

维生素 D₃ 对三角帆蚌外套膜细胞内 Ca²⁺ 浓度的影响

郝莹莹 施志仪* 李文娟 靳雨丽

上海海洋大学 农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室 上海 201306

摘要: 采用胰酶消化法获得三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)外套膜细胞,用 Fluo-3/AM 荧光标记技术和激光共聚焦扫描显微镜(confocal laser scanning microscope, CLSM)检测外套膜内外表皮细胞在静息状态下细胞的游离 Ca²⁺ 浓度及不同浓度维生素 D₃ (VD₃) 孵育后的外套膜细胞的 Ca²⁺ 的动态情况。结果表明,未添加 VD₃ (1.25 mmol/L Ca²⁺) 时,外套膜外表皮细胞的 Ca²⁺ 荧光强度显著高于内表皮细胞内的 Ca²⁺ ($P < 0.05$)。在添加不同浓度 VD₃ 后,内表皮细胞与外表皮细胞内 Ca²⁺ 浓度变化趋势一致,表现为细胞内 Ca²⁺ 沉积量的变化是随着 VD₃ 浓度的增大而增大,其中,对照组与添加 50 IU/L 组差异不显著 ($P > 0.05$); 当添加浓度为 100 IU/L 时,与对照组和 50 IU/L 组差异显著 ($P < 0.05$); 当添加组浓度达到 500 IU/L 时,与前 3 组有显著差异 ($P < 0.05$); 当添加的浓度增大到 1 000 IU/L 后与 500 IU/L 组差异不显著 ($P > 0.05$),但与其他组均存在显著差异 ($P < 0.05$)。本实验为外套膜细胞的钙代谢机制研究提供了实验依据。

关键词: 三角帆蚌; 外套膜细胞 Ca²⁺ 浓度; 维生素 D₃ (VD₃); 激光共聚焦扫描显微镜

中图分类号: Q291, Q756 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2011)03-98-06

Effect of VD₃ on Intracellular Calcium Ion Concentration in Mantle Cells of *Hyriopsis cumingii*: An *in Vitro* Study

HAO Ying-Ying SHI Zhi-Yi* LI Wen-Juan JIN Yu-Li

Key Laboratory of Aquatic Genetic Researches and Aquaculture Ecology Certificated by the Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: The mantle cells from *Hyriopsis cumingii* were obtained by using trypsin digestion. The Ca²⁺ concentrations in inner mantle cells and outer mantle cells under the resting condition and the dynamics of Ca²⁺ concentration in the mantle cells incubated with various concentrations of VD₃ were measured by Fluo-3/AM fluorescent labeling and CLSM. The results showed that the average Ca²⁺ fluorescence intensity of outer mantle cells was significantly higher than that of inner mantle cells ($P < 0.05$). After adding different concentrations of VD₃, the average Ca²⁺ fluorescence intensity was enhanced with the increased concentration of VD₃ in culture medium, and inner mantle cells and outer mantle cells showed the same change. The difference between the control and 50 IU/L VD₃ groups, or between 500 IU/L and 1 000 IU/L groups was not significant ($P > 0.05$),

基金项目 上海市科委基础重大项目 (No. 06aj14003), 上海市重点学科水生生物学建设项目 (No. S30701), 上海市博士后科研资助计划面上项目 (No. 09R21413200);

* 通讯作者, E-mail: zyshi@shou.edu.cn;

第一作者介绍 郝莹莹, 女, 硕士研究生; 研究方向: 水生动物细胞分子生物技术; E-mail: reasonfly2003@yahoo.com.cn.

收稿日期: 2010-11-30, 修回日期: 2011-03-04

but the difference between the control and another three groups (100 IU/L, 500 IU/L and 1 000 IU/L), or between the 50 IU/L group and another three groups (100 IU/L, 500 IU/L and 1 000 IU/L) was significant ($P < 0.05$). The present research may provide theoretical basis for promoting the pearl industry.

Key words: *Hyriopsis cumingii*; Intracellular Ca²⁺ concentration of mantle; VD₃; Confocal laser scanning microscope

三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*) 是中国特有淡水贝类,也是我国主要的淡水育珠贝类。它形成的珍珠具有珠质光滑细腻、色泽鲜艳等优点,是淡水蚌中育珠品种的最佳者^[1]。三角帆蚌的外套膜是贝壳和珍珠形成的重要组织器官,由内外两层表皮细胞及其间的结缔组织构成,由它们分泌大量的钙质与有机基质共同沉积而形成珍珠。因此探索三角帆蚌外套膜的内、外表皮细胞 Ca²⁺ 的分布以及 Ca²⁺ 的囤积,对进一步阐明贝壳以及珍珠形成机理,提高优质珠的产量有着重要意义。

钙既是珍珠和贝壳中的主要组成成分,又是普遍存在的细胞内第二信使,因此贝体内 Ca²⁺ 的跨膜转运对珍珠的形成和贝壳的生长都非常重要。Neff^[2] 在贝类外套膜细胞上发现 Ca²⁺ 可结合在某种结合蛋白质上,通过胞饮或胞吐作用出入细胞。维生素 D₃ (VD₃) 作为促进 Ca²⁺ 吸收和沉积的重要因子在高等生物中得到了广泛重视。VD₃ 能极大地增加钙的运转,对钙吸收起着重要作用^[3]。对贝类的研究也表明,适量 VD₃ 能够促进矿物质在贝壳中的沉积^[4],加快了钙的沉积,可促进贝壳和珍珠更快生长。

激光共聚焦扫描显微镜 (confocal laser scanning microscope, CLSM) 技术结合新一代荧光染料的使用,已广泛应用于精确分析活细胞内 Ca²⁺ 的动态变化。它的一个显著优点是可以对同一样品平面随时间进行连续扫描,进而分析细胞结构或细胞内离子含量的动态变化^[5]。细胞内荧光强度的改变灵敏地反映细胞内游离 Ca²⁺ 浓度的变化,可连续动态监测 Ca²⁺ 浓度的变化^[6-7]。本研究运用 CLSM 技术,以 Fluo-3/AM 荧光探针,观察在不同浓度 VD₃ 培养条件下三角帆蚌外套膜内、外表皮细

胞内 Ca²⁺ 的分布以及囤积情况,以期三角帆蚌 Ca²⁺ 代谢分子调控机制的研究提供资料,也为今后提高珍珠培育技术提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 实验用蚌由浙江诸暨市珍珠养殖基地提供,为 2 龄的活力较强的三角帆蚌,蚌体长宽高为 11 cm × 8 cm × 3 cm,暂养在小型玻璃水族缸 (40 cm × 30 cm × 20 cm) 中。所有实验蚌暂养于曝气的自来水中,其水中含钙量调节约为 1.25 mmol/L^[8]。

1.1.2 主要试剂、仪器 维生素 D₃ (VD₃) 购于上海生工生物工程有限公司,用二甲基亚砷 (Gibco, USA) 溶解为 40 000 IU/L 的储液以作孵育液。多聚赖氨酸 (分子量 > 100 000, Invitrogen) 和 Fluo-3/AM、Pluronic F-127 (Sigma, USA) 用二甲基亚砷分别配成 1 mmol/L 和 25 mg/L 的储液,分装后放置于 -20℃ 保存。胰蛋白酶、抗生素 (青霉素、链霉素均为 10 000 IU/ml)、RPML 1640 培养基、胎牛血清 (FBS) 均购置于 Gibco 公司 (USA)。

恒温细胞培养箱 (REVCO, 美国), 倒置显微镜 (Olympus, 日本), 共聚焦图像分析仪 (Leica TCS SP5 显微系统, 德国), 超净工作台 (苏州净化设备厂)。

1.2 实验方法

1.2.1 外套膜细胞培养 取 3 只活力较强的三角帆蚌,用手术刀断其前后闭壳肌,采用撕膜法^[9] 分别获得其外套膜的内、外表皮,去除色线及裙带部分^[10],所有组织在净化处理后于无菌室内进行细胞培养之用。在超净工作台中,依次用含有 3 个浓度梯度的双抗 (青霉素 + 链霉素) PBS 冲洗,这 3 个浓度梯度依次为:不添

加双抗的 PBS, 含有 200 IU/ml 双抗的 PBS, 含 1 000 IU/ml 双抗的 PBS。然后将外套膜内、外表皮组织剪成 1 mm² 的小片, 浸没于 0.25% 的胰酶(含有 0.02% EDTA) 中 37℃ 消化 40 ~ 50 min, 再用高于等体积两倍的含有胎牛血清的培养基终止胰酶反应, 取悬液以 1 500 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 沉淀物再悬浮于 PBS 溶液中, 并离心、洗涤细胞, 重复操作 3 次, 然后用 2 ml RPML 1640 全培养基(含 20% FBS、200 IU/ml 双抗^[11]) 悬浮细胞。用血球计数板对细胞悬液进行计数, 调整细胞数为(5 × 10⁵) ~ (1 × 10⁶) 个/ml, 移入培养瓶置于 26℃ CO₂ 恒温细胞培养箱培养。

1.2.2 外套膜细胞 Fluo-3/AM 荧光探针负载

细胞培养 12 h 后, 分别收集细胞培养液, 1 200 r/min 离心 10 min 收集细胞, 用无血清培养基 RPML 1640 重新悬浮细胞, 取 0.5 ml 细胞重悬液分别接种于预先用多聚赖氨酸处理的共聚焦专用培养皿中央。将细胞分别置于 30 个共聚焦培养皿, 其中内外表皮各 15 个共聚焦培养皿(每个浓度 3 个重复), 然后置于 26℃ CO₂ 恒温细胞培养箱培养 4 h, 使细胞贴敷于皿底。然后弃去培养液, 采用 0、50、100、500、1 000 IU/L VD₃ 的测试液(其中含 8 μmol/L 的 Fluo-3/AM、2% 的 F-127、1.25 mmol/L Ca²⁺) 分别孵育外套膜内外表皮细胞, 37℃ 预孵 1 h。取出培养皿, 用无血清培养基 RPML 1640 清洗一遍, 洗去未进入细胞内的 Fluo-3/AM, 用于 Ca²⁺ 荧光强度观测。

1.2.3 细胞内 Ca²⁺ 监测

激光共聚焦显微镜可测灰度值变化范围在 0 ~ 255, 若超出此范围则不能正常工作, 所以此时要调整荧光强度, 以能够明确分辨细胞为准^[5], 测定时温度为 26℃。在 20 倍的物镜下动态观察 Fluo-3/AM 指示 Ca²⁺ 的变化。待测样品置于激光共聚焦显微镜的载物台上, 聚焦到所需的细胞上, 在 488 nm 激发波长下检测绿色荧光, 设置在 XYt 方式下进行扫描。检测条件设定为: 激发波长 488 nm, 发射波长 525 nm, 采样频率 488 Hz, 记录时长 5 min, 扫描 20 次预览选取的画面后启

动时间程序按钮, 计算机自动记录图像, 记录数个细胞在静息状态下细胞内 Ca²⁺ 含量变化的荧光图像, 同时应用荧光强度分析软件对图像中不同区域的细胞内荧光强度以及亚细胞区域的荧光强度^[12-13] 进行分析。

1.3 图像数据分析与统计

图像分析时选荧光强度最强的层面作为计算标准, 基础荧光像素值定为 1, 每个培养皿取 10 个细胞计算其平均值作为每个样本的 Ca²⁺ 荧光像素值, 一个培养条件 3 个培养皿重复, 并计算出每组蚌的外套膜细胞内 Ca²⁺ 荧光像素平均值。

所有数据采用 SAS 软件 GLM 程序的单因子方差分析(SAS 6.12, 1996), 数值表示为均值和 SE, 不同组间显著性分析采用 Duncan 多重比较及 *t*-test, 显著水平为 *P* < 0.05。

2 结果

图 1 为外套膜外表皮细胞经过 4 h 培养稳定后, 经 Fluo-3/AM 负载, Fluo-3/AM 跨过细胞膜后被胞内酯酶水解, 与细胞内 Ca²⁺ 结合在 488 nm 激发光下发射荧光, 细胞荧光强度均可达到较高水平, 在荧光显微镜下可以看到负载后的细胞胞体发出绿色荧光。然后用无血清培养基洗涤, 放置共聚焦显微镜下观察发现细胞形态完整, 活性较好, 细胞呈圆形(图 1)。

各浓度组的细胞荧光强度的变化, 即细胞内 Ca²⁺ 沉积量的变化是随着 VD₃ 浓度的增大而发生了变化。如图 2 所示: 1 ~ 5 是外套膜内表皮细胞, 6 ~ 10 是外套膜外表皮细胞, 其中 1、6 为对照组。两对照组的细胞内 Ca²⁺ 荧光强度无明显差异, 都有微弱的荧光强度, 说明细胞内 Ca²⁺ 浓度相对较低。随着 VD₃ 的浓度增大, 荧光强度逐渐增强。其中, 内表皮细胞内部荧光颗粒分布不均匀, 随着测试液中 VD₃ 浓度增加刺激后细胞内荧光强度随时间延长明显升高, 亮度也是局部较亮, 经添加浓度 1 000 IU/L VD₃ 后达最高峰, 直至整个细胞内部荧光强度达到基本均一, Ca²⁺ 沉积量也随之增多, 并且持续保持明显高于对照组的荧光强度(*P* < 0.05)。外表皮的荧光强度变化也是如此, 不

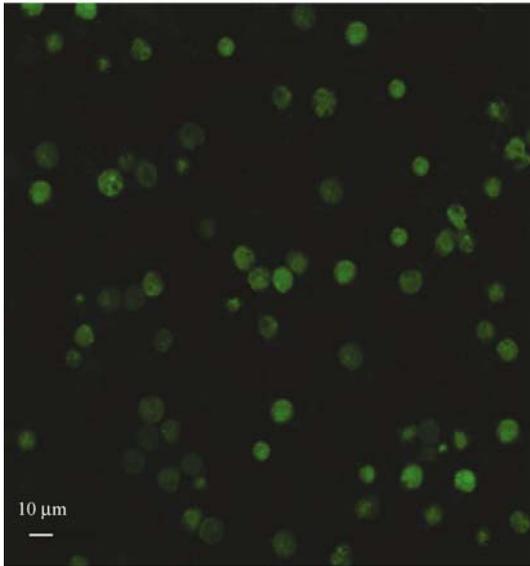


图 1 共聚焦显微镜对三角帆蚌外套膜细胞内 Ca²⁺ 浓度监控

Fig. 1 Intracellular Ca²⁺ concentration in mantle cells from *Hyriopsis cumingii* was monitored by confocal laser scanning microscopy

同的是外套膜内表皮的细胞较小且内部荧光强

度变化不均,亮度不一,而外套膜外表皮细胞内部荧光强度变化均匀,亮度均一。

三角帆蚌内、外表皮细胞 Ca²⁺ 浓度水平测定数据显示,在 1.25 mmol/L Ca²⁺ 水平下,即不添加 VD₃ 的正常养殖条件下,蚌外套膜内、外表皮细胞内 Ca²⁺ 的含量存在显著差异,外套膜外表皮细胞内 Ca²⁺ 荧光强度显著高于内表皮细胞内的 Ca²⁺,即内、外表皮细胞内沉积的 Ca²⁺ 浓度差异较显著 ($P < 0.05$)。其中内表皮荧光信号平均值为 20.23 ± 0.45 ,外表皮信号平均值为 37.65 ± 1.73 。

图 3 是蚌的外套膜外表皮和内表皮细胞添加 VD₃ 后的荧光变化情况,实验结果表明,随着 VD₃ 浓度的增大,外套膜内、外表皮荧光强度都明显增加,且增加趋势相同,对照组荧光强度最弱。随着测试液中添加 VD₃,胞内 Fluo-3/AM 的荧光强度逐渐增强,其中对照组与添加 50 IU/L 组差异不显著 ($P > 0.05$);当添加浓度为 100 IU/L 时,胞内 Fluo-3/AM 的荧光强度与对照组和 50 IU/L 组相比差异显著 ($P <$

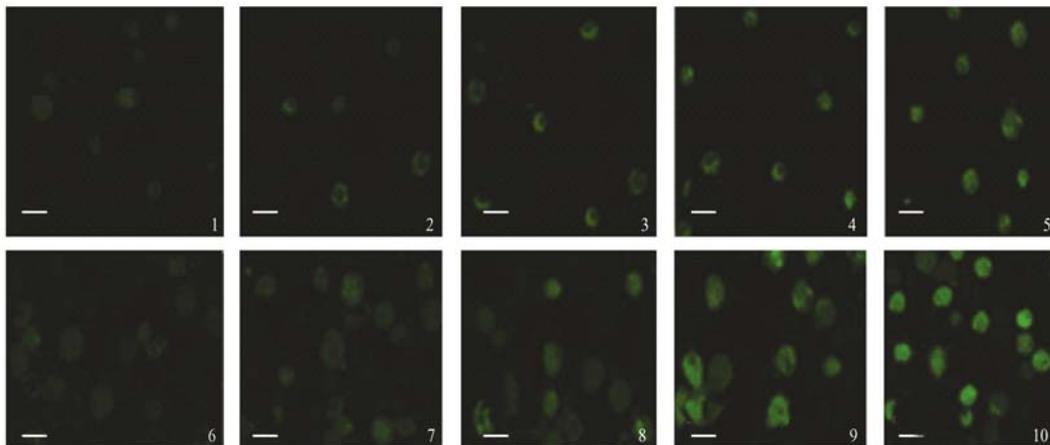


图 2 三角帆蚌外套膜内、外表皮细胞在添加不同浓度 VD₃ 时细胞内 Ca²⁺ 荧光变化

Fig. 2 The change of Ca²⁺ fluorescence intensity in outer and inner cells of mantle from *Hyriopsis cumingii* after adding different concentrations of VD₃

1~5. 三角帆蚌外套膜内表皮细胞; 6~10. 外套膜外表皮细胞。1、6. 对照组; 2、7. 50 IU/L VD₃ 组; 3、8. 100 IU/L 组; 4、9. 500 IU/L 组; 5、10. 1 000 IU/L 组。标尺 = 10 μm

The pictures 1-5 are inner cells of mantle from *Hyriopsis cumingii* and 6-10 are outer cells of mantle. The picture 1, 6 are control; 2, 7 are the group with 50 IU/L VD₃; 3, 8 are the group with 100 IU/L VD₃; 4, 9 are the group with 500 IU/L VD₃; 5, 10 are the group with 1 000 IU/L VD₃. Bar = 10 μm

0.05);当添加组浓度达到 500 IU/L 时细胞内荧光信号更强,与前 3 组有显著差异 ($P < 0.05$);当添加的浓度增大到 1 000 IU/L 后,与

500 IU/L 组差异不显著 ($P > 0.05$),但与其他组间均存在显著差异 ($P < 0.05$)。

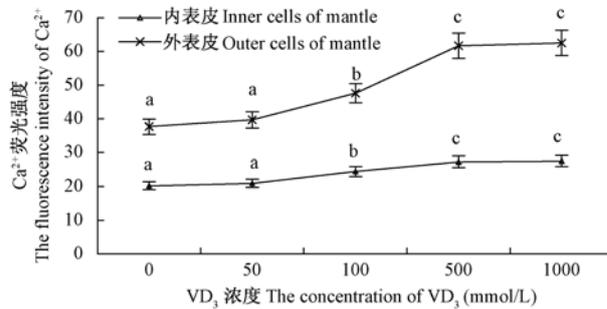


图3 三角帆蚌外套膜内、外表皮添加 VD₃ 后的平均荧光强度的变化

Fig. 3 The change of Ca²⁺ fluorescence intensity in inner and outer cells of mantle from *Hyriopsis cumingii* after adding different concentrations of VD₃

不同字母间表示差异显著, $P < 0.05$ 。Different letters mean significant difference, $P < 0.05$.

3 讨论

Fluo-3/AM 作为第 3 代荧光指示剂,是惟一在可见光区有激发峰的荧光剂,可以避免紫外光对细胞的损害和激发自发荧光倾向,在其他指示剂不能测量的情况下进行测量^[14],它与 Ca²⁺ 结合后荧光强度增加 40 倍,加之有激光共聚焦扫描技术配合,使细胞内甚至细胞器内 Ca²⁺ 的空间和时间变化的测定更加完善^[15]。随着高灵敏度探针 Fluo-3/AM 和激光扫描共聚焦显微镜的运用,为胞内 Ca²⁺ 的实时动态观察提供了可靠手段,并且 Fluo-3/AM 是将整个细胞内的 Ca²⁺ 都进行了染色,不论是内表皮还是外表皮,细胞内 Ca²⁺ 的荧光强度也是随着 VD₃ 浓度的增大而整体增强。本实验室采用非损伤微电极技术对胞外测定 Ca²⁺ 流量进行研究,发现随着 VD₃ 的浓度增加,大量的 Ca²⁺ 涌进了细胞内,并呈递增趋势^[16],说明细胞内 Ca²⁺ 的荧光强度增强确实是由水质中 Ca²⁺ 大量涌入细胞内造成的。

蚌的外套膜外表皮细胞具有旺盛的钙质吸收和分泌活动^[17],其中,内表皮分泌活动表现为持续性和连续性特点,外表皮分泌活动呈节律性和区段性特点。石安静等^[18]研究了三角

帆蚌及椭圆背角无齿蚌 (*Anodonta woodiana elliptica*) 外套膜分泌的珍珠质的性质,发现外套膜的内、外表皮都具有分泌和吸收功能,并指出表皮间的结缔组织也可能参与了贝壳、珍珠或其前体物的合成。本研究结果显示,外套膜内表皮细胞内 Ca²⁺ 荧光强度要比外表皮细胞内 Ca²⁺ 荧光强度低,说明外表皮细胞内的 Ca²⁺ 沉积量多于内表皮细胞内的 Ca²⁺,这反映出它们在功能上的差异。前人研究证明外套膜外表皮主要作为 Ca²⁺ 贮存的组织,而内表皮主要是 Ca²⁺ 吸收和转运的组织^[19],因此,外表皮细胞 Ca²⁺ 贮存量应多于内表皮细胞,本实验结果也证明了这点。

在河蚌育珠的生产过程中, Ca²⁺ 的吸收和转运对于珍珠的产量和质量提高起着重要作用,加快 Ca²⁺ 在珍珠囊中的沉积是促进珍珠快速生长的重要手段^[20]。VD₃ 对机体内 Ca²⁺ 代谢起着重要的调节作用^[21-23],尤其对 Ca²⁺ 的动态平衡是一个重要的调节因子。有研究表明,VD₃ 能增加一些细胞 Ca²⁺ 受体的 mRNA 表达,可加强这些细胞对细胞外的 Ca²⁺ 的反应,引起细胞内的 Ca²⁺ 的增加^[24],丛玉艳等^[25]研究也表明,VD₃ 通过加速对钙的吸收,进而促进钙的沉积。从本研究结果数据显示,不论是外

套膜的外表皮还是内表皮细胞内的 Ca²⁺ 沉积都是随着细胞外 VD₃ 浓度的增大而增加,荧光强度显著增强,所以更加证实 VD₃ 具有促进 Ca²⁺ 沉积的作用。在对河蚌的育珠研究中,张根芳^[26] 提出外套膜表皮细胞对 VD₃ 及其代谢产物都很敏感,把此甾体激素注射到外套膜溶液中,钙的浓度从 10 mg/L,升高至 40 mg/L,因此认为 VD₃ 可以增大通道蛋白的通透性,使大量的 Ca²⁺ 流入细胞内。

参 考 文 献

- [1] 刘月英, 张文珍, 王跃先, 等. 中国经济动物志 淡水软体动物. 北京: 科学出版社, 1979.
- [2] Neff J M. Ultrastructural studies of periostrum formation in the hard shelled clam *Mercenaria mercenaria* (L.). *Tissue & Cell*, 1972, 4: 311 - 326.
- [3] 徐肇敏, Wood R J. 维生素 D 和氟美松对钙运转作用的实验研究. *中国内科杂志*, 1994, 33(10): 698.
- [4] 周歧存, 麦康森. 皱纹盘鲍维生素 D 营养需要的研究. *水产学报*, 2004, 28(2): 155 - 160.
- [5] 武美娜, 李新毅, 白玮, 等. 激光共聚焦扫描显微镜技术在大鼠皮层神经元细胞内钙离子浓度动态测定中的应用. *中国药物与临床*, 2008, 8(7): 530 - 532.
- [6] Hideaki L, Hiroshi O, Masatoshi H, et al. Calcium movements, distribution and functions in the smooth muscle. *Pharmacol Rev*, 1997, 49: 157 - 230.
- [7] 王海燕, 何韶衡, 林珏龙. 激光扫描共聚焦显微镜观察胰蛋白酶对肺上皮细胞游离钙离子的影响. *激光生物学报*, 2004, 14: 377 - 379.
- [8] 张根芳, 吴信忠, 李家乐. 三角帆蚌病害及防治技术研究进展. *上海水产大学学报*, 2005, 14(3): 313 - 318.
- [9] 何福林, 向建国. 无核珍珠培育的手术技术. *河北渔业*, 2005, 3: 27 - 33.
- [10] 刘绍龙, 石安静. 育珠蚌外套膜组织培养适宜条件的研究. *四川大学学报: 自然科学版*, 1993, 30(1): 107 - 114.
- [11] Kang M S, Oh M J, Kim Y J, et al. Establishment and characterization of two new cell lines derived from flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel). *Journal of Fish Diseases*, 2003, 26: 657 - 665.
- [12] Zhang T C, Cao E H, Qin J F. A laser scanning confocal microscopy method. Simultaneous detection of intracellular Ca²⁺ and apoptosis using Fluo-3 and Hoechst 33342. *Anal Quant Cytol Histol*, 2000, 22(2): 93 - 97.
- [13] 洪方晓, 岳红丽, 田鸣, 等. 丙泊酚对肺动脉平滑肌细胞跨膜钙离子移动影响的实验研究. *北京医学*, 2008, 30(8): 537 - 539.
- [14] Merritt J E, McCarthy S A, Davies M P A et al. Use of fluo-3 to measure cytosolic Ca²⁺ in platelets and neutrophils. Loading cells with the dye, calibration of traces, measurements in the presence of plasma, and buffering of cytosolic Ca²⁺. *Biochem J*, 1990, 269: 513 - 519.
- [15] 张旻, 王美青, 王景杰. 维生素 D₃ 刺激裸突软骨细胞内钙释放及机械压力对其影响的研究. *华西口腔医学杂志*, 2004, 22(1): 69 - 72.
- [16] 施志仪, 郝莹莹, 李文娟, 等. 三种不同因子对三角帆蚌外套膜细胞 Ca²⁺ 流动性的影响. *中国细胞生物学学报*, 2010, 32(5): 749 - 753.
- [17] 唐敏, 石安静. 圆背角无齿蚌离体培养的外套膜组织钙代谢. *水生生物学报*, 2000, 24(1): 86 - 89.
- [18] 石安静, 王喜忠, 张洪渊. 淡水育珠蚌体外培养外套膜细胞分泌的珍珠质的性质研究. *动物学报*, 1994, 40(2): 191 - 197.
- [19] 唐敏, 石安静. 贝类钙代谢研究概况. *水产学报*, 2000, 24(1): 86 - 91.
- [20] 钱伟平, 林国星, 许梓荣. Ca²⁺ 在三角帆蚌体内沉积效应的研究. *水利渔业*, 2005, 25(1): 6 - 9.
- [21] Hoenderop J G, Muller D, vander Kemp A W, et al. Calcitriol controls the epithelial calcium channel in kidney. *Am Soc Nephrol*, 2001, 12: 1342 - 1349.
- [22] Fleet J C, Eksir F, Hance K W, et al. Vitamin D inducible calcium transport and gene expression in three Caco cell lines. *Am J Physiol*, 2002, 283: G618 - G625.
- [23] 那键. 雌激素、维生素 D₃ 对雌性大鼠成骨细胞增殖及钙通道 TRPV5/TRPV6 表达的影响. 长春: 吉林大学博士学位论文, 2009.
- [24] Ratnam A V, Bikle D D, Cho J K. 1, 25 dihydroxy vitamin D₃ enhances the calcium response of keratinocytes. *J Cell Physiol*, 1999, 178(2): 161 - 171.
- [25] 丛玉艳, 边连全, 殷泽洋, 等. 补饲维生素 D₃ 对育肥猪血钙与肌肉钙含量的影响. *中国饲料*, 2009, (6): 29 - 31.
- [26] 张根芳. 河蚌育珠学. 北京: 中国农业出版社, 2005: 74 - 79.