

- 的影响[J]. 西藏医药杂志, 1999, 20(3): 11-12.
- [4] 石泉贵, 邓志武, 陈洪章, 等. 高原健康老人红细胞免疫功能及其调节因子的变化研究[J]. 西藏科技, 2000, 37(6): 4-5.
- [5] 石泉贵, 满玉生, 许清安, 等. 急速进入高原人员红细胞免疫粘附功能的动态变化观察[J]. 中国免疫学杂志, 1995, 11(1): 178-180.
- [6] 石泉贵, 邓志武, 江成剑, 等. 快速进入高原对世居高原藏族红细胞免疫粘附功能的影响[J]. 西南国防医药杂志, 2000, 10(5): 303-304.
- [7] 石泉贵, 邓志武, 江成剑, 等. 快速低氧致世居藏族红细胞促粒细胞吞噬作用改变[J]. 高原医学杂志, 2000, 10(4): 11-13.
- [8] 石泉贵, 覃乐, 刘新明, 等. 高原红细胞增多症患者红细胞免疫功能状况及动态观察[J]. 中华血液学杂志, 1993, 14(5): 260-262.
- [9] 石泉贵, 马召平, 王雄伟, 等. 高原肺水肿患者红细胞免疫功能的变化及意义[J]. 中国免疫学杂志, 1997, 13(6): 104-107.
- [10] 石泉贵, 邓志武, 曾桂茹, 等. 高原肺水肿患者红细胞促中心粒细胞吞噬功能改变[J]. 高原医学杂志, 1999, 9(3): 46-48.
- [11] 石泉贵, 邓志武, 刘叶香, 等. 紫外血疗法对高原健康青年红细胞免疫功能的影响[J]. 高原医学杂志, 2000, 10(2): 11-12.

(收稿日期: 2012-01-09)

• 综 述 •

维生素 D 代谢及 25-羟基维生素 D 测定方法研究进展

李水军¹综述, 王思合², 周建烈¹, 余 琛^{1△} 审校

(1. 上海市徐汇区中心医院中心实验室, 上海 200031; 2. 美国克利夫兰医学中心病理学与检验医学研究所, 美国克利夫兰 44195)

关键词: 25-羟基维生素 D; 免疫酶技术; 液相色谱技术; 质谱技术**DOI:** 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 24. 040**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2012)24-3028-03

功能性的维生素 D 主要包括维生素 D₃ 和维生素 D₂。维生素 D 除了具有传统意义上的骨骼效应, 它还有着广泛的非骨骼效应, 与心血管疾病、免疫疾病、糖尿病、肿瘤等疾病密切相关。25-羟基维生素 D (25OHD) 测定是衡量维生素 D 营养状态的最佳指标。根据测定原理不同, 目前 25OHD 的测定方法可分为多种, 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, 被认为是评价维生素 D 营养状况的“金标准”测定法。

1 维生素 D 的来源、代谢途径、生理意义及参考水平

维生素 D 是一种必需的脂溶性维生素, 在自然状态下, 紫外线照射和食物源的补充是人体维生素 D 的主要来源。2010 年美国医学科学院推荐不同年龄段人群维持骨骼健康所需维生素 D 的膳食参考摄入量 (DRIs) 为 400~800 IU/d, 成年人最高可耐受摄入量为 4000 IU/d。而实际上维生素 D 具有更加广泛的非骨骼效应, 维持正常维生素 D 水平需要摄入 1 000~2 000 IU/d^[1]。

自身合成和食物源的维生素 D₂ 和维生素 D₃ 经血液循环进入肝脏, 在维生素 D-25-羟化酶作用下转化为 25OHD₂ 和 25OHD₃, 总称为 25OHD。25OHD 主要在肾脏经 25OHD-1 α 羟化酶的催化下转化成有生理活性的 1, 25-二羟基维生素 D [1, 25(OH)₂D]^[2]。维生素 D、25OHD 和 1, 25(OH)₂D 在人体内的半衰期分别为 24 h、3 周和 4 h^[3]。其中 25OHD 在人体比较稳定且浓度较高, 能反映食物摄入和自身合成的维生素 D 总量, 以及维生素 D 的转化能力, 因此 25OHD 被认为是衡量维生素 D 营养状态的最佳指标^[3-5]。

维持正常的维生素 D 水平对调节钙磷代谢至关重要。在维生素 D 缺乏的情况下, 人体仅能吸收大约 10%~15% 钙和 60% 的磷, 1, 25(OH)₂D 通过与维生素受体结合, 可提高肠道对钙磷的吸收效率, 使钙吸收增加至 30%~40%, 磷增加至 80% 左右^[5]。众所周知, 维生素 D 具有传统意义上的骨骼效应, 缺乏可能会导致儿童佝偻病、成人骨质疏松症、软骨症、肌

无力, 增加老人跌倒和骨折的风险。近年来研究表明, 维生素 D 还具有很多与自身免疫疾病、糖尿病、心血管病、肿瘤等有关非骨骼效应^[3-5]。分子机理研究发现, 维生素 D 缺乏会直接影响人类基因的表达, 这些基因与风湿性关节炎和糖尿病等许多疾病有关^[6]。

25OHD 是维生素 D 营养状态的评价指标, 最近美国医学科学院推荐 25OHD 血浓度大于 20 ng/mL 有利骨骼健康^[1], 而许多文献将维生素 D 缺乏定义为血清 25OHD 水平低于 20 ng/mL, 不足为 21~29 ng/mL, 充足为 30 ng/mL 以上, 而大于 150 ng/mL 可能会导致中毒。但是维生素 D 中毒极为罕见^[1, 5], 而维生素 D 缺乏却十分常见, 这与年龄、人种、肤色、生活习惯等等有关。据估计, 全球有超过 10 亿人缺乏维生素 D^[5]。

2 维生素 D 的测定方法和原理

通过测定 25OHD 浓度来评价维生素 D 水平, 现有多种方法用于临床 25OHD 的测定, 根据方法原理, 可分为酶免疫分析法和色谱法。由于所有的维生素 D 羟化物都可能发生抗体抗原结合反应, 因此酶免疫分析法只能测定 25OHD 总量, 无法同时测定 25OHD₂ 和 25OHD₃ 的浓度。现有 25OHD 的色谱分析方法包括高效液相色谱法 (HPLC) 和液相色谱-串联质谱法 (LC-MS/MS)^[7]。由于可分离并检测不同的分析物, 色谱法可区分并能分别定量 25OHD₂ 和 25OHD₃。

3 维生素 D 测定方法的评价

由于 25OHD 的测定结果影响维生素 D 的营养状况的判断, 测定结果准确与否、不同的测定方法之间是否一致, 至关重要。经过比较发现, 由于基于不同的测定原理和操作程序, 不同的 25OHD 测定方法之间可能存在一定的差异^[7-13]。

酶免疫分析法是早期维生素 D 测定的主流方法。2003 年国际维生素 D 代谢物室间质评计划 (DEQAS) 的 18 个国家 95 家实验室中 90% 的 25OHD 测定方法为酶免法, 其中 DiaSorin 放免法和 IDS 放免法分别占 38% 和 27%^[9]。酶免法在自动化

[△] 通讯作者, E-mail: clab001@126.com。

操作、节省人力方面具有一定的优势,适合于常规临床实验室开展,不足之处在于特异性低。酶免法对基质效应敏感,容易与其他非目标化合物产生交叉反应^[14]。部分酶免法对于 25OHD₂ 的测定存在问题,有报道 IDS 放免法对 25OHD₂ 的回收率低,当血样中 25OHD₂ 浓度较高,25OHD 测定结果可能偏低^[15]。当患者服用维生素 D₂ 补充剂治疗维生素 D 缺乏时,酶免法测定结果偏低,可能误导临床决策,带来维生素 D 中毒风险^[16]。尽管如此,比较 25OHD₃ 的测定结果时,也可见免疫法与 LC-MS/MS 法的明显差异^[13]。由于市场上供应的维生素 D 补充剂包括维生素 D₃ 和维生素 D₂,因此推荐测定方法应该同时测定 25OHD₂ 和 25OHD₃。

色谱法可将 25OHD₂、25OHD₃ 与维生素 D 其他代谢物实现有效分离,提高检测特异性。HPLC 是早期应用较多的色谱法之一,可同时检测 25OHD₂ 和 25OHD₃,具有良好的精密度,与 LC-MS/MS 法结果一致性较好^[11,13]。与免疫法相比,HPLC 的相对不确定度小,分析成本更低^[12,17],甚至还有 HPLC 商业试剂盒用于 25OHD 的测定^[18]。但是 HPLC 的不足之处是分析时间长、检测通量小、灵敏度低、所需样品量大^[11],不适合临床应用,已经完全被 LC-MS/MS 所替代。

LC-MS/MS 是色谱法中最为常用的 25OHD 检测方法,样品经处理后采用液相色谱分离,检测器为串联质谱仪,在多反应监测扫描模式下,实现分子离子和碎片离子两次质量选择,可同时检测 25OHD₂ 和 25OHD₃,具有非常高的检测特异性^[14],被认为是“金标准”的检测技术^[2,4,7]。LC-MS/MS 更加契合现代临床实验室的工作流程,可完全满足临床检测方法准确性、特异性、检测通量的要求。从 2004 年开始,LC-MS/MS 法检测 25OHD 陆续报道^[19-24]。25OHD 的 LC-MS/MS 检测方法都是实验室内部开发的,不同的实验室采用不同的标准品来源、贮备液配制、样品处理方法等,影响了室间可比性。而采用共同的校准品、参加英国维生素 D 代谢物室间质评计划(DEQAS)、美国病理学家协会(CAP)的能力测试等措施有助于改进方法间、实验室间测定结果的可比性^[8,10,13,25]。美国标准技术研究所提供血清 25OHD₂ 和 25OHD₃ 的标准参考物质(SRM972),采用 LC-MS/MS 测定靶值。2009 年 DEQAS 有 35 国家、670 家实验室参加,目前国内尚无相应的 25OHD 的室间质评计划。

虽然 LC-MS/MS 在 25OHD 检测特异性具有明显的优势,但是同时也需要注意内源性干扰物 C₃-epi-25OHD 对测定结果的影响^[4],另外 LC-MS/MS 技术复杂,需要专业操作人员,仪器昂贵,自动化不高,需要自己开发方法,在一定程度上限制了 LC-MS/MS 在临床常规 25OHD 检测应用。相对而言,LC-MS/MS 的试剂用量少,可开展多个项目,实现多成分同时检测,与其他检测技术相比,LC-MS/MS 长期运行成本较低。因此建立标准测试程序,参加室间质量评价计划,开发 LC-MS/MS 试剂盒,将有助于简化 25OHD 检测流程,改进 25OHD 测定结果的室间可比性。

4 小 结

维生素 D 有众多的骨骼效应和非骨骼效应,维生素 D 缺乏广泛存在。25OHD 是衡量维生素 D 营养状态的最佳指标,临床上对 25OHD 的测试需求越来越大。目前临床常用的方法有免疫分析法和色谱法,由于基于不同的测试原理,不同方法之间的 25OHD 测定结果常出现不同程度的差异。LC-MS/MS 法被认为是评价维生素 D 营养状况的“金标准”测定法。

而建立标准测试程序,参加室间质量评价计划,开发检测试剂盒,将有助于进一步改进 25OHD 测定结果的室间可比性。

参考文献

- [1] Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin d deficiency: an endocrine society clinical practice guideline[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2011, 96(7):1911-1930.
- [2] El-Khoury JM, Reineks EZ, Wang S. Progress of liquid chromatography-mass spectrometry in measurement of vitamin D metabolites and analogues[J]. Clin Biochem, 2011, 44(1):66-76.
- [3] Zerwekh JE. Blood biomarkers of vitamin D status[J]. Am J Clin Nutr, 2008, 87(4):S1087-S1091.
- [4] Wang S. Epidemiology of vitamin D in health and disease[J]. Nutr Res Rev, 2009, 22(2):188-203.
- [5] Holick MF. Vitamin D deficiency[J]. N Engl J Med, 2007, 357(3):266-281.
- [6] Ramagopalan SV, Heger A, Berlanga AJ, et al. A ChIP-seq defined genome-wide map of vitamin D receptor binding: associations with disease and evolution[J]. Genome Res, 2010, 20(10):1352-1360.
- [7] Wallace AM, Gibson S, de la Hunty A, et al. Measurement of 25-hydroxyvitamin D in the clinical laboratory: current procedures, performance characteristics and limitations [J]. Steroids, 2010, 75(4):477-488.
- [8] Singh RJ. Are clinical laboratories prepared for accurate testing of 25-hydroxy vitamin D? [J]. Clin Chem, 2008, 54(1):221-223.
- [9] Carter GD, Carter CR, Gunter E, et al. Measurement of Vitamin D metabolites: an international perspective on methodology and clinical interpretation [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2004, 89-90(1/5):467-471.
- [10] Carter GD, Carter R, Jones J, et al. How accurate are assays for 25-hydroxyvitamin D? Data from the international vitamin D external quality assessment scheme[J]. Clin Chem, 2004, 50(11):2195-2197.
- [11] Lensmeyer GL, Wiebe DA, Binkley N, et al. HPLC method for 25-hydroxyvitamin D measurement: comparison with contemporary assays [J]. Clin Chem, 2006, 52(6):1120-1126.
- [12] Cavalier E, Rozet E, Gadisseur R, et al. Measurement uncertainty of 25-OH vitamin D determination with different commercially available kits: impact on the clinical cut offs[J]. Osteoporos Int, 2010, 21(6):1047-1051.
- [13] 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(1):153-159.
- [14] Vogeser M. Quantification of circulating 25-hydroxyvitamin D by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2010, 121(2):565-573.
- [15] Hollis BW. Comparison of commercially available (125) I-based RIA methods for the determination of circulating 25-hydroxyvitamin D[J]. Clin Chem, 2000, 46(10):1657-1661.
- [16] Leventis P, Garrison L, Sibley M, et al. Underestimation of serum 25-hydroxyvitamin D by the Nichols Advantage Assay in patients receiving vitamin D replacement therapy[J]. Clin Chem, 2005, 51(6):1072-1074.
- [17] Turpeinen U, Hohenthal U, Stenman UH. Determination of 25-hydroxyvitamin D in serum by HPLC and immunoassay[J]. Clin

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 Uytanghe 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 还参与了炎性反应,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)。