

Research Progress on the Relationship between Vitamin D Metabolism and Tumor

Wei Gao^{1,2} Rong Liu¹

1. Second Department of Hepatobiliary Surgery, The General Hospital of the People's Liberation Army, Beijing, 100853, China

2. Hepatological Surgery Department, Aerospace Center Hospital, Beijing, 100049, China

Abstract

Malignant tumor is a serious threat to human life at present, and people still do not know the "true face" of the vast majority of malignant tumors, there is no definite understanding of the occurrence and development mechanism of malignant tumors, then there is a lack of effective means for its diagnosis and treatment. Vitamins, as an exogenous substance, need to be ingested by the human body through food to meet the normal function of cells, and play an irreplaceable role in maintaining the normal operation of the body. In recent years, the role of vitamins in malignant tumor diseases has attracted people's attention^[1,2]. Vitamin D (VD), as the only vitamin that can be synthesized in a small amount, is considered to be a steroid, and its effect is more concerned than other vitamins. It is generally accepted that it plays a role in maintaining bone stability and regulating calcium absorption and metabolism. At present, it is considered that 1, 25 (OH) 2D3 has anti-tumor effect. The activation and inactivation of VD in vivo is catalyzed by a series of cytochrome enzymes, and CYP24A1 is the key gene for the degradation and inactivation of active VD. In the following, the author will review the research progress of VD metabolic system, especially CYP24A1 gene, related to tumor, as well as the regulation of CYP24A1 expression.

Keywords

vitamin D; cancer; CYP24A1

维生素 D 代谢与肿瘤关系的研究进展

高蔚^{1,2} 刘荣¹

1. 解放军总医院肝胆外科, 中国·北京 100853

2. 航天中心医院肝胆外科, 中国·北京 100049

摘要

恶性肿瘤是当前严重威胁人类生命的疾病, 并且人们对于绝大多数恶性肿瘤的认识仍然不识其“庐山真面目”, 对于恶性肿瘤的发生、发展机制没有确切的认识, 那么对于其诊断、治疗就更加缺乏行之有效的手段。维生素作为一种外源性物质, 需要人体通过食物中摄取, 来满足细胞功能的正常进行, 在维持机体正常运转过程中的作用不可替代。近年来, 维生素在恶性肿瘤性疾病中的作用, 引起人们重视[1,2]。维生素 D (VD) 作为唯一一种人体可少量自身合成的维生素, 被认为是一种类固醇, 其作用较其他维生素更加受到关注, 普遍认同的是其在维持骨质稳定, 调节钙质吸收代谢方面的作用。活化的 VD-1, 25(OH) 2D3 可调节体内钙磷水平, 维持骨质正常功能, 其在肿瘤中的作用, 近年来愈发受到关注。目前, 认为 1, 25(OH) 2D3 具有抗肿瘤作用。VD 在体内的活化及失活是经过一系列细胞色素酶催化进行, 而 CYP24A1 是活性 VD 降解失活的关键基因。下面笔者将对 VD 代谢系统、尤其 CYP24A1 基因, 与肿瘤相关研究, 以及对于 CYP24A1 表达调控的相关研究进展进行综述。

关键词

维生素 D; 癌症; CYP24A1

1 VD 代谢途径

VD 的合成原料人体需要从食物中摄取, 在体内发挥生物学作用则需要一系列异构过程进行活化。VD 有两种主要形态, VD₂-麦角钙化醇 (ergocalciferol) 和 VD₃-胆钙化醇 (cholecalciferol)。VD 在人体内发挥活性需要一系列异构化过程, 体内 7-脱氢胆固醇 (7-dehydrocholesterol) 在表皮通

过紫外线作用下完成异构化而形成 VD₃。异构化 VD₃ 可与血液中 VD 结合蛋白 (vitamin D binding protein, DBP) 结合, 被转运至肝脏, 进一步修饰。在肝脏内, VD₃ 通过 25-羟化酶 (25-hydroxylase, CYP27A1) 作用, 转化成骨化二醇 (25-hydroxyvitamin D₃), 25(OH) D₃ 是全身循环系统中 VD 的主要存在形式。25(OH) D₃ 主要在肾脏近曲小管, 通过 1- α -羟化酶 (1- α -hydroxylase CYP27B1) 作用, 形成骨

化三醇(1, 25(OH)2D3), 即为活化的VD, 可通过一系列生化反应发挥其生物学作用。1, 25(OH)2D3的失活则是通过24-羟化酶(CYP24A1)作用, 羟基化为1, 24, 25(OH)3D3。人体内VD的充足与缺乏与否, 是通过测量25(OH)D3水平进行评估^[9]。

很长时间以来, 人们认为VD代谢过程中的1 α 羟基化和24-羟化只是在肾脏中进行。直到Bikle等报道, 在培养角质细胞中表现出活性VD合成^[4]。后来证实, 在人结肠、前列腺、乳腺癌细胞系或组织中, 都存在对VD的1 α 羟基化异构及活化过程^[5-7]。更有进一步的免疫组化分析显示, 1 α 羟基化作用在肾脏以外的组织中广泛存在, 并且都是由同一基因产物催化^[8]。这些发现对于人们确切了解VD在局部组织代谢情况有重大作用。有学者进行研究, 分别加入10nM和100nM甲状旁腺激素PTH, 在前列腺细胞中, CYP27B1的活性没有显著变化, 但在肾脏细胞中, 其活性有明显下降; 加入同等剂量的钙剂, 也出现相同的结果。这说明, 对于肾脏及肾外组织中CYP27B1表达调整有着不同机制, 对于理解VD功能的组织特异性有关键性作用^[9]。与此相同, CYP24A1在体内也是普遍存在的, 其在肾小管内基础表达水平很高。在肾外组织中, 其基础表达水平区别很大^[10], 但是其表达可被1, 25(OH)2D3快速诱导产生, 并且在正常或病理细胞中达到很高的表达水平^[11]。

2 VD 发挥其生物学作用过程

1, 25(OH)2D3需通过同维生素D受体(VDR)结合, 进而影响相关基因活性。VDR目前认为是一种配体依赖的转录因子, 同1, 25(OH)2D3结合, 从而被激活, 同维甲酸X受体(RXR)结合, 形成VDR-RXR异二聚体, 进入细胞核, 同VDRE(维生素D反应元件)结合。VDRE是指在靶基因启动子一千个碱基内的重复序列。从而形成VDR-RXR-VDRE转录调控复合物。于是, 同VDRE结合后, VD可表现出其在基因表达中的调节作用, 可以引发一些协同抑制因子的释放, 进而招募刺激因子到转录装置处; VDR-RXR复合物也可以与反式作用VDRE结合, 抑制靶基因的转录, 比如抑制甲状旁腺激素^[12]。

3 VD 在肿瘤中的作用

活性VD在细胞分化方面也具有明显的诱导作用。Abe

等向鼠骨髓白血病细胞中加入活性VD及不同的VD代谢物, 可诱导其表现出巨噬细胞分化, 并且活性VD的诱导作用最为明显^[13]。

DNA微阵列芯片研究分析, 认为有百余个基因的作用受到VD或其类似物调节, 这些基因的作用包括细胞周期、细胞间信号、细胞粘附、类固醇代谢、免疫应答等。1, 25(OH)2D3抗恶性增殖的作用, 主要由于其可以对数个细胞周期关键调节因子的作用产生影响, 最终导致RB蛋白脱磷酸化, 使细胞停滞于G0/G1期^[14]。细胞周期的进程受到细胞周期蛋白(cyclins)、相关的细胞周期素依赖激酶、细胞周期素激酶抑制因子cyclin kinase inhibitors, CKIs等调控。一些CKI基因, 如p21基因, 在其启动子区域存在VDRE(维生素D反应元件), 这些基因在不同类型细胞中, 成为1, 25(OH)2D3/VDR复合体的靶基因, 从而使得细胞于G1期停滞并且从细胞周期中退出^[15, 16]。

1, 25(OH)2D3的另一重要作用是诱导凋亡, 可抑制抗凋亡蛋白B细胞淋巴瘤-2基因Bcl-2(B-cell lymphoma-2)以及促存活蛋白Bcl-x1的表达, 并可加强促凋亡蛋白表达, 如BAX、BAD。1, 25(OH)2D3能够激活半胱氨酸蛋白酶效应分子, 从而直接诱导凋亡^[17]。

1, 25(OH)2D3能够抑制血管生成, 也是其抗肿瘤的重要机制, 能够抑制内皮生长, 减少血管生成^[18]。

4 肿瘤中 CYP24A1 研究状况

CYP24A1作为可能的促癌基因, 其在不同的肿瘤中表达也各不相同。高表达一般见于实体肿瘤中, 肿瘤中CYP24A1表达的升高与预后不良有关^[19-20]。肿瘤中升高的CYP24A1可导致VD的快速降解, 使其抗肿瘤作用大打折扣。

CYP24A1基因启动子区域包含两个VDRE。和许多其他的VD靶基因相似, VDR-RXR复合物可启动其表达^[21]。在正常组织中, 1, 25(OH)2D3可明显地诱导CYP24A1表达, 诱导产生的CYP24A1可快速代谢1, 25(OH)2D3, 然后CYP24A1表达水平迅速降低并恢复至基础水平。

CYP24A1在肿瘤组织中各不相同的原因尚不清楚。在多种肿瘤中, CYP24A1的过度表达同VDR的表达无关, 后者的表达情况为减少或者没有变化。这说明, CYP24A1在肿瘤中的表达变化, 与其在正常组织中的生理性转录调节过程存

在很大不同,并不是通过VD-VDR并进一步激活CYP24A1基因。也表明在肿瘤中,可能有多种因素同CYP24A1表达调节失常有关^[22-23]。

5 CYP24A1可能的调控机制

CYP24A1表达的相关调控机制,也是受到了学者的重视,相关的报道也很多。在正常组织中(肾脏和小肠外),CYP24A1的表达很低^[24],但是当VDR-RXR同位于其基因启动子区域的VDRE结合后,可诱导其10倍乃至百倍表达增强。CYP24A1基因启动子区域包含两个VDRE。和许多其他的VD靶基因相似,VDR-RXR复合体可启动其表达^[25]。在正常组织中,1,25(OH)2D₃可明显地诱导CYP24A1表达,诱导产生的VDRE可快速代谢1,25(OH)2D₃,然后CYP24A1表达水平迅速降低并恢复至基础水平。VDRE的核苷酸多态性可导致其同VDR-RXR的结合能力下降,降低CYP24A1的表达^[24]。

越来越多的证据表明,许多结构与VD明显不同的内源性物质都可诱导CYP24A1的高表达,比如石胆酸^[26]、RXR或者RAR维甲类X受体的配体^[27],甚至可以被不同种类的外源性PX—孕烷受体(Pregnane X Receptor)配体诱导出现高表达^[28]。Shankar等报道,长期饮酒能诱导CYP24A1表达并阻碍VD合成,而长期饮酒导致的骨量流失也许正是由于VD合成改变所引发;研究指出,CYP24A1的诱导通过MAPK(丝裂原活化蛋白激酶,mitogen-activated protein kinase)通路,而乙醇通过CYP2E1和乙醇脱氢酶的作用,在肾脏的代谢产物可以产生肾脏氧化应激反应,从而激活MAPK^[29]。并有报道指出,AhR芳香烃受体的配体—苯并芘可诱导CYP24A1表达来影响VD的分解代谢^[30]。吸烟过程中可产生苯并芘,因此AhR介导的VD代谢的调整可能同吸烟导致的相关疾病有关,如肿瘤、动脉粥样硬化。这些情况说明,慢性饮酒及吸烟都可以通过诱导CYP24A1,破坏体内VD稳态,导致相关疾病。

Ohyama^[31]等发现,在成骨细胞系中,虽然有大量的VDR表达,但并没有发现对CYP24A1的诱导效果。后有研究认为,这种1,25(OH)2D₃对于CYP24A1的诱导缺乏,与CYP24A1甲基化有关^[31,32]。CYP24A1启动子区域甲基化状态可限制VDR同必要的VDRE结合,从而干扰CYP24A1

转录过程。Chung进行了相关研究,在CYP24A1诱导下的肿瘤来源上皮细胞(tumor-derived endothelial cells, TDEC)中,以及有CYP24A1表达的基质来源的上皮细胞(Matrigel-derived endothelial cells MDEC)中进行^[32],甲基化特异性PCR及重亚硫酸盐测序,在CYP24A1基因中两个推定的CpG岛存在,CpG岛的高甲基化阻碍VDR对CYP24A1的诱导作用。Nova等报道了胎盘组织中CYP启动子区域的复杂的甲基化情况,这一情况影响了VDR介导的CYP24A1启动活性^[33]。有学者通过免疫共沉淀阵列(Immunoprecipitation assays)识别了三个位于CYP24A1启动子上游可能同VDR功能有关的区域^[34]。

一些转录元件也有证实可同VDR相互作用,影响VD对于CYP24A1启动子的诱导作用。转录因子EST-1(E-twenty six-1)可诱导CYP24A1启动子活性^[35]。在COS-1猴子肾脏成纤维细胞中进行研究发现,VD刺激MAPK和ERK(extracellular regulated protein kinases,细胞外调节蛋白激酶)5导致EST-1磷酸化激活^[36]。Cui等指出,在分化良好的细胞中,EST-1的总量和磷酸化EST-1含量都较低。这说明MAPK信号通路受到抑制,并阻碍VD对CYP24A1的诱导作用^[37]。Dwivedi研究鼠COS-1细胞中CYP24A1启动子,指出其包含两个VDRE和一个EST-1结合位点。单独加入VD,可诱导CYP24A1有4倍表达;加入EST-1,可出现11倍的诱导作用;联合加入VD和EST-1,可出现对CYP24A1启动子56倍的诱导作用^[38]。

RAS-MAPK通路上的一些酶类已经被考虑同CYP24A1基因表达有关,如ERK1/2和ERK5。激酶和免疫沉淀阵列分析认为,在COS-1细胞中ERK2对于RXR的磷酸化作用,在VD对CYP24A1启动子激活过程中起到关键作用^[38]。但是,在人类胚胎肾脏细胞HEK-293T中这一作用并未出现,在HEK-293T中VD诱导CYP24A1并不需要ERK1/2,但需要JNK(c-Jun氨基末端激酶cJun-N-terminal kinase)^[37]。并且CYP24A1启动子激活方式可能存在细胞类型特异性,在构建的荧光素启动子模型中,在鼠肾脏成纤维细胞COS-1中,ERK1/2在VD对CYP24A1诱导中发挥作用,ERK1/2、ERK5抑制剂能够阻断VD对于CYP24A1启动子的激活^[38]。在分化型人结肠腺癌细胞中Caco-2 cells,ERK1和ERK2能够加强VD作用下CYP24A1基因mRNA表达,但ERK5的

促表达作用没有发现^[37],这种ERK5不同的作用效应提示我们,VD作用的信号转导通路和/或CYP24A1启动子激活过程存在细胞类型特异性。

VD作为相对特殊的维生素,其对人体的作用并不是简单的调节钙磷平衡及维持骨质稳态。VD在诸多方面的作用都没有确切证明,即便是在调控钙磷平衡方面的机制,也没有完全清晰。许多证据表明,VD在肿瘤性疾病中具有作用,其活性调节酶—CYP24A1在肿瘤中也有着相当程度的作用。对于VD、CYP24A1对肿瘤的形成、进展等情况进行更深入研究,可能是了解肿瘤的新的途径。

参考文献

- [1] Mata AM,Carvalho RM,Alencar MV,et al.Ascorbic acid in the prevention and treatment of cancer.Rev Assoc Med Bras (1992).2016,Oct;62(7):680–686.
- [2] Jiang Q.Natural Forms of Vitamin E as Effective Agents for Cancer Prevention and Therapy.Adv Nutr.2017,Nov,15;8(6):850–867.
- [3] Zerwekh JE.Blood biomarkers of vitamin D status.Am J Clin Nutr.2008,Apr;87(4):1087S–91S.
- [4] Bikle DD,Nemanic MK,Gee E,et al.1,25-Dihydroxyvitamin D3 production by human keratinocytes.Kinetics and regulation.J Clin Invest.1986,Aug;78(2):557–66.
- [5] Cross HS,Peterlik M,Reddy GS,et al.Vitamin D metabolism in human colon adenocarcinoma-derived Caco-2 cells:expression of 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase activity and regulation of side-chain metabolism. J.Steroid Biochem Mol Biol.1997,May;62(1):21–8.
- [6] Friedrich M,Diesing D,Cordes T,et al.Analysis of 25-hydroxyvitamin D3-1alphahydroxylase in normal and malignant breast tissue. Anticancer Res.2006,Jul–Aug;26(4A):2615–20.
- [7] Schwartz GG,Whitlatch LW,Chen TC,et al.Human prostate cells synthesize 1,25-dihydroxyvitamin D3 from 25-hydroxyvitamin D3.Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.1998,May;7(5):391–5.
- [8] Hewison M,Zehnder D,Bland R,et al.1 alpha-Hydroxylase and the action of vitamin D.J Mol Endocrinol.2000,Oct;25(2):141–8.
- [9] Young MV,Schwartz GG,Wang L,et al.The prostate 25-hydroxyvitamin D-1 alpha-hydroxylase is not influenced by parathyroid hormone and calcium:implications for prostate cancer chemoprevention by vitamin D.Carcinogenesis.2004,Jun;25(6):967–71.
- [10] Akeno N, Saikatsu S,Kawane T,et al.Mouse vitamin D-24-hydroxylase:molecular cloning,tissue distribution,and transcriptional regulation by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3.Endocrinology.1997,Jun;138(6):2233–40.
- [11] Schuster I.Cytochromes P450 are essential players in the vitamin D signaling system.Biochim Biophys Acta.2011,Jan;1814(1):186–99.
- [12] Nagpal S,Na S,Rathnachalam R.Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands.Endocr Rev.2005,Aug;26(5):662–87.
- [13] Abe E,Miyaura C,Sakagami H,et al.Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3.Proc Natl Acad Sci U S A.1981, Aug;78(8):4990–4.
- [14] Simboli-Campbell M, Narvaez CJ, van Weelden K, et al.Comparative effects of 1,25(OH)2D3 and EB1089 on cell cycle kinetics and apoptosis in MCF-7 breast cancer cells.Breast Cancer Res Treat.1997,Jan;42(1):31–41.
- [15] Hager G,Formanek M,Gedlicka C,et al.1,25(OH)2 vitamin D3 induces elevated expression of the cell cycle-regulating genes P21 and P27 in squamous carcinoma cell lines of the head and neck.Acta Otolaryngol.2001,Jan;121(1):103–9.
- [16] Wu G,Fan RS,Li W,et al.Modulation of cell cycle control by vitamin D3 and its analogue,EB1089,in human breast cancer cells. Oncogene.1997,Sep 25;15(13):1555–63.
- [17] Ylikomi T1,Laaksi I,Lou YR,et al.Antiproliferative action of vitamin D.Vitam Horm.2002;64:357–406.
- [18] Iseki K,Tatsuta M,Uehara H,et al.Inhibition of angiogenesis as a mechanism for inhibition by 1alpha-hydroxyvitamin D3 and 1,25-dihydroxyvitamin D3 of colon carcinogenesis induced by azoxymethane in Wistar rats.Int J Cancer.1999 May 31;81(5):730–3.
- [19] Horváth HC,Lakatos P,Kósa JP,et al.The candidate oncogene CYP24A1: A potential biomarker for colorectal tumorigenesis.Histochem Cytochem.2010,Mar;58(3):277–85.
- [20] Chen G, Kim SH, King AN, et al.CYP24A1 is an independent prognostic marker of survival in patients with lung adenocarcinoma.Clin Cancer Res.2011, Feb 15;17(4):817–26.

- [21] Meyer MB, Zella LA, Nerenz RD, et al. Characterizing early events associated with the activation of target genes by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in mouse kidney and intestine in vivo. *J Biol Chem*. 2007, Aug 3; 282(31):22344–52.
- [22] Matilainen JM, Malinen M, Turunen MM, et al. The number of vitamin D receptor binding sites defines the different vitamin D responsiveness of the CYP24 gene in malignant and normal mammary cells. *J Biol Chem*. 2010, Jul 30; 285(31):24174–83.
- [23] Komagata S, Nakajima M, Takagi S, et al. Human CYP24 catalyzing the inactivation of calcitriol is post-transcriptionally regulated by miR-125b. *Mol Pharmacol*. 2009, Oct; 76(4):702–9.
- [24] Roff A, Wilson RT. A novel SNP in a vitamin D response element of the CYP24A1 promoter reduces protein binding, transactivation, and gene expression. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2008, 112(1–3):47–54.
- [25] Meyer MB, Zella LA, Nerenz RD, et al. Characterizing early events associated with the activation of target genes by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in mouse kidney and intestine in vivo. *J Biol Chem*. 2007, 282(31):22344–22352.
- [26] Makishima M, Lu TT, Xie W, et al. Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor. *Science*. 2002, 296(5571):1313–1316.
- [27] Zou A, Elgort MG, Allegretto EA. Retinoid X receptor (RXR) ligands activate the human 25-hydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase promoter via RXR heterodimer binding to two vitamin D-responsive elements and elicit additive effects with 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *J Biol Chem*. 1997, 272(30):19027–19034.
- [28] Konno Y, Kodama S, Moore R, et al. Nuclear xenobiotic receptor pregnane X receptor locks corepressor silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors (SMRT) onto the CYP24A1 promoter to attenuate vitamin D₃ activation. *Mol Pharmacol*. 2009, 75(2):265–271.
- [29] Shankar K, Liu X, Singhal R, et al. Chronic ethanol consumption leads to disruption of vitamin D₃ homeostasis associated with induction of renal 1,25-dihydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase (CYP24A1). *Endocrinology*. 2008, 149(4):1748–1756.
- [30] Matsunawa M, Amano Y, Endo K, et al. The aryl hydrocarbon receptor activator benzo[a]pyrene enhances vitamin D₃ catabolism in macrophages. *Toxicol Sci*. 2009, 109(1):50–58.
- [31] Ohyama Y, Kusada T, Yamasaki T, et al. Extensive methylation of CpG island of CYP24 gene in osteoblastic ROS17/2.8 cells. *Nucleic Acids Res Suppl*. 2002(2):249–250.
- [32] Chung I, Karpf AR, Muindi JR, et al. Epigenetic silencing of CYP24 in tumor-derived endothelial cells contributes to selective growth inhibition by calcitriol. *J Biol Chem*. 2007, 282(12):8704–8714.
- [33] Novakovic B, Sibson M, Ng HK, et al. Placenta-specific methylation of the vitamin D 24-hydroxylase gene: implications for feedback autoregulation of active vitamin D levels at the fetomaternal interface. *J Biol Chem*. 2009, 284(22):14838–48.
- [34] Vaisanen S, Dunlop TW, Sinkkonen L, et al. Frank, C. Spatio-temporal activation of chromatin on the human CYP24 gene promoter in the presence of 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D₃. *J Mol Biol*. 2005, 350(1):65–77.
- [35] Yang BS, Hauser CA, Henkel G, et al. Ras-mediated phosphorylation of a conserved threonine residue enhances the transactivation activities of c-Ets1 and c-Ets2. *Mol Cell Biol*. 1996, 16(2):538–47.
- [36] Nutchey BK, Kaplan JS, Dwivedi PP, et al. Molecular action of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and phorbol ester on the activation of the rat cytochrome P450C24 (CYP24) promoter: role of MAP kinase activities and identification of an important transcription factor binding site. *Biochem J*. 2005, 389(Pt 3):753–62.
- [37] Cui M, Klopot A, Jiang Y, et al. The effect of differentiation on 1,25-dihydroxyvitamin D-mediated gene expression in the enterocyte-like cell line Caco-2. *J Cell Physiol*. 2009, 218(1):113–21.
- [38] Dwivedi PP, Hii CS, Ferrante A, et al. Role of MAP kinases in the 1,25-dihydroxyvitamin D₃-induced transactivation of the rat cytochrome P450C24 (CYP24) promoter. Specific functions for ERK1/ERK2 and ERK5. *J Biol Chem*. 2002, 277(33):29643–53.