

RETINOIDS AND CANCER PREVENTION

Sumittra Charoenhirunyingsos

*Department of Pharmacology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University,
Bangkok 10700, Thailand.*

ABSTRACT

Retinoids, active metabolites of vitamin A (retinol), play critical roles in vision, embryonic development, cell differentiation and homeostasis. Their receptors can be divided into two classes: the retinoic acid receptors (RARs) and the retinoid X receptors (RXRs). Both types of receptor are members of the nuclear hormone receptor superfamily. The receptors are subdivided into six distinct regions denoted the A-F domains. RARs and RXRs are required for RA-induced activation of a retinoic acid response element (RARE). The RAREs are found in many promoters and consist of direct repeats of the same sequence. The expression of target genes can be modulated by interacting with both receptors through RARE in promoter regions of target genes. As either homodimers or heterodimers with RAREs located in the promoter regions of target genes, RA-target gene activation is receptor specific and cell type specific. Either excessive or lacking of vitamin A may result in abnormal development that leads to tumorigenesis process. Some retinoids are being evaluated as chemopreventive and chemotherapeutic agents for a variety of human cancers. Therefore, the current opinion concerning retinoids and cancers are reviewed.

Key words : vitamin A, retinoids, retinoid receptors, cancer

INTRODUCTION

วิตามินเอจัดเป็นสารที่จำเป็นสำหรับการดำรงชีวิตของมนุษย์ สารสำคัญในการออกฤทธิ์เรียกว่า “retinoids” ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการมองเห็น การเจริญเติบโต และควบคุมสมดุลต่าง ๆ ของร่างกาย กลไกในการออกฤทธิ์ของ retinoids จะผ่านทาง retinoid receptors ซึ่งแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ retinoic acid receptors (RARs) และ retinoid X receptors (RXRs) โดยเซลล์แต่ละชนิดจะมี receptor กลุ่มใดนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์นั้นๆด้วย Retinoid receptor แต่ละชนิดจะออกฤทธิ์ได้ต้องอาศัย retinoic acid ในการเหนี่ยวนำให้ตัว receptor เคลื่อนที่ไปจับกับ retinoic acid response element (RAREs) ในนิวเคลียสบริเวณ promoter เพื่อกระตุ้นให้มีการสร้าง mRNA และโปรตีนต่อไป ปัจจุบันเราพบว่า สารอนุพันธ์ของวิตามินเอหลายตัวมีบทบาทในการรักษามะเร็งของมนุษย์ เช่น all-trans retinoic acid (ATRA) สามารถนำมาใช้ร่วมกับ tamoxifen ในการรักษามะเร็งเต้านม ต่อมาได้มีการนำ ATRA (tretinoin) มาทดลองใช้ในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว (acute promyelocytic leukemia) ซึ่งสามารถทำให้เกิด remission ในผู้ป่วยได้เช่นกัน พร้อมๆกันนี้ได้มีการศึกษาบทบาทของ retinoids ที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งชนิดต่าง ๆ ของมนุษย์ทั้งใน in vitro และ in vivo เช่น มะเร็งบริเวณศีรษะและลำคอ มะเร็งรังไข่ มะเร็งปากมดลูก มะเร็งปอด และมะเร็งผิวหนัง เป็นต้น โดยศึกษาในแง่ชนิดของ receptor ที่สัมพันธ์กับมะเร็งแต่ละชนิด

และกลไกที่ retinoids ใช้ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์หรือการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์มะเร็ง ปัจจุบันนักวิจัยได้มุ่งศึกษาทั้งในเรื่องของ cell-cycle regulation, โปรตีน cyclin dependent kinase (เช่น cdk4, cdk6) ซึ่งสามารถทำให้เซลล์เกิด G₁ arrest และนำเซลล์เข้าสู่ terminal differentiation ในที่สุด นอกจากนี้ยังได้ศึกษาในกลุ่มของ transcriptional factors: c-jun, c-fos, c-myc, AP-1 ซึ่งกระตุ้นให้มีการสร้าง mRNA และทำให้เกิด malignant transformation cells ตามมาได้ ดังนั้นจะเห็นได้ว่า retinoids น่าจะมีบทบาทสำคัญในการร่วมรักษามะเร็งของมนุษย์ต่อไปในอนาคต

HISTORY OF RETINOIDS

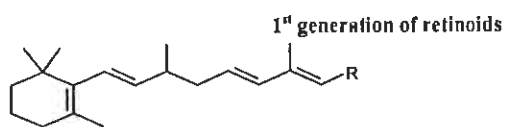
ในสมัยโบราณแพทย์ชาวอียิปต์สังเกตพบว่าสารสกัดจากตับสามารถรักษาโรคตาบางชนิดให้หายได้ ต่อมา George Wald ได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมในปี ค.ศ. 1932-1934 พบว่าตับจัดเป็นอวัยวะที่อุดมไปด้วยวิตามินเอ ดังนั้นสารสกัดจากตับจึงสามารถนำมาใช้รักษาโรคตาดังกล่าวข้างต้น วิตามินเอจัดเป็นสารที่ละลายในไขมัน และเป็นสารจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตและการดำรงชีวิตของมนุษย์ (McCollum and Davis, 1913) สารบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากวิตามินเอเรียกว่า “retinol” ซึ่งเป็นสารที่ถูกนำมาใช้ในการรักษาและการทดลองทางคลินิกต่างๆมากมาย ส่วนสาร active metabolites ของวิตามินเอนั้นเรียกว่า “retinoids” ซึ่งมีความสำคัญในการมองเห็น

การพัฒนาของตัวอ่อนในครรภ์ การแบ่งตัว และเพิ่มจำนวนเซลล์ การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ รวมทั้งควบคุมสมดุลของร่างกายด้วย ดังนั้นการได้รับวิตามินเอมากเกินไปหรือการขาดวิตามินเอ ย่อมมีผลต่อพัฒนาการของร่างกายที่ผิดปกติได้

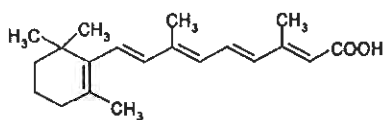
STRUCTURE OF RETINOIDS AND THEIR CLASSIFICATION

Retinoids จัดเป็นสารอนุพันธ์ที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกับวิตามินเอ ในธรรมชาติเราสามารถพบสารดังกล่าวได้มากกว่า 2,500 ชนิด¹ และสามารถจัดแบ่งหมวดหมู่ตามสูตรโครงสร้างได้เป็น 3 generations (รูปที่ 1) ได้แก่

1. 1st generation ได้แก่ all-trans retinoic acid (tretinoin) และ 13-cis-retinoic acid (isotretinoin)

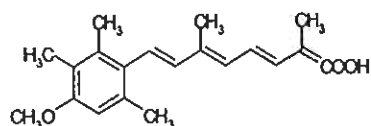


Retinol (vitamin A)



All-trans retinoic acid (tretinoin)

2nd generation of retinoids

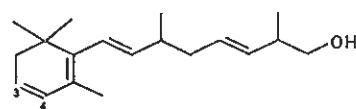


Acitretin

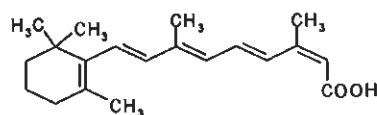
รูปที่ 1 Classification of retinoids

2. 2nd generation ได้แก่ aromatic retinoids เช่น etretinate และ acitretin การเพิ่มกลุ่ม aromatic ring เข้าไปจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพ (potency) ของยาในการรักษาให้ดีขึ้นด้วย

3. 3rd generation ได้แก่ poly-aromatic retinoids with or without polar group ซึ่งมีประสิทธิภาพในการรักษาดีกว่ากลุ่มที่ 2 สามารถบริหารในปริมาณที่น้อยลง จำนวนครั้งน้อยลง รวมทั้งเกิดผลข้างเคียงจากยาน้อยลงด้วย เช่น flavonoids (flavanols, flavanones, flavones, isoflavones) ซึ่งจัดเป็นสารที่พบในพืชหลายชนิด เชื่อว่ามีฤทธิ์ในการรักษาโรคมะเร็ง โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคภูมิแพ้ และโรคติดเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งกำลังได้รับความสนใจและมีการศึกษาวิจัยกันอย่างแพร่หลายอยู่ในขณะนี้²

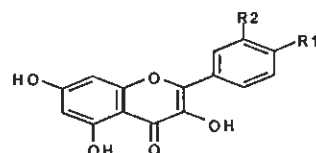


3,4-Didehydroretinol (vitamin A₂)



13-cis retinoic acid (isotretinoin)

3rd generation of retinoids



Flavanol

RETINOID RECEPTORS

Retinoid receptors แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ retinoic acid receptors (RARs) และ retinoid X receptors (RXRs) ซึ่งแต่ละ class มีสมาชิก 3 ตัว คือ α , β และ γ ⁵ receptors โดยสมาชิกแต่ละตัวยังมีหลาย isotypes เช่น β receptors แบ่งเป็น β_1 , β_2 และ β_4 ⁶ แต่ละ receptor ของ retinoids จะมีส่วนของ DNA binding domain (C-region) เหมือนกัน ส่วน isoforms ที่แตกต่างกันของแต่ละ receptor ขึ้นอยู่กับส่วนของ N-terminal region (AB-region) ที่แตกต่างกัน และแต่ละ isotype ที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับตำแหน่ง splicing และตำแหน่งของ promoter⁶ กลไกการออกฤทธิ์ของ retinoids ขึ้นอยู่กับชนิดของ retinoid receptors ที่จะไปจับกับ retinoic acid response element (RARE) ในบริเวณ promoter region เพื่อกระตุ้นให้เกิดการสร้าง mRNA ต่อไป

STRUCTURE AND FUNCTION OF RAR AND RXR

Retinoid receptor จัดเป็นสมาชิก nuclear hormone receptor superfamily ซึ่งสมาชิกใน family นี้ยังประกอบไปด้วย receptor ของ glucocorticoids (cortisone), estrogens, mineralocorticoids (andosterone), androgens

(testosterone), progesterone, fatty acids, thyroid hormone, vitamin D₃ รวมทั้ง receptors อีกจำนวนมากที่ยังไม่สามารถจำแนกชนิดของส่วน ligand-binding ได้ (orphan receptors)^{7,8} Nuclear hormone receptor superfamily นี้ มีจำนวนสมาชิกมากกว่า 150 ชนิด เรานิยมใช้ steroid hormone receptor เป็นแม่แบบของการศึกษา receptor ใน superfamily นี้ การแยกชนิดของ steroid hormone receptor โดยอาศัยลำดับเบสที่เหมือนกัน (homology sequencing) สามารถแบ่งได้เป็น 6 ส่วน โดยใช้อักษร A-F เป็นสัญลักษณ์แทนแต่ละ domain^{9,10} (รูปที่ 2)

●AB-region ได้แก่ ส่วนของ N-terminal ซึ่งมี ligand independent transactivation function บรรจอยู่

●C-region ได้แก่ ส่วนของ DNA-binding domain

●D-region ได้แก่ ส่วนของ flexible protein domain จัดเป็นส่วน conserved region

●E-region ได้แก่ ส่วนของ ligand-binding domain

●F- region ได้แก่ ส่วนของ non-specific function จัดเป็นส่วน non-conserved region บาง receptor จะไม่มีส่วนนี้¹¹⁻¹⁵

1	53	90	147	193	413	448
A	B	C	D	E	F	

รูปที่ 2 ภาพแสดงการแยกชนิดของ steroid hormone receptor โดยอาศัยลำดับเบสของกรดอะมิโน สามารถแบ่งได้ 6 ส่วน โดยใช้อักษร A-F เป็นสัญลักษณ์แทนแต่ละ domain (van der Leede et al. Hubrecht Laboratory, Netherland Institute for Developmental Biology, Utrecht, Netherlands, 1996)

ดังนั้น RAR และ RXR ซึ่งเป็นสมาชิกของ nuclear hormone receptor จึงมีองค์ประกอบคล้ายคลึงกับ steroid hormone receptor คือ

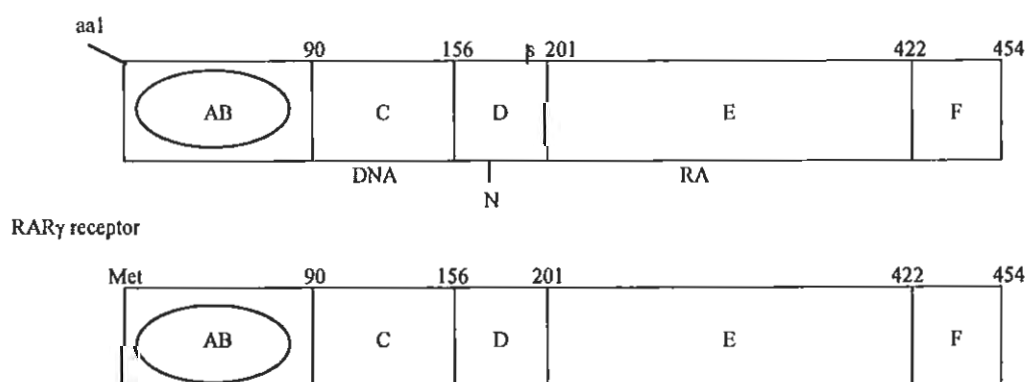
1) C-terminal part เป็นบริเวณที่มี ligand binding domain (E-region) บรรจุอยู่ ซึ่งภายในบริเวณ E-region นี้จะบรรจุส่วนของ dimerization domain และ transactivation domain ไว้ คือ activating factor 2 (AF-2) ซึ่งเรียกว่า transactivating factor 2 (TAF-2)¹⁶⁻²¹

2) บริเวณ N-terminal part เป็น RAR wild-type receptor บริเวณ AB-

region อยู่ ซึ่งภายในบริเวณนี้จะบรรจุส่วนของ ligand independent transactivation function คือ activating factor1(AF-1) ไว้ด้วย

3) DNA-binding domain (C-region) เป็นบริเวณที่อยู่ระหว่างบริเวณที่ conserved มากที่สุด(D-region) กับบริเวณที่แสดงความแตกต่างกันของสมาชิกแต่ละตัว (AB-region)

4) D-region เป็นบริเวณที่ conserved มากที่สุดและเป็นที่อยู่ของ nuclear localization signal²² (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 ภาพแสดง RAR receptor และ RAR γ โดยตัวเลขข้างบนแสดงถึงตำแหน่งของกรดอะมิโน เช่น RAR γ ตำแหน่งเริ่มต้นคือกรดเมไทโอนีน ตำแหน่ง domain AB ประกอบด้วย ligand independent transactivation function (activating factor 1: AF-1), ตำแหน่ง domain C ประกอบด้วย DNA binding domain, ตำแหน่ง domain D ประกอบด้วย nuclear localization signal (N) และ conserved SacI site (S), ตำแหน่ง domain E ประกอบด้วย retinoic acid binding site และ major site for heterodimerization with RXRs นอกจากนี้ยังประกอบด้วย transactivation domain (activating factor 2: AF-2), ส่วนตำแหน่ง domain F จัดเป็นส่วน non-conserved อาจมีหรือไม่มีก็ได้. (Aneskievich and Fuchs, 1995. และ Folkers, et al. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular biology 1996; 56: 119.)

RETINOIC ACID RESPONSE

ELEMENTS (RAREs)

RARE คือ ส่วนของลำดับ nucleotide ตรงตำแหน่ง promoter ซึ่งสามารถจับกับ retinoid receptor บริเวณ DNA-binding domain (C-region) ลักษณะของ RARE จะคล้ายคลึงกับ element ของ vitamin D₃ และ thyroid hormone receptor คือลำดับเบสที่เหมือนกัน ซ้ำกันเป็นชุดๆ (directly repeats of the

same sequence)²³ (รูปที่ 4) Retinoid receptor จึงสามารถสร้างเป็น heterodimers กับตัวเอง เช่น RAR-RXR หรือจับกับ nuclear receptor อื่นๆ เช่น RXR-VDR เป็นต้น โดยทั้ง RAR และ RXR สามารถจับกับ response element อื่นๆ ได้ด้วย แต่ retinoid receptors จะสามารถจับกับ RARE ที่บริเวณ promoter ได้ต้องอาศัย retinoic acid เป็นตัวเหนี่ยวนำ และกระตุ้นให้เกิดการสร้าง mRNA ต่อไป

(a) GRE	5' AGAACA(N) ₃	→	TGTTCT 3'
	3' TCTTGT(N) ₃	←	ACAAGA 5'
(b) ERE	5' AGGTCA(N) ₃	→	TGACCT 3'
	3' TCCAGT(N) ₃	←	ACTGGA 5'
(c) VDRE	5' AGGTCA(N) ₃	→	AGGTCA 3'
	3' TCCAGT(N) ₃	←	TCCAGT 5'
(d) TRE	5' AGGTCA(N) ₄	→	AGGTCA 3'
	3' TCCAGT(N) ₄	←	TCCAGT 5'
(e) RARE	5' AGGTCA(N) ₅	→	AGGTCA 3'
	3' TCCAGT(N) ₅	←	TCCAGT 5'

รูปที่ 4 ภาพแสดงลำดับของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง DNA sites, cell response elements ซึ่งจับอยู่กับ glucocorticoids (GRE), estrogen (ERE), vitamin D₃ receptor (VDRE), thyroid hormone receptor (TRE) และ retinoic acid receptor (RARE). (Adapted from Chapter10: Regulation of Transcription Initiation. In: Molecular Cell Biology, 2000:394)

CELL-TYPE SPECIFIC TRANSCRIPTIONAL ACTIVATION BY RETINOIC ACID

การให้สาร retinoic acid (RA) สามารถกระตุ้นกระบวนการ transcription ได้ โดยขึ้นอยู่กับชนิดของ retinoid receptor และ response element โดยทั้งคู่จะมาจับกัน อยู่ในรูป heterodimeric receptor complex ที่บริเวณ promoter นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ (cell-type specific) ด้วย ดังนั้นปัจจัยที่มีผลต่อการควบคุมการทำงานของส่วน promoter และการตอบสนองต่อ retinoic acid³ ของเซลล์แต่ละชนิดคือ

- Ligand availability
- Receptor expression
- Receptor binding to DNA
- Receptor activity
- Promoter architecture
- Posttranscriptional modification

BIOLOGY OF CELL-SPECIFIC TRANSCRIPTION REGULATION IN RETINOID SIGNALING

การเจริญของอวัยวะต่างๆ ขึ้นอยู่กับการสังเคราะห์และเมตาบอลิซึมของ retinoids ซึ่งถูกควบคุมโดยเอนไซม์หลายชนิดและหลายขั้นตอน ดังนั้นการได้รับวิตามินเอมากเกินไปหรือการขาดวิตามินเอย่อมมีผลต่อการพัฒนาของอวัยวะต่างๆ โดยปกติในอาหารจะมีปริมาณของ retinoids ไม่แน่นอน การวัดระดับของ retinoids จึงนิยมวัดในรูปของ serum retinol (ค่าปกติ 20-80 µg/dL)²⁴ เนื่องจากในกระบวนการ

สังเคราะห์ retinoids (active metabolite) เริ่มจาก retinol เมื่อผ่าน plasma membrane เข้าสู่เซลล์ จะจับกับ retinol binding protein (RBP) (ค่าเฉลี่ยปกติ RBP ของผู้ใหญ่ ในเพศชาย 47 µg/mL ในเพศหญิง 42 µg/mL และในเด็กอายุมากกว่า 10 ขวบ 20-30 µg/mL)²⁰ กลายเป็น retinoid-binding protein complex เราสามารถแบ่งกลุ่มของ retinoid-binding protein complex ออกเป็น 2 กลุ่มคือ cellular retinol-binding protein (CRBP) และ cellular retinoic acid-binding protein (CRABP) ซึ่งแต่ละกลุ่มมี 2 ชนิดคือ CRBP I,II และ CRABP I,II ซึ่งจะจับกับ retinol และ retinoic acid ตามลำดับ

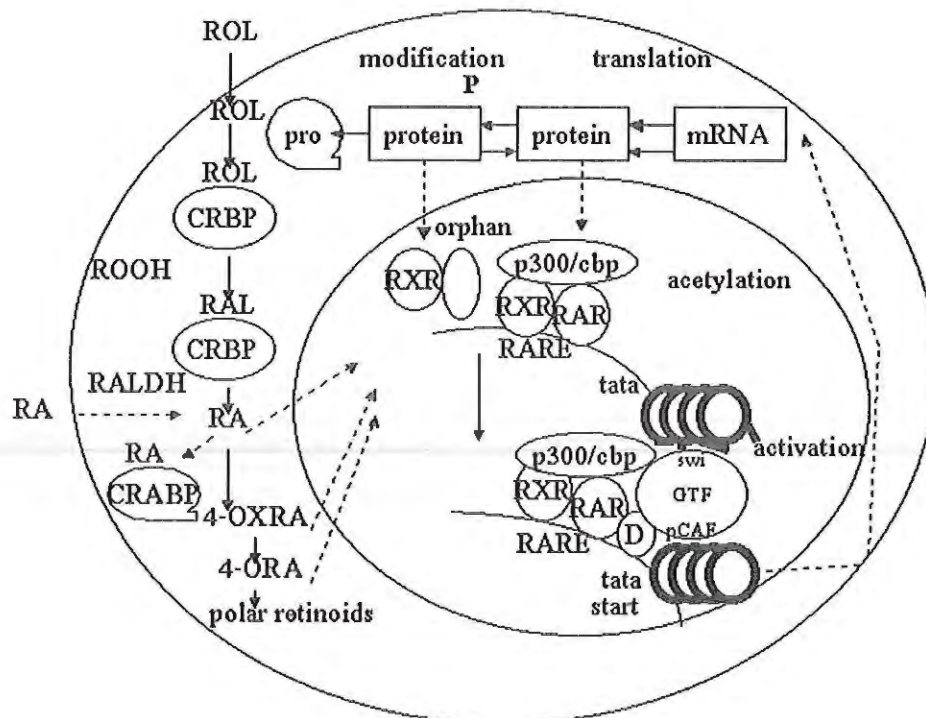
Retinol สามารถเปลี่ยนเป็น retinal โดยอาศัยเอนไซม์ retinol dehydrogenase และเปลี่ยนจาก retinal ไปเป็น retinoic acid โดยอาศัยเอนไซม์ retinal dehydrogenase (รูปที่ 5) ในขั้นตอนการเปลี่ยน retinol เป็น retinal นั้นถือว่าเป็น rate limiting step ของกระบวนการสังเคราะห์สาร active retinoids เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในขั้นตอนนี้ได้แก่ alcohol dehydrogenases (ADH), ADH I และ ADH IV ซึ่งสามารถเกิดได้ทั้งใน cytoplasm และ microsomes

หลังจากนั้น retinoic acid (4-oxaretinoic acid, ATRA, 9-cis RA, 3,4-didehydro RA, 14 HRR) จะผ่านเข้าสู่นิวเคลียสเพื่อไปจับกับ retinoic receptors (RARs, RXRs) และเคลื่อนตัวไปจับกับ RARE ที่บริเวณ promoter region แล้วชักนำให้เกิดการสร้าง mRNA และโปรตีนต่อไป Retinoic acid ทั้งที่สร้างขึ้นได้จากภายใน

ในร่างกาย (endogenous retinoic acid) หรือได้รับจากภายนอก (exogenous retinoic acid) นั้นมีความจำเพาะต่อชนิดของเซลล์และชนิดของ receptors ด้วย เช่น ATRA มีความจำเพาะต่อ RARs ส่วน 9-cis RA มีความจำเพาะต่อทั้ง RARs และ RXRs

นอกจากนี้สาร β -carotene และ provitamin carotinoids อื่นๆ ยังสามารถเปลี่ยนเป็น retinal ได้ที่บริเวณเยื่อชั้นใน

ผนังของลำไส้เล็ก และสามารถเปลี่ยนกลับมาเป็น retinol ได้เช่นกัน หลังจากนั้นร่างกายจะมีกระบวนการ esterification เพื่อเก็บสะสมวิตามินเอไว้ในรูปของ retinyl palmitate ที่ตับ และจะถูกปล่อยกลับเข้าสู่กระแสเลือดอีกครั้งในรูปของ Retinol โดยมักจะจับกับ Retinol binding protein (RBP) หรือจับกับ prealbumin transthyretin²⁴ retinol ดังกล่าวก็จะผ่านกระบวนการข้างต้นเพื่อออกฤทธิ์ต่อไป



รูปที่ 5 ภาพแสดงขั้นตอนการสังเคราะห์และเมตาบอลิซึมของ retinoids ภายในเซลล์มนุษย์ โดยอักษรต่างๆ มีความหมายดังนี้ : ROL= retinol, RAL= retinal, ROOH = carboxylic acid, CRBP = cellular retinol binding protein, RALDH = retinal dehydrogenase, RA = retinoic acid, CRABP = cellular retinoic acid binding protein, RXR = retinoids X receptor, RAR = retinoic acid receptor, RARE = retinoic acid response element, P = phosphorylation, swi = a protein required for transcriptional activation, p300/cbp = a cofactor for RAR, pCAF = a protein for p300/cbp-associated factor, GTF = general transcription factor, D = D-box. (Adapted from van de Leede et al. Hubrecht Laboratory, Netherlands Institute for Developmental Biology, Utrecht, Netherlands, 1996)

VITAMIN A DEFICIENCY

เนื่องจากวิตามินเอจัดเป็นสารสำคัญสำหรับการทำงานของเซลล์ต่างๆ ของร่างกาย การมองเห็น และมีส่วนต่อพัฒนาการและการสร้างอวัยวะส่วนต่างๆ ของร่างกาย สาเหตุของการขาดวิตามินเอ ได้แก่²⁵⁻²⁷

1. Primary vitamin A deficiency ส่วนใหญ่มักเกิดจากการขาดอาหารมาเป็นเวลานาน ซึ่งพบบ่อย (endemic areas) ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เกิดจากการสีข้าวทำให้สาร carotenes ที่เปลือกหลุดไป

2. Secondary vitamin A deficiency เกิดจากการที่สาร carotene ไม่สามารถเปลี่ยนกลับเป็นวิตามินเอได้ หรือมีการรบกวนการดูดซึม การขนส่งของวิตามินเอ เช่น celiac disease, sprue, cystic fibrosis, pancreatic disease, duodenal bypass, congenital partial obstruction of jejunum, obstruction of bile ducts, giardiasis และ cirrhosis.

อาการแสดงที่อาจตรวจพบทางคลินิก ได้แก่*

● ผิวหนังเปลี่ยนไป เช่น ผิวหยาบแห้งและมีขุยหนาขึ้น ลักษณะคล้ายหนังห่าน เรียกว่า goose flesh หรือ xeroderma นอกจากนี้อาจมีผลต่อเยื่อผิวของระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินอาหาร และระบบทางเดินปัสสาวะด้วย

● ตาบอดในที่มืด (night blindness) เป็นแผลที่กระจกตา (corneal ulcer) นอกจากนี้การขาดวิตามินเอยังเป็นสาเหตุของ xerophthalmia หรือ xerosis conjunctivae ซึ่งสามารถทำให้เกิดตาบอดในที่สุด

● นอกจากนี้อาจทำให้มีอาการเบื่ออาหาร เจริญเติบโตช้า ระบบภูมิคุ้มกันต่ำลง และโครงกระดูกของร่างกายผิดปกติได้อีกด้วย

(*America's Vitamin and Herbal Pharmacy 2000)

VITAMIN A TOXICITY

วิตามินเอสามารถทำให้เกิดพิษที่อวัยวะต่างๆ ได้ โดยผ่านทาง multiple signaling pathway¹ ซึ่งระดับที่เป็นพิษสามารถทำให้เกิดผลต่อ

● ผิวหนังและเยื่อ (ผิวแห้ง ลอก อักเสบ คัน ไวต่อการตอบสนองต่อแสง)

● ตับ ทำให้มี reversible elevation ของเอนไซม์ตับ

● โครงกระดูกสันหลัง เช่น มีหินปูนเกาะที่เอ็น, skeletal hyperostosis

● ระบบประสาทส่วนกลาง เช่น ปวดศีรษะ

● Reversible abnormalities ของไขมันในซีรัม

Russell RM ได้ทำการศึกษาในผู้ป่วยหญิง ที่ได้รับวิตามินเอ 400,000 IU/วัน (120 มก./วัน) มานาน 8 ปี พบความผิดปกติของการทำงานของตับ คิวบาง ผมหยาบ ลื่นลื่น และตาโปน ผลชิ้นเนื้อตับพบว่า มี hepatic congestion และ fibrosis โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณรอบๆ central vein^{26,27}

Ellis et al. ได้รายงานไว้ว่า vitamin A intoxication สามารถเกิดได้กับผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของเมตาบอลิซึมของวิตามินเอ

โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยที่มีไขมันในเลือดสูงชนิด type I²⁸

Carpenter et al. ได้รายงานครอบครัวหนึ่งที่มีสมาชิกในครอบครัวหลายคนเกิด vitamin A intoxication หลังกินวิตามิน โดยสันนิษฐานว่าน่าจะเกิดจาก genetic predisposition²⁹

Krasinski et al. เป็นบุคคลแรกที่พบว่าอายุเป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเกิด vitamin A intoxication ซึ่งในคนสูงอายุจะมีโอกาสเกิดมากกว่าคนหนุ่มสาวทั่วไป นอกจากนี้ยังได้ศึกษาในอาสาสมัครที่มีสุขภาพแข็งแรง โดยให้กินอาหารที่มีไขมันและวิตามินเอสูง หลังจากนั้นได้ทำ plasma-pheresis หลายชั่วโมง พบว่าที่ 24 ชั่วโมง ใน chylomicrons และ chylomicron remnants สามารถวัดระดับของ vitamin A ester เพิ่มขึ้นได้อีก และการขนส่ง vitamin A ester จาก chylomicrons เข้าสู่ lipoprotein เช่น LDLs จะทำให้ระดับความเป็นพิษของวิตามินเอในอยู่กระแสเลือดได้นานถึง 1 สัปดาห์ และในผู้ป่วยที่กินวิตามินเอมากเกินไปที่กำหนดมีโอกาสที่ fasting blood retinyl ester จะสูงกว่าปริมาณวิตามินเอที่กินเข้าไปได้มาก (ค่าปกติของ fasting blood retinyl ester 20-80 µg/dL, ใน vitamin A toxicity จะมากกว่า 100 µg/dL และอาจสูงได้ถึง 2,000 µg/dL)²⁴ นอกจากนี้ผู้ป่วยที่กินวิตามินเอมาเป็นเวลานานมากกว่า 5 ปี จะมีโอกาสเกิดพิษจากรetinyl ester ได้มากกว่าผู้ป่วยที่กินมาน้อยกว่า 5 ปี³⁰

VITAMIN A AND TERATOLOGY

ในปี ค.ศ. 1953 Cohlan ได้ทำการศึกษาทดลองในหนูตั้งครรภ์ และเลี้ยงด้วยอาหารที่มีสารประกอบวิตามินเอ 35,000 IU/วัน ระหว่างอายุครรภ์ 2-16 วัน พบว่าลูกหนูที่คลอดออกมาไม่มีศีรษะ ปากแหว่ง เพดานโหว่ และมีความผิดปกติทางสายตา^{31,32} ต่อมา ในปี ค.ศ. 1979 Geelen ได้ทำการทดลองซ้ำในหนูสายพันธุ์อื่น ๆ และกระต่าย ซึ่งได้ผลเช่นเดียวกัน³³

สำหรับในมนุษย์ The National Research Council's Recommended Dietary แนะนำให้หญิงมีครรภ์ได้รับวิตามินเอ 5,000 IU หรือ retinol 3,300 IU ต่อวัน ส่วนในหญิงตั้งครรภ์ที่ขาดวิตามินเอนั้น World Health Organization และ IVACG stage แนะนำให้ได้รับวิตามินเอวันละ 7,000-8,000 IU^{34,35} จากรายงานพบว่ามารดาที่ได้รับวิตามินเอ 25,000 IU ต่อวันระหว่างการตั้งครรภ์ ให้กำเนิดทารกพิการผิดปกติในระบบต่างๆ เช่น ระบบประสาท ศีรษะและใบหน้า หัวใจ และต่อมไทมัส มารดาที่ได้รับ isotretinoin ระหว่างตั้งครรภ์ทารกมีโอกาสเสี่ยงต่อสมอง หัวใจ และหูพิการผิดปกติ เพิ่มขึ้นเป็น 26 เท่า เมื่อเทียบกับมารดาที่ไม่ได้รับ isotretinoin ระหว่างตั้งครรภ์¹⁹

THE ROLES OF RETINOIDS IN CANCER

เนื่องจากผลการศึกษาดังกล่าวมากมายพบว่า retinoic acid ซึ่งจัดเป็น

สมาชิกตัวหนึ่งของกลุ่ม transcriptional factor มีผลต่อการเจริญเติบโต การแบ่งตัว เพิ่มจำนวนเซลล์ทั้งในภาวะปกติและในมะเร็ง และเนื่องจาก RARs และ RXRs เป็น receptors ที่ถูกควบคุมโดยยีนเพื่อให้เกิดการถอดรหัสและเพื่อให้เกิดการสร้างโปรตีนต่อไป ปัจจุบันนักวิจัยบางกลุ่มจึงมุ่งศึกษาบทบาทของ retinoic acid (RA) เนื่องจากสารดังกล่าวสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งได้ (antiproliferative effect) โดย RA จะไปจับกับ RAR แล้วมีปฏิสัมพันธ์กับ activator protein 1 (AP-1) complex ซึ่งโดยทั่วไปนั้น AP-1 สามารถมีปฏิสัมพันธ์กับ c-fos, c-jun ได้ด้วย ทั้ง AP-1, c-fos และ c-jun ก็จัดอยู่ในกลุ่ม transcriptional factor เช่นกัน transcriptional factor เหล่านี้จะไปมีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์ mRNA ที่บริเวณ promoter region การกระตุ้น AP-1 complex จะทำให้มีการสร้างสาร growth factors, inflammatory peptides, oncogenes และ tumor promoters ผลคือเกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ตามมา เมื่อเราให้สาร retinoic acid เข้าสู่ร่างกายไม่ว่าจะเป็น exogenous RA หรือสารที่สังเคราะห์ในเนื้อเยื่อของร่างกาย (endogenous RA) ก็ตาม RA จะไปจับกับ RAR หรือ RXR และจะไปรวมกับ AP-1 complex ที่บริเวณ promoter region มีผลยับยั้งการกระตุ้น AP-1 complex จึงสามารถยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ตามมา กรณีที่ระดับของ all-trans RA ในเนื้อเยื่อลดลง จึงย่อมมีผลต่อ normal signal transduction ด้วย และการลดลงของ RA นี้ย่อมส่งผลให้ AP-1

สามารถจับกับ c-fos, c-jun หรือกับ DNA sequence motifs ได้ ผลคือเกิด trans-activation ของ target genes และเกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ ทำให้เกิด malignant transformation ตามมาได้²⁵

RAR β AND SQUAMOUS CELL CARCINOMA (SCC) OF HEAD AND NECK

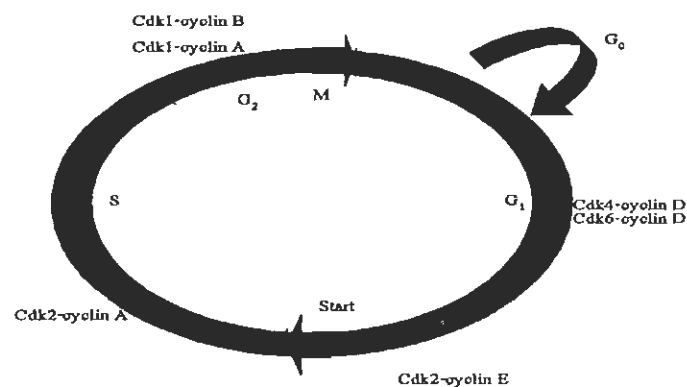
Retinoic acid (RA) จัดเป็นสารที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของมะเร็งได้หลายชนิด มีการศึกษาเกี่ยวกับ RAR β ซึ่งเชื่อว่าสัมพันธ์กับมะเร็งหลายชนิด รวมทั้งมะเร็งที่บริเวณศีรษะและลำคอด้วย จากการศึกษาพบว่าผู้ป่วยมะเร็งชนิดนี้เกิดจากการไม่สามารถแสดงออกของ RAR β บน target gene หรือเกิดจากร่างกายไม่ตอบสนองต่อการกระตุ้นของวิตามินเอในการยับยั้งการโตของมะเร็ง^{5,27} เมื่อทำการ transfection เพื่อให้มีการแสดง RAR β ใน SCC cell lines อีกครั้ง และให้ RA treatment พบว่าสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ด้วยลักษณะของเซลล์ในเนื้อเยื่อทดลองพบว่าตัวเซลล์ลีบลง แต่มีปริมาณของ cytoplasm มากและหลุดลอกออกจาก culture dish ในที่สุด นั่นคือ RA สามารถเหนี่ยวนำให้มีการแสดงของ RAR β เพิ่มขึ้น และชักนำให้เกิด terminal differentiation ใน SCC lines

กลไกการเกิด terminal differentiation นั้นสัมพันธ์กับ cell-cycle regulation (รูปที่ 6) เนื่องจากในช่วง G₁ phase เป็นช่วงสำคัญ ที่ทำหน้าที่ควบคุมการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์ โปรตีนที่มีบทบาท

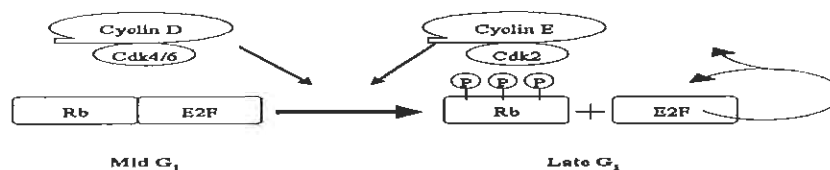
สำคัญ คือ กลุ่ม cyclin D family ได้แก่ cdk4 และ cdk6 โดย cdk complex นี้จะไปกระตุ้นให้เกิด hyperphosphorylation ของ retinoblastoma protein (Rb) และ Rb นี้จะกระตุ้น transcriptional factor กลุ่ม elongation factor 2(E2F) family^{23,36} ทำให้เกิดการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนเซลล์ตามมา (รูปที่ 7)

การให้ retinoic acid ในเซลล์ เนื้อเยื่อทดลองจะสามารถลด cyclin D₁ ซึ่ง

เป็นสมาชิกตัวหนึ่งของ cyclin D family นี้ได้ ผลคือทำให้เกิด dephosphorylation ของ Rb จึงทำให้เซลล์หยุดการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนตามมา (G₁ arrest) นอกจากนี้ cyclin D₁ ยังสัมพันธ์กับกระบวนการ transcription และ posttranslational modification การลดลงของ cyclin D จะทำให้ AP-1 activity ลดลงด้วย ผลคือ มีการแบ่งตัวหรือการเพิ่มจำนวนของเซลล์ลดลงด้วย



รูปที่ 6 ภาพแสดงการทำงานของ cdk-cyclin complexes ในวงจรของเซลล์ (cell cycle) สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดย cyclin D จะรวมถึง D-type cyclins ทั้งสามชนิด (Adapted from Chapter13: Regulation of the Eukaryotic Cell Cycle. In: Molecular Cell Biology, 2000:526)



รูปที่ 7 ภาพแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง regulation of Rb protein และ E2F activities ใน late G₁ กับ cyclin D (Adapted from Chapter13: Regulation of the Eukaryotic Cell Cycle. In: Molecular Cell Biology, 2000:527)

RAR β AND LUNG CANCERS

เนื่องจากมะเร็งปอดยังเป็นสาเหตุที่ทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตในลำดับต้นๆ จึงมีผู้ศึกษาและให้ความสนใจกับมะเร็งชนิดนี้มาก รวมทั้งการสูบบุหรี่ซึ่งเป็นปัจจัยที่ก่อให้เกิดมะเร็งชนิดนี้ด้วย²⁹ จากการศึกษาพบว่าสารนิโคตินในบุหรี่มีผลทำให้การทำหน้าที่ของ retinoic acid (RA) ในการยับยั้งมะเร็งเสียไป³⁷ โดย RA สัมพันธ์กับการแสดงออกของยีน p21^{WAF1} ซึ่งจัดเป็นสมาชิกของโปรตีนในกลุ่ม cyclin dependent kinase inhibitors (CKI) ผลของ RA ทำให้การแสดงออกของยีน p21^{WAF} เพิ่มขึ้น³⁸ จึงทำให้โปรตีนในกลุ่ม CKI เพิ่มขึ้นและทำหน้าที่ขัดขวางไม่ให้เซลล์เข้าสู่ S-phase ของ cell-cycle³⁶ โดยไปยับยั้งการทำงานของ cdk2-cyclin A ส่งผลให้ phosphorylation ของ Rb protein เกิดขึ้นได้น้อยลง ผลคือลดการกระตุ้น transcriptional factor กลุ่ม E2F จึงทำให้เกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์น้อยลงตามมา (รูปที่ 6,7) ส่วนความสัมพันธ์ของ retinoid receptors กับมะเร็งชนิดนี้ ขึ้นอยู่กับลักษณะของเซลล์มะเร็ง กล่าวคือมีผู้ศึกษาใน epidermoid lung cancer พบว่ามีความจำเพาะต่อ RAR β 2 เท่านั้น^{39,40} โดยสามารถพบ RAR α 2 รวมทั้ง retinoid receptors อื่นๆ ในเซลล์เนื้อเยื่อทดลอง แต่พบว่าไม่มีบทบาทในการยับยั้งการโตของมะเร็งจากการกระตุ้นด้วย RA เหมือน RAR β 2 นอกจากนี้พบว่าเซลล์เนื้อเยื่อ non small cell lung cancer (NSCLC) สัมพันธ์กับ RXR α ⁴¹ หรือ bron-

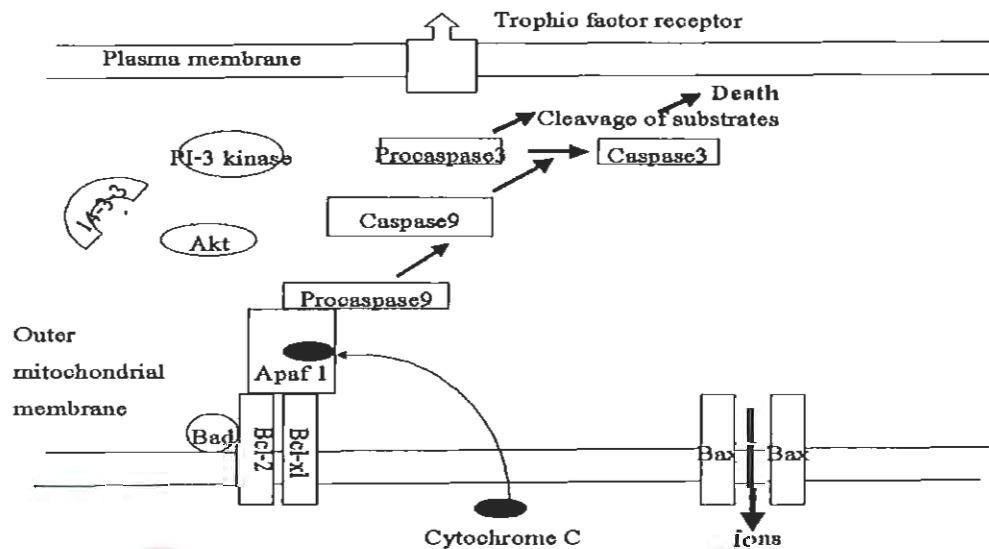
choalveolar carcinoma สัมพันธ์กับ RAR β เป็นต้น

RAR α AND BREAST CANCER

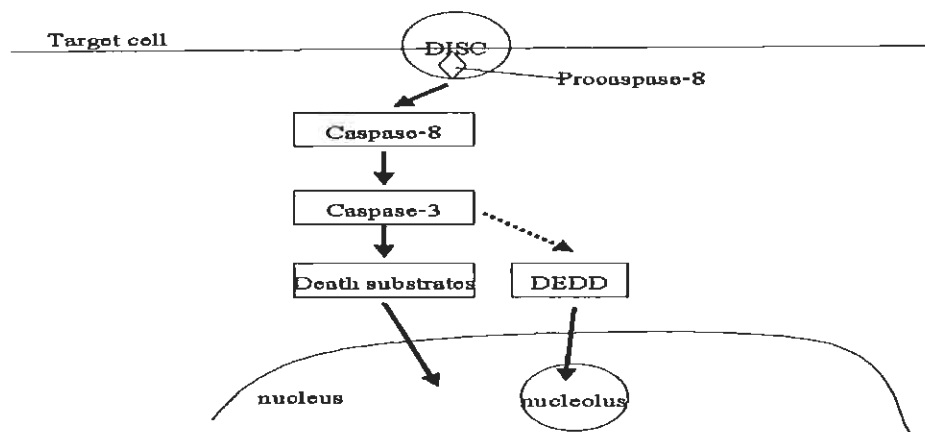
มะเร็งเต้านมจัดเป็นมะเร็งที่เนื้องอกสาเหตุของการเสียชีวิตในหญิงเอเชียเป็นอันดับ 2 รองจากมะเร็งปากมดลูก ในขั้นแรกมีการนำ tamoxifen มาใช้ในการรักษาพบว่าสามารถลดอัตราการตายของผู้ป่วยลงได้อย่างมีนัยสำคัญ ต่อมาได้มีการทดลองนำวิตามินเอและสารอนุพันธ์มาใช้ร่วมในการรักษา (adjuvant therapy) พบว่าช่วยให้ประสิทธิภาพในการรักษามะเร็งชนิดนี้ดีขึ้น จากการศึกษาพบว่า ATRA สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งเต้านมที่ขึ้นอยู่กับฮอร์โมน estrogen (hormone-dependent human breast cancer) ในเซลล์เนื้อเยื่อทดลองได้ (in vitro) ซึ่งพบว่าสัมพันธ์กับ RAR α ^{42,43} แต่ไม่สามารถยับยั้งการโตของเซลล์ที่ไม่พึ่งฮอร์โมน (hormone-independent human breast cancer)⁴⁴ เนื่องจากในเซลล์เหล่านี้มีระดับ RAR α ต่ำ นอกจาก RAR α แล้วยังพบว่ามะเร็งเต้านมสัมพันธ์กับ RAR β ด้วย⁴⁵ ซึ่งพบได้ทั้งเซลล์ที่พึ่งฮอร์โมนและไม่พึ่งฮอร์โมน เมื่อให้ ATRA ในเซลล์เนื้อเยื่อสามารถกระตุ้นให้เกิดการยับยั้งการโตของมะเร็งและชักนำเข้าสู่กระบวนการ apoptosis (programmed cell death) ได้⁴⁶ ส่วนการให้ RA treatment ที่ผ่านทาง RXRs เช่น 9-cis RA จะไปเพิ่มประสิทธิภาพของ RXRs ในการเหนี่ยวนำให้ RAR α ทำงานได้ดีขึ้นและจำนวนเซลล์ตายมากขึ้น⁴³

ในกลไกการทำให้เกิด apoptosis นั้น มีผู้สนใจศึกษาเกี่ยวกับยีน bcl-2⁴⁷ ซึ่งใช้สร้างโปรตีนในกลุ่มของ bcl-2 family โดยโปรตีนในกลุ่มนี้แบ่งเป็นกลุ่ม pro-apoptosis และ anti-apoptosis ซึ่งหากให้ RA treatment เซลล์เนื้อเยื่อที่ได้รับ RA จะไปยับยั้งการทำงานของ Bcl-2 และ Bcl-xl

ซึ่งเป็นโปรตีนในกลุ่ม anti-apoptosis ทำให้ Bax ซึ่งเป็น pro-apoptotic protein ทำงานได้ เกิดการหลั่งสาร cytochrome c จากชั้นในของ mitochondria ออกสู่ cytoplasm ไปจับกับ Apaf 1 protein และเกิดการกระตุ้น caspase cascade ทำให้เกิด apoptosis ในที่สุด^{23, 47} (รูปที่ 8)



รูปที่ 8 ภาพแสดงกลไกการเกิด apoptosis ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยมีขั้นตอนดังนี้ เมื่อเซลล์ได้รับ retinoic acid จะมีการกระตุ้นให้มีการเคลื่อนที่ของ ion เข้าสู่เซลล์ผ่านทางช่อง Bax (homo-oligomeric channels บริเวณผนังของ mitochondria) ซึ่งเป็นผลให้มีการหลั่งสาร cytochrome c จากภายใน mitochondria ออกสู่ภายนอก เพื่อไปจับกับ Apaf-1 (adapter protein) ใน cytoplasm แล้วมีการกระตุ้นลำดับต่างๆ ของ caspase cascade นำไปสู่การตายของเซลล์ในที่สุด นอกจากนี้การที่ Bad ซึ่งเป็น pro-apoptotic protein ไปจับกับ Bcl-2 และ Bcl-xl (anti-apoptotic proteins) จะสามารถป้องกัน Bcl-2 นำ Bcl-xl (anti-apoptotic protein) ไปมีปฏิสัมพันธ์กับ Bax channel ซึ่งทำให้ Bax channel ปิดลง ดังนั้น ion จะไม่สามารถผ่านทางนี้และไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์ (Adapted from Cell Chapter 23: Death and Its Regulation. In: Molecular Cell Biology, 2000:1049)



รูปที่ 9 ภาพแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง procaspase-8 กับกระบวนการเกิด apoptosis. DISC (death-inducing signaling complex) ประกอบด้วย procaspase-8, FADD (Fas associated death-domain-containing protein), CD95 และ CAP3 เมื่อมีการกระตุ้น procaspase-8 จะทำให้ DISC กระตุ้น caspase-8 และ caspase-3 ตามลำดับ แล้วมีการกระตุ้น DEDD (death-effector-domain-containing DNA-binding protein) ในที่สุด ทำให้มีการยับยั้งการถอดรหัสโปรตีนในนิวเคลียส นำไปสู่การตายของเซลล์ในที่สุด (Adapted from Carsten Scaffidi, *Current Opinion in Immunology* 1999; 11: 28)

RAR α AND ACUTE PROMYELOCYTIC LEUKEMIA

Acute promyelocytic leukemia (APL) เกิดจาก reciprocal translocation ระหว่างแขนยาวของโครโมโซมคู่ที่ 15 และ 17 โดยบนโครโมโซมคู่ที่ 17 มี RAR α บรรจุอยู่⁴⁹ หากมี translocation ของ RAR α กับ promyelocytic leukemia (PML) gene ไปยังโครโมโซมคู่ที่ 15 จะทำให้เกิดการแสดงออกของ fusion protein ที่เรียกว่า PML/RAR α ⁴⁹ ซึ่งทำหน้าที่เป็น transcriptional factor ตัวหนึ่งเช่นกัน PML/RAR α นี้จะตอบสนองต่อ ATRA จึงมีการนำ ATRA มาใช้ใน protocol ของการรักษา มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด APL⁴⁹⁻⁵¹ ซึ่งจาก

การศึกษาพบว่าสามารถทำให้เกิด remission ในผู้ป่วยได้ นอกจากใช้ในช่วงของ induction phase แล้ว ยังสามารถใช้ในช่วงของ maintenance phase ได้ด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าการให้ RA treatment ที่กระตุ้น RXR จะทำให้ RAR α ไปรวมกับ RXR เป็น RAR-RXR heterodimer ซึ่งจะเสริมฤทธิ์ของ RAR α ในการกระตุ้น RARE ได้ดีกว่าการให้เพียงตัวใดตัวหนึ่ง โดยจะไปมีผลต่อ phosphorylation ของ Rb protein และทำให้เกิด G₁ arrest ตามมา⁵² นอกจากนี้ยังมีผู้ศึกษากลไกการเกิด apoptosis (programmed cell death) ใน APL อีกด้วย โดยเชื่อว่าสัมพันธ์กับ procaspase 1,7,8 และ 9 RA treatment จะชักนำให้มีการเพิ่ม

ขึ้นของโปรตีน procaspase 1 และ 7 ซึ่งจะสัมพันธ์กับการกระตุ้น procaspase 6, 7 และ 8^{23,50,51} โดย procaspase-8 จะสัมพันธ์อยู่กับ death-inducing signaling complex (DISC) เมื่อให้ RA treatment จะทำให้เกิด autoproteolytic activation เป็น caspase 8 ซึ่งจะหลั่งเข้าสู่ cytoplasm และชักนำเข้าสู่ apoptosis signaling pathway ในที่สุด^{23,50,51,53} (รูปที่ 9)

สรุป

จากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่าวิตามินเอเป็นสารที่มีประโยชน์ต่างๆ มากมายสำหรับมนุษย์ ในแง่การเจริญเติบโตของเซลล์ การพัฒนาของตัวอ่อน การมองเห็น และปัจจุบันได้มีการนำมาใช้รักษาโรคทางผิวหนังต่างๆ มากมาย เช่น ใช้รักษาสิว โรคสะเก็ดเงิน และ photo-aging แต่เรื่องหนึ่งที่น่าสนใจ

และมีการศึกษาทดลองมากมายในขณะนี้ทั้ง in vitro และ in vivo คือ เชื่อว่าวิตามินเอสามารถยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ โดยผ่านทางกลไกต่างๆ จึงมีการทดลองในเซลล์เนื้อเยื่อของมะเร็งชนิดต่างๆ เช่น มะเร็งบริเวณศีรษะและลำคอ มะเร็งปอด มะเร็งเต้านม มะเร็งเม็ดเลือดขาว ดังกล่าวไว้ข้างต้น นอกจากนี้ยังมีผู้สนใจศึกษาในมะเร็งชนิดอื่นๆ อีก เช่น มะเร็งรังไข่ มะเร็งปากมดลูก มะเร็งต่อมลูกหมาก รวมถึงมะเร็งของผิวหนังด้วย ซึ่งอาจจะนำวิตามินเอมาใช้ในรูปของ chemotherapeutic agents หรือ chemopreventive หรือใช้เป็น adjuvant therapy ก็สุดแล้วแต่มะเร็งแต่ละชนิด อย่างไรก็ตามก็พึงระลึกเสมอว่า วิตามินเอมีทั้งคุณและโทษ เมื่อนำมาใช้รักษามะเร็งในมนุษย์ ก็ควรระลึกถึงโทษที่อาจเกิดขึ้นกับผู้ป่วยไว้ด้วย

REFERENCE

1. Singh DK, Lippman SM. Cancer chemoprevention part1: retinoids and carotenoids and other classic antioxidants. anderson cancer center, Houston, Texas, 1998; 12(11): 1643-60.
2. Alan L, Miller ND. Antioxidant flavonoids: structure, function and clinical usage. *Alt Med Rev* 1996;1(2): 103-11.
3. Kastner P, Mark M, Chambon P. Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell* 1995; 83:859-69.
4. Leid.M, Kastner P, Chambon P. Multiphenty generates diversity in the retinoic acid signaling pathways. *Trends Biochem Sci* 1992; 17:427-33.
5. Crowe DL. Retinoic acid receptor β induces terminal differentiation of squamous cell carcinoma lines in the absence of cyclin-dependent kinase inhibitor expression. center for cramo-facial molecular biology. *Cancer Res* 1998; 58:142-48.
6. Sun S, Yue HP, et al. Evidence that retinoic acid receptor β induction by retinoids is important for tumor cell growth inhibition. *J Biol Chem* 2000; 275 (22): 17149-53.
7. Beato M, Herrlich P, Schütz G. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* 1995; 83:851-57.
8. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, et al. Nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 1995; 83:835-39.
9. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1988; 240:889-95.
10. Green S, Chambon P. Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. *TIG* 1988; 4:309-14.
11. Lefebvre B, Rachez C, Formstecher P, et al. Structural determinants of the ligand-

- binding site of the human retinoic acid receptor. *Biochem J* 1995; 34:5477-85.
12. Tate BF, Allenby G, Janocha R, et al. Distinct binding determinants for 9-cis-retinoic acid are located within AF-2 of retinoic acid receptor. *Mol Cell Biol* 1994; 14:2323-30.
13. Perlmann T, Umesono K, Rangarajan PN, et al. Two distinct dimerization interfaces differentially modulate target gene specificity of nuclear hormone receptors. *Mol Endocrinol* 1996; 10:858-966.
14. Felsenfeld G. Chromatin as an essential part of the transcriptional mechanism. *Nature* 1992; 55:219-24.
15. Baniahmad A, Ha I, Reinberg D, et al. Interaction of human thyroid hormone receptor with transcription factor TFIIIB may mediate target gene derepression and activation by thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:8832-36.
16. Barettoni D, Vivanco Ruiz MM, Stunnenberg HG. Characterization of the ligand-dependent transactivation domain of the thyroid hormone receptor. *EMBO J* 1994; 13:3039-49.
17. Danielian PS, White R, Lees JA, et al. Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *EMBO J* 1992; 11:1025-33.
18. Durand B, Saunders M, Gaudon C, et al. Activation function 2 (AF-2) of retinoic acid receptor and 9-cis-retinoic acid receptor: presence of a conserved autonomous constitutive activating domain and influence of the nature of the response element on AF-2 activity. *EMBO J* 1994; 13:5370-82.
19. Liao J, Ozono K, Sone T, et al. Vitamin D receptor interaction with specific DNA requires a nuclear protein and 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:9751-55.
20. Saatcioglu F, Bartunek P, Deng T, et al. A conserved C-terminal sequence that is deleted in v-ErbA (the thyroid hormone receptor). *Mol Cell Biol* 1993; 13:3675-3685.
21. Folkers GE, Van der Burg B, Van der Saag PT. A role for cofactors in synergistic and cell-specific activation by retinoic acid receptors and retinoid X receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1996; 56: 119-129.
22. Lee Y, Mahdavi V. The D domain of the thyroid hormone receptor 1 specifies positive and negative transcriptional regulation functions. *J Biol Chem* 1993; 268:2021-28.
23. Lodish H, Berk A, Zipursky L, et al. Darnell. The textbook of Molecular Cell Biology 4thed. W.H. Freeman and company, 2000.
24. Beers MH, Berkow R. Vitamin deficiency, dependency, and toxicity In: the textbook of the Merck Manual of Diagnosis and Therapy 17thed. Beers. 1999; 33-35.
25. Russell RM. The vitamin A spectrum: from deficiency to toxicity. *Am J Clin Nutr* 2000; 71(4): 878-84.
26. Russell RM, Boy JL, Bangheri S, et al. Hepatic toxicity from chronic hypervitaminosis. A unique morphologic lesion resulting in portal hypertension and ascities. *N Engl J Med* 1974; 291: 435-440.
27. Hu L, Crowe DL, Rheinwald JG, et al. Abnormal expression of retinoic acid receptor and keratin19 in human oral and epidermal Squamous cell carcinoma lines. *Cancer Res* 1991; 51:3971-81.
28. Ellis JK, Russell RM, Markrauer FL, et al. Increased risk of vitamin A toxicity in severe hypertriglyceridemia. *Ann Intern Med* 1986; 105: 877-79.
29. Carpenter TO, Pettifor JM, Russell RM, et al. Severe hypervitaminosis A in siblings: evidence of variable tolerance to retinol intake. *J Pediatr* 1987; 111: 507-12.
30. Krasinski SD, Cohn JS, Schaefer EJ, et al. Postprandial plasma retinylester response is greater in older subjects compared with younger subjects. *J Clin Invest* 1990; 85: 883-92.
31. Cohlman SQ. Excessive intake of vitamin A as a cause of congenital anomalies in the rat. *Science* 1953; 117:535-36.
32. Cohlman SQ. Congenital abnormalities in the rat produced by excessive intake of vitamin A during pregnancy. *Pediatrics* 1954; 13:556-67.
33. Geelen JAG. Hypervitaminosis A induced teratogenesis. *CRC Crit Rev Toxicol.* 1979; 6:351-75.
34. Briefel R, Caggiula AW, Kuller LH. A comparison of three dietary methods for estimating vitamin A intake. *Am J Epidemiol* 1985; 122: 628-36.
35. Liss AR. INC. Teratology Society Position Paper. Recommendations for vitamin A use during pregnancy. *Teratology* 1987; 35:269-75.
36. Spinella MJ, Freemantle SJ, David Sekula, et al. Retinoic acid promotes ubiquitination and proteolysis of cyclinD1

- during induced tumor cell differentiation. *J Biol Chem* 1999; 274(31): 22013-18.
37. Dawson M, Hobbs P, Jong L, et al. Tobacco-related cancer prevention by vitamin A derivatives in: TRDRD 1999 Annual reports cancer abstract. Molecular Medicine Research Institute, 1997.
 38. Zhang, Xiao-Kun. Does nicotine inhibit anticancer activities of vitamin A? *Newsletter of Burnham Institute*, 2000.
 39. Toulouse A, Morin J, Dion PA, et al. RARbeta2 specificity in mediating RA inhibition of growth of lung cancer-derived cells. *Lung Cancer* 2000; 28: 127-37.
 40. Stern P. A mechanism responsible for turning off a tumor-suppressing gene in many lung cancers. *J Natl Cancer* 2000; 92:1303-1307.
 41. Rizvi NA, Eisenberg PD, Reich SD, A retinoid X receptor (RXR) agonist, as maintenance therapy for patients treated with chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). ASCO online, *Am Clin Oncol*, 2000.
 42. Mills N. Retinoids and their receptors in inhibition of breast cancer. Bulletin of New York University, 1999.
 43. Zhang X. Breast Cancer Chemo-prevention by Retinoids. Bulletin of Burnham Institute, 2000.
 44. Van der Leede BM, Van den Brink CE, Pijnappel W, et al. Autoinduction of retinoic acid-sensitive, but not in retinoic acid-resistant human breast cancer cells. *J Biol Chem* 1997; 272(29): 17921-28.
 45. Lm Y, Lee MO, Wang HG, et al. Retinoic acid receptor β mediated the growth inhibitory effect of retinoic acid by promoting apoptosis in human breast cancer cells. *Mol Cell Biol* 1996; 10:1138-1149.
 46. Danforth, David N. Hormonal regulation of normal mammary and breast cancer cell growth, metabolism, and apoptosis. Newsletter of Anderson Cancer Center, Houston, Texas, 2000.
 47. Frankel SR, Eardley A, Heller G, et al. All-trans retinoic acid for acute promyelocytic leukemia. *Ann Intern Med* 1994; 120:278-286.
 48. Slack JL. The biology and treatment of acute promyelocytic leukemia. *Curr Opin Oncol* 1999; 11: 9-13.
 49. Gharamzadeh A, Jahani M, Iravani M, et al. All-trans retinoic acid and intensive chemotherapy in acute promyelocytic leukemia. Bulletin of Hematology, Oncology, and Bone Marrow Transplantation Research Center, 2000.
 50. Gianni M, Ponzanelli I, Mologni L, et al. Retinoid-dependent growth inhibition, differentiation and apoptosis in acute promyelocytic leukemia cells, Expression and activation of caspases. *Cell Death Differ* 2000; 7(5): 447-460.
 51. Tenna T, Botling J, Obers F, et al. The role of RAR and RXR activation in retinoid-induced tissue factor suppression. *Leukemia* 2000; 14:1105-11.
 52. Scaffidi C, Kirchhoff S, Krammer PH, et al. Apoptosis signaling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 1999; 11:277-285.
 53. Liss AR. Recommendations for Vitamin A use during pregnancy. *Teratology* 1987; 35:269-75.