的尊重和承认的客观指标,是应得的荣誉,也是论文版权归作者的一个声明;(3)作者署名便于编辑、读者与作者联系,沟通信息,互相探讨,共同提高。作者姓名在文题下按序排列,排序应在投稿时确定,在编排过程中不应再作更改。作者单位名称及邮政编码脚注于同页左下方。(二)作者应具备下列条件:(1)参与选题和设计,或参与资料的分析和解释者;(2)起草或修改论文中关键性理论或其他主要内容者;(3)能对编辑部的修改意见进行核修,在学术界进行答辩,并最终同意该文发表者。以上3条均需具备。仅参与获得资金或收集资料者不能列为作者,仅对科研小组进行一般管理者也不宜列为作者。其他对该研究有贡献者应列入致谢部分。对文章中的各主要结论,均必须至少有1位作者负责。在每篇文章的作者中需要确定1位能对该论文全面负责的通讯作者。通讯作者应在投稿时确定,如在来稿中未特殊标明,则视第一作者为通讯作者。第一作者与通讯作者不是同一人时,在论文首页脚注通讯作者姓名、单位及邮政编码。作者中如有外籍作者,应附本人亲笔签名同意在本刊发表的函件。集体署名的论文于文题下列署名单位,于文末列整理者姓名,并于论文首页脚注通讯作者姓名、单位和邮政编码。集体署名的文章必须将对该文负责的关键人物列为通讯作者。通讯作者只列1位,由投稿者决定。

二、志谢

在文后志谢是表示感谢并记录在案的意思。对给予实质性帮助而又不能列为作者的单位或个人应在文后给予志谢。但必须征得被志谢人的书面同意。志谢应避免以下倾向:(1)确实得到某些单位或个人的帮助,甚至用了他人的方法、思路、资料,但为了抢先发表,而不公开志谢和说明;(2)出于某种考虑,将应被志谢人放在作者的位置上,混淆了作者和被志谢者的权利和义务;(3)以名人、知名专家包装自己的论文,抬高论文的身份,将未曾参与工作的,也未阅读过该论文的知名专家写在志谢中。

被志谢者包括:(1)对研究提供资助的单位和个人、合作单位;(2)协助完成研究工作和提供便利条件的组织和个人;(3)协助诊断和提出重要建议的人;(4)给予转载和引用权的资料、图片、文献、研究思想和设想的所有者;(5)作出贡献又不能成为作者的人,如提供技术帮助和给予财力、物力支持的人,此时应阐明其支援的性质;(6)其他需志谢者。