

维生素 D 受体检测方法的研究进展

李游山 祁珊珊 王永吉*

陕西理工学院维生素 D 生理与应用研究所, 陕西 汉中 723001

中图分类号: R589.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2015) 11-1402-05

摘要: 维生素 D 不仅能够调节钙磷代谢, 影响骨的生长, 还能调节机体的免疫活性和细胞生长与分化。维生素 D 的功能是通过激活细胞核内的维生素 D 受体(vitamin D receptor, VDR)来实现的, 因此, VDR 是靶细胞响应维生素 D 反应的决定因素。VDR 高表达的组织, 如肠、肾脏、骨和甲状旁腺等, 是维生素 D 的主要靶组织。过去 40 年中, 为了测定 VDR 在机体各个组织中的分布, 建立了多种检测方法。然而, 这些测定方法的应用也产生了一些具有争议的结果, 这可能是由检测方法的特异性不同导致的。近年来, 本研究团队建立了一套特异性强、灵敏性高的免疫测定方法, 并将其成功应用于测定组织中 VDR。本文将对这些检测方法的优点和各自的局限性进行讨论, 并指出测定方法的选择是成功鉴定靶组织中 VDR 的关键。

关键词: 维生素 D 受体; 钙磷代谢; 检测方法; 免疫组织化学

Research progress in the vitamin D receptor assays

LI Youshan, QI Shanshan, WANG Yongji

Vitamin D Research Institute, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723001, Shaanxi, China

Corresponding author: WANG Yongji, Email: yjwang2000@sina.com

Abstract: The major biological function of vitamin D is to regulate the metabolism of calcium and phosphate, and to modulate immune activity and cellular proliferation and differentiation. It is believed that vitamin D acts through binding to its nuclear receptor, vitamin D receptor (VDR). Therefore, the receptor is a determinant for a cell to respond to the vitamin D. The tissues containing high levels of VDR, such as intestine, kidney, bone and parathyroid, are known as the main targets of vitamin D. In the past 4 decades, several assays have been established for determining VDR in various tissues. However, the application of these methods also results in controversial results perhaps due to the varied specificity of each assay. We have recently established highly specific and sensitive immunoassays, which have been successfully used to determine VDR in the selected tissues. In this review, we discuss advantages and limitations of each assay and point out that the assay selection may be a key for the success in finding the receptor in target tissues.

Key words: Vitamin D receptor; Calcium and phosphorus metabolism; Detection method; Immunohistochemistry

维生素 D 在维持机体钙、磷代谢平衡, 调节骨的形成、机体免疫活性、细胞增殖和分化等方面起重要作用^[1]。维生素 D 受体(vitamin D receptor, VDR)是类固醇激素受体超家族的成员, 其本质上是一种配体依赖的转录调控因子^[2-6]。维生素 D₃ 的活性形式 1 α , 25(OH)₂D₃ 与 VDR 结合后, 激活受体并招募多种转录调节因子, 组成转录机器, 随后调节靶基因的转录表达^[7]。VDR 是激素形式的维生

素 D 发挥其生物学功能的核心因子, 也是理解维生素 D 生理功能的基础。在过去 40 年中, 因发现维生素 D 作用靶点和研究 VDR 功能的需要, 已建立了多种 VDR 检测的方法, 这些方法在研究 VDR 的组织分布和功能中发挥了重要作用。当然, 这些方法也存在一定的缺陷, 如方法的专一性不强或灵敏度低等。近年来, 我们建立了一套特异性强、灵敏性高的免疫测定方法(Immunoassays), 并成功地将它们应用于受体检测。本文将综述相关文献报道, 重点分析各种受体检测方法的优缺点, 为维生素 D 受体检测的研究提供指导。

基金项目: 陕西省重点科技创新团队(2012KTC-29); 陕西省重点实验室计划项目(2011HBSCS003); 陕西省教育厅专项科研项目(12JS029)

* 通讯作者: 王永吉, Email: yjwang2000@sina.com

1 组织和细胞的选择

在过去的研究工作中,人们广泛使用来源于人和动物的组织进行 VDR 的表达分析。值得注意的是,年龄、维生素 D 的状态、钙水平和健康状况等一系列因素,都能影响 VDR 基因在特定组织中的表达。例如,维生素 D 和钙的状态能够调节 VDR 在肾脏^[8]和骨骼^[9]中的表达(肠细胞除外)。此外,VDR 在肿瘤中的表达并不一定能够真实地反映对应的正常组织中的 VDR 表达情况,因为在一些乳腺癌和结肠癌中 VDR 表达会缺失^[10-12],而这些组织在正常情况下是表达 VDR 的。

另外,新鲜分离的细胞,如免疫细胞和成骨细胞通常也被用来鉴定 VDR 的表达。然而,分离原代细胞的步骤本身可能会改变 VDR 基因的转录^[13],细胞在体外培养过程中也可能获得 VDR 的表达^[14, 15]。因此,使用培养的细胞研究 VDR 的表达可能会提供错误的信息。

2 检测 VDR 表达的方法

检测 VDR 表达的方法有放射性配体与受体结合分析法(Radioligand receptor binding assays)、放射自显影法(Autoradiography)、VDR 转录分析法(Assays for VDR transcript)、LacZ 报告基因分析法、免疫分析法。其中免疫分析法包括免疫印迹(Western blot)、酶联免疫吸附法(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)和免疫组织化学法(Immunohistochemistry)。

2.1 放射性配体与受体结合分析法

放射性配体结合分析法是应用放射性标记的配体(如 $[^3\text{H}]-1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$)与含有受体的组织或细胞匀浆液进行孵育,使受体和配体充分结合,形成受体-配体大分子复合物,然后利用蔗糖密度梯度离心法或琼脂糖凝胶层析法将沉降系数不同或分子量不同的组分分离开来,最后测定各组分中的放射性,进而确定 VDR 的组织分布和基本特征。

Kream, B. E. 等利用该方法证实了大鼠胚胎和鸡胚胎颅盖骨细胞质中存在 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 高亲和力的大分子物质,并确定了其沉降系数^[6]。Brumbaugh, P. F. 等利用该方法确定了 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 与能够与鸡小肠的细胞核成分特异结合,并证实了潜在的 VDR 的可能是蛋白质,其分子量约为 47kD^[5]。

虽然这种方法在 VDR 的早期鉴定中发挥了重

要作用,但该方法灵敏度不高,只能初步确定潜在的 VDR 的组织分布和基本特征(分子量、沉降系数、热稳定性等),不能确定含有 VDR 的细胞类型。

2.2 放射自显影法

放射自显影法是利用放射性标记的配体(如 $[^3\text{H}]-1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$)与 VDR 特异结合的原理,来追踪 VDR 在体内、组织或细胞中的分布。 $[^3\text{H}]-1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 经血液循环到达机体各部位,通过观察组织切片中的标记信号分布,从而间接确定 VDR 的分布。为了确保细胞核内的放射性信号是受体特异的,通常用 VDR 低亲和力的放射性标记配体类似物如 $[^3\text{H}]-25(\text{OH})\text{D}_3$ 为对照,这种物质应该没有特异的细胞核内信号;或者选择其对应非标记的配体 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 与标记的配体 $[^3\text{H}]-1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 进行竞争,干扰和减弱标记的特异信号,从而显示标记信号的特异性。在早期研究中,使用这种方法成功确定了许多维生素 D 的靶组织或靶细胞^[16, 17]。

虽然放射自显影技术具有很高的灵敏性,但同样存在一些不足之处。VDR 的稳定性、配体/受体的分离、不同细胞对配体的吸收和代谢的差异,以及内源性配体的存在,都可能造成检测误差。 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 会进一步被代谢,其中肾脏是的主要代谢器官,由于这项技术测定的是 $[^3\text{H}]-1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 的信号,所以解释肾脏中的放射自显影的结果是十分困难的^[8, 18]。更为重要的是,该法通常使用维生素 D 缺乏的动物模型,而 VDR 在这种动物模型体内的表达情况,并不能完全代表受体在正常个体中的表达情况。例如,在维生素 D 供应充足的动物肾脏近曲小管中能够检测到 VDR,而在维生素 D 缺乏动物体内却检测不到 VDR^[17, 19]。此外,在单核细胞和淋巴细胞中的维生素 D 结合蛋白(vitamin D binding protein, DBP)可能会造成 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 的非受体结合^[20],干扰放射自显影的结果。

2.3 分析 VDR 转录的情况

原位分子杂交(*in situ* hybridization)和 PCR/qPCR 等方法也常被用于测定靶组织中的 VDR^[21, 22]。原位分子杂交使用标记的互补 DNA 或 RNA 为探针,可以在时间和空间上确定 VDR 的 mRNA 在靶组织中的存在和位置^[21, 22]。传统的 PCR 或定量 PCR(qPCR)方法可以在基因转录水平上来测定 VDR mRNA 在组织中的平均水平。虽然这些技术相对特异和敏感,但是它们并不能直接检测 VDR 蛋白的水平。

2.4 LacZ 报告基因分析

报告基因通常被用作基因表达的指示剂,指示特定基因是否在特定细胞或者器官中表达。Erben 等利用基因打靶技术构建了一种 VDR 基因敲除小鼠,这种小鼠携带 *lacZ* 报告基因,该报告基因受控于内源 VDR 的启动子^[23]。在已知 VDR 高表达的组织(如十二指肠、肾脏、甲状旁腺和胰岛等)中能够检测到显著的 *lacZ* 活性,这表明报告基因的表达具有组织特异性^[23, 24]。但是由于缺乏调节功能的 VDR^[23],VDR 的表达又受到配体($1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$)的自动调节(autoregulation),因而此处的 *lacZ* 活性并不能完全代表在正常情况下 VDR 的表达水平。

2.5 免疫化学分析法

免疫印迹、酶联免疫吸附和免疫组织化学等方法被广泛用于测定 VDR 的分布。尽管这些方法为检测 VDR 的组织特异性表达提供了重要信息,但文献报道的 VDR 免疫分析的结果不尽一致,甚至互相矛盾,这可能是由于研究者使用了不同的 VDR 抗体、缺乏合适的对照和统一的实验方法等原因导致的。

3 影响免疫化学分析法的因素

3.1 抗体的选择

目前,很多 VDR 抗体^[25],如大鼠单克隆抗体 9A7,小鼠单克隆抗体 IVG8C11,以及兔多克隆抗体 C-20,这些抗体已经使用了多年^[18, 26-34],鉴定了许多 VDR 表达的组织和细胞。但是,在免疫分析中,抗体制备和组织处理可能会影响方法的特异性和灵敏性。我们使用免疫印迹和免疫组织化学法^[25]分析了各种 VDR 抗体对 Demay VDR 基因敲除小鼠组织样品的免疫反应结果,结果表明,绝大多数的 VDR 抗体,包括应用最广泛的 9A7 和 C-20 抗体,不仅结合 VDR,还非特异地与其他未知蛋白结合。另外,有的抗体免疫反应灵敏性低,如 IVG8C11 和 H-81;一些抗体具有种属特异性,如 XVIE6E6 和 39069^[25]。通过平行实验的比较,我们发现小鼠抗人 VDR 单克隆抗体 D-6(美国 Santa Cruz Biotech 公司研发)具有极高的特异性、灵敏性和多功能性^[19, 25]。D-6 能够与人、猴、猪、鸡、大鼠和小鼠的 VDR 抗原反应,适用于免疫印迹、免疫细胞化学和免疫组织化学等多种免疫分析方法。更重要的是,该抗体特别适用于石蜡切片中 VDR 的免疫组织化学检测^[25]。由图 1^[35]可以看出,基于 D-6 抗体建立的免疫组织化学方法具有很高的特异性和灵敏性。

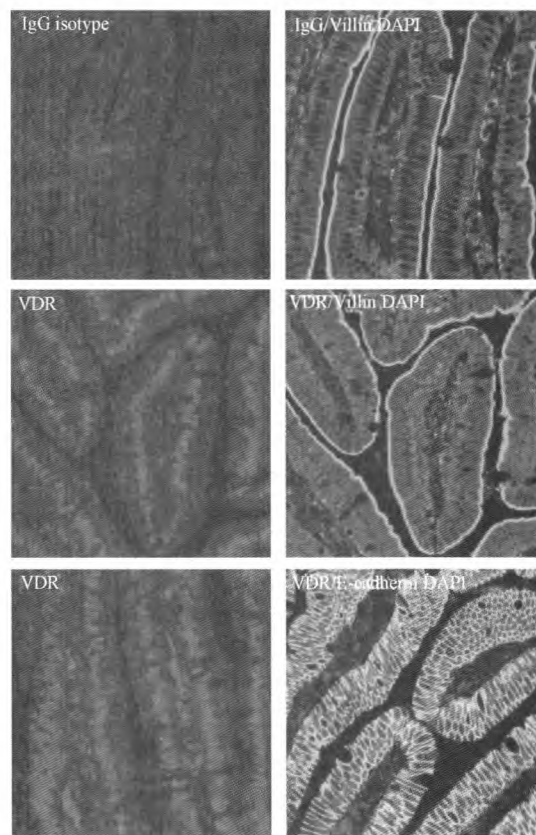


图 1 野生型小鼠十二指肠组织的免疫组织化学染色^[35]

4',6-Diamidino-2-phenylindone (DAPI, 蓝色)用于指示细胞核的位置。D-6 抗体用于指示 VDR(红色);E-cadherin(绿色)用于标记上皮细胞;Villin(绿色)用于标记小肠绒毛刷状缘

Fig.1 Immunohistochemical staining of duodenal tissue sections from the wild type mice^[35].

4',6-Diamidino-2-phenylindone (DAPI; blue) staining was applied to locate nucleus. VDR antibody: D-6 (red); E-cadherin (green); marker for epithelial cells; Villin (green): marker for the brush border of intestinal villi.

3.2 阴性对照组的选择

最近的研究显示,设置合适的阴性对照是至关重要的,对照组可以帮助我们精确地评估免疫组织化学等实验结果^[25, 36]。通常使用没有免疫过的动物血清、不相关的免疫球蛋白或不加一抗的封闭液等作为阴性对照。也有用过量的抗原(如含有 VDR 的组织提取液^[18]或用特异竞争性多肽)^[37]与 VDR 抗体共育的混合液作为阴性对照。由于不同蛋白很可能具有相同或相似的抗原决定簇,这些对照并不能排除这些蛋白对 VDR 检测的干扰。因此,用 VDR 缺失的基因工程动物作为阴性对照是一个合适的选择。Demay VDR 基因敲除小鼠的 VDR 基因

外显子 3 缺失^[25, 38, 39], 此小鼠组织中无 VDR 的存在, 是免疫组织化学等实验的理想对照。而 Kato VDR 基因敲除小鼠组织中能够检测出一个截短型的 VDR 片段, 因此该小鼠组织并不是免疫组织化学对照组的理想选择。

3.3 免疫学分析方法的选择

免疫组织化学能够对 VDR 进行精确的组织 and 细胞定位^[40]。免疫印迹和 ELISA 法可以测定组织中的 VDR 含量, 但这两种方法都不能鉴定 VDR 表达的特定细胞类型。DeLuca 研究小组建立了一种特异 ELISA 方法, 能够确定组织提取液中 VDR 的含量^[41]。在这个系统中, 来自组织匀浆的 VDR 与两种单克隆抗体结合, 这两种单抗分别用以识别 VDR 蛋白的不同抗原决定簇。第一种抗体被固定在一个表面, 而第二种抗体是生物素酰化的, 经由碱性磷酸酶-偶联的抗生物素蛋白链菌素来确定 VDR 的含量。该方法似乎是一种高度特异和灵敏的 VDR 定量分析方法。

4 结语

VDR 是激素形式的维生素 D 发挥其生物学功能的核心因子, 也是理解维生素 D 生理功能的基础。测定方法的选择是成功鉴定靶组织中 VDR 的关键, 有鉴于此, VDR 的检测方法受到广泛重视。这些测定方法在研究 VDR 的组织分布和功能中发挥了重要作用, 同时也暴露出各自的局限性。基于 D-6 抗体的诸多优点, 我们建立了一套特异性强、灵敏性高的免疫组织化学测定方法, 并利用这些方法肯定了前人的一些研究结果, 也取得了一些新的成果。值得注意的是, 即使是使用当前最特异和灵敏检测手段, 也不能在肝脏、平滑肌和骨骼肌中检测到 VDR。肝脏和肌肉组织中是否存在低于检测极限的 VDR 或完全缺乏 VDR? 这些低于检测极限的 VDR 是否也能介导维生素 D 的功能? 目前的研究还不能给出答案。但可以预期, 随着现有 VDR 检测技术的不断完善, 以及新的高效、特异检测技术的不断涌现, 这必将大大推动维生素 D 相关领域的研究。

【参 考 文 献】

- [1] Goltzman D, Miao D, Panda DK, et al. Effects of calcium and of the Vitamin D system on skeletal and calcium homeostasis: lessons from genetic models[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2004, 89-90(1-5): 485-489.
- [2] Burmester JK, Maeda N, DeLuca HF. Isolation and expression of rat 1, 25-dihydroxyvitamin D3 receptor cDNA[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988, 85(4): 1005-1009.
- [3] Baker AR, McDonnell DP, Hughes M, et al. Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988, 85(10): 3294-3298.
- [4] Brumbaugh PF, Haussler DH, Bressler R, et al. Radioreceptor assay for 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3[J]. Science, 1974, 183(4129): 1089-1091.
- [5] Brumbaugh PF, Haussler MR. Specific binding of 1alpha, 25-dihydroxycholecalciferol to nuclear components of chick intestine[J]. J Biol Chem, 1975, 250(4): 1588-1594.
- [6] Kream BE, Jose M, Yamada S, et al. A specific high-affinity binding macromolecule for 1, 25-dihydroxyvitamin D3 in fetal bone[J]. Science, 1977, 197(4308): 1086-1088.
- [7] Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, et al. The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed[J]. J Bone Miner Res, 1998, 13(3): 325-349.
- [8] Healy KD, Zella JB, Prah JM, et al. Regulation of the murine renal vitamin D receptor by 1, 25-dihydroxyvitamin D3 and calcium[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(17): 9733-9737.
- [9] Zella LA, Kim S, Shevde NK, et al. Enhancers located within two introns of the vitamin D receptor gene mediate transcriptional autoregulation by 1, 25-dihydroxyvitamin D3[J]. Mol Endocrinol, 2006, 20(6): 1231-1247.
- [10] Pervin S, Hewison M, Braga M, et al. Down-regulation of vitamin D receptor in mammospheres: implications for vitamin D resistance in breast cancer and potential for combination therapy[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e53287.
- [11] Dougherty U, Mustafi R, Sadiq F, et al. The renin-angiotensin system mediates EGF receptor-vitamin d receptor cross-talk in colitis-associated colon cancer[J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(22): 5848-5859.
- [12] Larriba MJ, Ordonez-Moran P, Chicote I, et al. Vitamin D receptor deficiency enhances Wnt/beta-catenin signaling and tumor burden in colon cancer[J]. PLoS One, 2011, 6(8): e23524.
- [13] Ahn YB, Xu G, Marselli L, et al. Changes in gene expression in beta cells after islet isolation and transplantation using laser-capture microdissection[J]. Diabetologia, 2007, 50(2): 334-342.
- [14] Bhalla AK, Wojno WC, Goldring MB. Human articular chondrocytes acquire 1, 25-(OH)2 vitamin D-3 receptors in culture[J]. Biochim Biophys Acta, 1987, 931(1): 26-32.
- [15] Salvatore V, Teti G, Bolzani S, et al. Simulating tumor microenvironment: changes in protein expression in an in vitro co-culture system[J]. Cancer Cell Int, 2014, 14: 40.
- [16] Stumpf WE. Vitamin D sites and mechanisms of action: a histochemical perspective. Reflections on the utility of autoradiography and cytopharmacology for drug targeting[J]. Histochem Cell Biol, 1995, 104(6): 417-427.
- [17] Stumpf WE, Sar M, Reid FA, et al. Target cells for 1, 25-

- dihydroxyvitamin D3 in intestinal tract, stomach, kidney, skin, pituitary, and parathyroid [J]. *Science*, 1979, 206 (4423): 1188-1190.
- [18] Berger U, Wilson P, McClelland RA, et al. Immunocytochemical detection of 1, 25-dihydroxyvitamin D receptors in normal human tissues[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1988, 67(3): 607-613.
- [19] Wang Y, Borchert ML, DeLuca HF. Identification of the vitamin D receptor in various cells of the mouse kidney[J]. *Kidney Int*, 2012, 81(10): 993-1001.
- [20] Sabbatini A, Petrini M, Mattii L, et al. Vitamin D binding protein is produced by human monocytes[J]. *FEBS Lett*, 1993, 323(1-2): 89-92.
- [21] Liu L, Ng M, Iacopino AM, et al. Vitamin D receptor gene expression in mammalian kidney[J]. *J Am Soc Nephrol*, 1994, 5(5): 1251-1258.
- [22] Liu L, Khastgir A, McCauley JM, et al. RT-PCR microlocalization of mRNAs for calbindin D28k and vitamin D receptor in the murine nephron[J]. *Am J Physiol*, 1996, 270(4 Pt 2): F677-681.
- [23] Erben RG, Soegiarto DW, Weber K, et al. Deletion of deoxyribonucleic acid binding domain of the vitamin D receptor abrogates genomic and nongenomic functions of vitamin D [J]. *Mol Endocrinol*, 2002, 16(7): 1524-1537.
- [24] Zeitz U, Weber K, Soegiarto DW, et al. Impaired insulin secretory capacity in mice lacking a functional vitamin D receptor [J]. *FASEB J*, 2003, 17(3): 509-511.
- [25] Wang Y, Becklund BR, DeLuca HF. Identification of a highly specific and versatile vitamin D receptor antibody [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2010, 494(2): 166-177.
- [26] Liu W, Tretiakova M, Kong J, et al. Expression of vitamin D3 receptor in kidney tumors[J]. *Hum Pathol*, 2006, 37(10): 1268-1278.
- [27] Barsony J, Pike JW, DeLuca HF, et al. Immunocytology with microwave-fixed fibroblasts shows 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3-dependent rapid and estrogen-dependent slow reorganization of vitamin D receptors[J]. *J Cell Biol*, 1990, 111(6 Pt 1): 2385-2395.
- [28] Clemens TL, Garrett KP, Zhou XY, et al. Immunocytochemical localization of the 1, 25-dihydroxyvitamin D3 receptor in target cells[J]. *Endocrinology*, 1988, 122(4): 1224-1230.
- [29] Dokoh S, Haussler MR, Pike JW. Development of a radioligand immunoassay for 1, 25-dihydroxycholecalciferol receptors utilizing monoclonal antibody[J]. *Biochem J*, 1984, 221(1): 129-136.
- [30] Sandgren ME, Bronnegard M, DeLuca HF. Tissue distribution of the 1, 25-dihydroxyvitamin D3 receptor in the male rat [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, 181(2): 611-616.
- [31] Dame MC, Pierce EA, Prah J, et al. Monoclonal antibodies to the porcine intestinal receptor for 1, 25-dihydroxyvitamin D3: interaction with distinct receptor domains [J]. *Biochemistry*, 1986, 25(16): 4523-4534.
- [32] Milde P, Merke J, Ritz E, et al. Immunohistochemical detection of 1, 25-dihydroxyvitamin D3 receptors and estrogen receptors by monoclonal antibodies: comparison of four immunoperoxidase methods[J]. *J Histochem Cytochem*, 1989, 37(11): 1609-1617.
- [33] Pierce EA, Dame MC, DeLuca HF. A radiometric immunosorbent assay for the detection of anti-hormone-binding protein antibodies[J]. *Anal Biochem*, 1986, 153(1): 67-74.
- [34] Bises G, Kallay E, Weiland T, et al. 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase expression in normal and malignant human colon[J]. *J Histochem Cytochem*, 2004, 52(7): 985-989.
- [35] Wang Y, Zhu J, DeLuca HF. Where is the vitamin D receptor? [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2012, 523(1): 123-133.
- [36] Wang Y, DeLuca HF. Is the vitamin d receptor found in muscle? [J]. *Endocrinology*, 2011, 152(2): 354-363.
- [37] Nibelink KA, Tishkoff DX, Hershey SD, et al. 1, 25(OH)2-vitamin D3 actions on cell proliferation, size, gene expression, and receptor localization, in the HL-1 cardiac myocyte [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2007, 103(3-5): 533-537.
- [38] Li YC, Pirro AE, Amling M, et al. Targeted ablation of the vitamin D receptor: an animal model of vitamin D-dependent rickets type II with alopecia[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94(18): 9831-9835.
- [39] Wang Y, Zhu J, DeLuca HF. Identification of the vitamin D receptor in osteoblasts and chondrocytes but not osteoclasts in mouse bone[J]. *J Bone Miner Res*, 2014, 29(3): 685-692.
- [40] Wang Y, Zhu J, DeLuca HF. The vitamin D receptor in the proximal renal tubule is a key regulator of serum 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2014; ajpendo 00422 02014.
- [41] Uhland-Smith A, Prah J, DeLuca HF. An enzyme-linked immunoassay for the 1, 25-dihydroxyvitamin D3 receptor protein [J]. *J Bone Miner Res*, 1996, 11(12): 1921-1925.

(收稿日期: 2015-04-02)