

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2020.08.08

总 25-羟基维生素 D 磁微粒化学发光免疫分析法的建立及性能评价*

卜玲¹, 姚孝明², 张誉严², 韩霜³, 李光¹(1. 南京医科大学附属老年医院检验科, 南京 210024; 2. 南京中医药大学附属中西医结合医院 江苏省中医药研究院检验科, 南京 210028; 3. 江南大学生物工程学院, 江苏无锡 214122)

摘要:目的 建立一种定量测定人血清中总 25-羟基维生素 D (25-OH VD) 含量的磁微粒化学发光免疫分析法。方法 使用竞争法, 样本中的 25-OH VD 与生物素化 25-OH VD 衍生物共同竞争结合碱性磷酸酶标记的 25-OH VD 单克隆抗体, 生物素化 25-OH VD 衍生物再结合链霉亲和素磁珠, 形成抗体-抗原衍生物-磁珠的复合物, 通过检测复合物的光信号来测定样本中 25-OH VD 的浓度。并对建立的方法进行准确度、精密性、线性、干扰、稳定性以及方法比对等性能评价。结果 建立的方法准确度偏差小于 10%; 批内和批间精密性均小于 10%; 在 3.17~98.75 ng/mL 之间测量值与靶值线性良好; 生物素浓度不大于 250 nmol/L、三酰甘油浓度不大于 1 500 mg/dL、血红蛋白浓度不大于 1 500 mg/dL、胆红素浓度不大于 200 mg/dL 时, 对样本检测不产生明显干扰作用; 25-OH VD 磁微粒化学发光免疫分析法试剂在 4 °C 条件下 21 d 内具有较好的稳定性。与 Immunodiagnostic Systems 公司 25-OH VD 检测试剂盒 (ELISA 法) 同时测定 200 例临床样本, 回归方程为 $Y=1.006 2X-0.166 3$, $r^2=0.979 2$ 。结论 建立的方法可定量测定 25-OH VD, 具有良好的性能, 可以满足临床需求。

关键词: 25-羟基维生素 D; 磁微粒化学发光; 竞争免疫法

中图分类号: R446.6

文献标志码: A

Establishment and performance evaluation of magnetic nanoparticle chemiluminescence immunoassay for total 25-OH vitamin D

BU Ling¹, YAO Xiaoming², ZHANG Yuyan², HAN Shuang³, LI Guang¹(1. Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Geriatric Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210024, Jiangsu; 2. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine / Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, Jiangsu; 3. School of Bioengineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract: Objective To establish a magnetic nanoparticle chemiluminescence immunoassay for the quantitative determination of total 25-OH vitamin D (25-OH VD) in human serum. **Methods** A competitive assay was established. 25-OH VD and biotinylated 25-OH VD derivatives can competitively bind with the monoclonal antibodies against 25-OH VD labeled by alkaline phosphatase, and then the derivatives can bind with the magnetic nanoparticles coated by streptavidin to form a complex of antibody-derivative-nanoparticle. Finally, the concentrations of 25-OH VD in samples were determined by detecting the chemiluminescence value of the complex. The performances of the established method, including accuracy, precision, interference, linearity, stability and methodological comparison, were evaluated. **Results** The bias of the established method was less than 10%. The intra- and inter-assay precisions were lower than 10%. There was good correlation between the measured values and target values in the range of 3.17 ng/mL and 98.75 ng/mL. When the concentrations of serum biotin, triglyceride, hemoglobin and bilirubin were lower than 250 nmol/L, 1 500 mg/dL, 1 500 mg/dL and 200 mg/dL, respectively, the interference on the detection of 25-OH VD could be ignored. The key reagents of the established method had good stability during 21 days at 4 °C. When 200 clinical samples were detected by the established method and the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit from the Immunodiagnostic Systems Limited, respectively, the regression equation and correlation coefficient (r^2) between them were $Y=1.006 2X-0.166 3$ and 0.979 2, respectively. **Conclusion** The established method can be used for the quantitative determination of 25-OH VD, which has good performance and can meet the clinical needs.

Key words: 25-OH vitamin D; magnetic nanoparticle chemiluminescence; competitive immunoassay

维生素 D 是一种人体必需的脂溶性类固醇^[1], 体内, 其存在 2 种形式: 维生素 D₃ 和维生素 D₂。人体具有生物惰性, 必须经过羟基化步骤去激活。在人体只能合成维生素 D₃, 而维生素 D₂ 需要通过外界

* 基金项目: 江苏省研究生科研与实践创新计划项目 (KYCX18 1793)。

作者简介: 卜玲, 1989 年生, 女, 技师, 大学本科, 从事临床检验诊断学研究; 姚孝明, 1973 年生, 男, 主任技师, 大学本科, 从事临床检验诊断学研究。两人对文章贡献等同, 为共同第一作者。

通信作者: 李光, 副主任技师, E-mail: lg20130413@126.com。

诸如食品、片剂等来补充。血清中总 25-羟基维生素 D(25-OH Vitamin D, 25-OH VD)浓度为 25-OH VD₂和 25-OH VD₃ 的浓度之和^[2-4]。因此,其血液浓度可用于评估总体维生素 D 的状态。

目前的 25-OH VD 检测方法学以液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)和 ELISA 法为主。ELISA 法易实现自动化操作,适合于在常规临床实验室开展,但对基质敏感,容易与其他非目标化合物发生交叉反应,降低检测的特异性,且酶促反应的结果受到反应温度、反应时间及加样准确性等因素的影响^[5-6],检测速度相对较慢。LC-MS/MS 被公认为检测的金标准^[7],也被作为其他检测方法验证校对的参考依据,具有非常高的灵敏度、特异性和准确性,但仪器昂贵、对操作人员专业度要求较高,且需要自行开发检测方法。目前国内大多数医院没有配备相关仪器和专业人员的能力,限制了 LC-MS/MS 法在临床的应用推广。

化学发光免疫分析是将发光反应与免疫反应相结合,用来检测微量抗原或抗体的新型标记免疫检测技术^[8],具有稳定性强,重复性好,灵敏度高,特异性强,检测速度快等优点。因此本研究通过化学发光平台,建立一种检测 25-OH VD 的磁微粒化学发光免疫分析法。

1 材料与方 法

1.1 主要仪器与试剂 MULTISKAN FC 酶联仪(美国赛默飞世尔公司);SMART 6500 全自动化学发光免疫分析仪(重庆科斯迈公司)。比对试剂:25 羟基维生素 D 检测试剂盒[ELISA 法,英国 Immunodiagnostic Systems(IDS)公司]。

1.2 主要原材料 25-OH VD 单克隆抗体(英国 Bioventix 公司),25-OH VD 衍生物(厦门同仁心公司),25-OH VD 抗原、过碘酸钠、NHS-Biotin、EDC(美国 Sigma 公司),硼氢化钠(上海麦克林公司),25-OH VD 解离液(上海汉尊公司),链霉亲和素磁微粒(美国 GE 公司),碱性磷酸酶(瑞士罗氏公司),3-(2-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3-磷酸氧基)苯-1,2-二氧杂环丁烷(AMPPD)发光底物液(美国贝克曼公司)。

1.3 方法

1.3.1 实验流程与原理 用竞争法,首先用 25-OH VD 解离液 90 μ L 将 30 μ L 样本中的 25-OH VD 从结合蛋白中解离,震荡反应 90 min,形成游离态。与生物素化 25-OH VD 衍生物共同竞争结合碱

性磷酸酶标记的 25-OH VD 单克隆抗体,37 $^{\circ}$ C 反应 40 min 后,再将生物素化 25-OH VD 衍生物结合至链霉亲和素磁珠上,37 $^{\circ}$ C 反应 30 min 后,形成抗体-抗原衍生物-磁珠的复合物,最后在电磁场中对标记抗体-抗原衍生物-磁珠的复合物进行分离洗涤,弃上清,用 250 μ L 洗液洗涤 3 次后加入 AMPPD 发光剂 200 μ L,室温避光放置 20 min 后,用全自动化学发光免疫分析仪检测发光强度,根据化学发光强度的变化测定 25-OH VD 浓度,竞争法中样本浓度与发光强度呈反比。

1.3.2 25-OH VD 校准品的溯源 使用商品化的 25-OH VD 抗原纯品作为原料配制校准品(0 ng/mL、6.5 ng/mL、15 ng/mL、30 ng/mL、60 ng/mL、100 ng/mL),对建立的方法进行溯源。用 SMART 6500 全自动化学发光免疫分析仪对标准品进行赋值,绘制标准曲线。用校准品配制成已知不同浓度的质控标本,进行结果验证,并对常规标本进行检测,验证检验结果的准确性。

1.3.3 碱性磷酸酶标记抗体的制备 参考杜晔等^[9]使用碱性磷酸酶标记抗体的方法,并作如下改良:(1)将 2 mg 碱性磷酸酶溶于 1 mL 0.1 mol/L pH 8.0 的碳酸氢钠缓冲液中;(2)加入 500 μ L 0.2 mol/L 的过碘酸钠并轻轻混匀,4 $^{\circ}$ C 避光反应 30 min;(3)加入 1.5 mL 0.1 mol/L 乙二醇,轻轻混匀后 4 $^{\circ}$ C 避光反应 45 min,终止氧化反应;(4)加入 1 mg 抗体,再加入 150 μ L 0.5 mol/L pH 9.6 的碳酸氢钠缓冲液,在 0.05 mol/L pH 9.6 的碳酸氢钠缓冲液中 4 $^{\circ}$ C 避光透析过夜;(5)加入 1 mg NaBH₄,4 $^{\circ}$ C 避光反应 2 h;(6)在 0.01 mol/L pH 7.2 PBS 溶液中 4 $^{\circ}$ C 透析 24 h;(7)取出透析物,在 4 $^{\circ}$ C、3 000 \times g 条件下离心 30 min 取上清液,用蛋白质浓度测定仪测定其蛋白质浓度为 1.1 mg/mL;(8)加入等体积甘油,-20 $^{\circ}$ C 避光保存。

1.3.4 生物素化 25-OH VD 衍生物的制备 (1)用无水二甲基甲酰胺(DMF)将 NHS-Biotin 溶解至 1 mg/mL,分装保存于-20 $^{\circ}$ C 备用;(2)取 500 μ L 2 mg/mL 的 25-OH VD 衍生物溶液,加入 5 倍于 25-OH VD 衍生物物质的量的 NHS-Biotin(1 mg/mL),并用 0.5 mol/L pH 9.6 的碳酸氢钠缓冲液将反应总体积补足至 1 mL,室温反应 1 h;(3)在 0.1 mol/L PBS 缓冲液透析中 4 $^{\circ}$ C 透析 24 h;(4)取出透析物,用蛋白质浓度测定仪测定其蛋白质浓度为 5.8 mg/mL;(5)加入等体积甘油,-20 $^{\circ}$ C 避光保存。

1.3.5 试剂最佳工作浓度 用棋盘滴定法,将标记抗体稀释为 1.0 μg/mL、2.0 μg/mL、4.0 μg/mL 和 6.0 μg/mL 4 个浓度,将生物素化 25-OH VD 衍生物稀释为 25 ng/mL、50 ng/mL 和 100 ng/mL 3 个浓度,分别交叉测试。用 25-OH VD 纯品,配制 0 浓度样本(S0)和 91.5 ng/mL 的高值样本(S1)进行筛选。

2 实验与结果

2.1 校准品的赋值 根据 ELISA 法已知的线性范围,配制校准品浓度为 0 ng/mL、6.5 ng/mL、15 ng/mL、30 ng/mL、60 ng/mL、100 ng/mL,经赋值后的校准曲线见图 1。

2.2 试剂最佳工作浓度的确定 当 S1 与 S0 的信号值之比(抑制率)小于 10%,说明该组试剂浓度下的样品可以拉开较大梯度。当标记抗体浓度为 1.0 μg/mL、生物素化 25-OH VD 衍生物浓度为 25 ng/mL,标记抗体浓度为 2.0 μg/mL、生物素化 25-OH VD 衍生物浓度为 25 ng/mL,标记抗体浓度

为 1.0 μg/mL、生物素化 25-OH VD 衍生物浓度为 50 ng/mL,标记抗体浓度为 2.0 μg/mL、生物素化 25-OH VD 衍生物浓度为 50 ng/mL 时,S1 与 S0 的信号值之比(抑制率)小于 10%。同时,标记抗体浓度为 2.0 μg/mL、生物素化 25-OH VD 衍生物浓度为 50 ng/mL 时 S1 与 S0 的信号值的绝对值又大于抑制率小于 10%的另外 3 组,样品之间有更宽的信号空间,故选择该组试剂浓度为最佳工作浓度。见表 1。

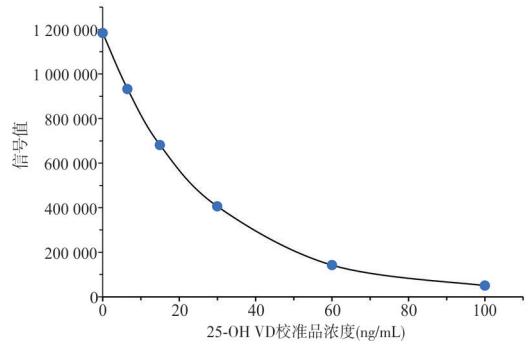


图 1 25-OH VD 校准曲线

表 1 25-OH VD 试剂最佳工作浓度确定

生物素化 25-OH VD 衍生物浓度 (ng/mL)	样本	标记抗体浓度 (μg/mL)			
		1.0	2.0	4.0	6.0
25	S0	732 207	1 098 603	1 464 245	1 778 050
	S1	52 461	99 163	188 355	366 093
	抑制率 (%)	7.16	9.03	12.86	20.59
50	S0	1 255 275	1 883 838	2 719 341	3 451 442
	S1	105 351	165 803	366 132	784 971
	抑制率 (%)	8.39	8.80	13.46	22.74
100	S0	1 464 430	2 614 845	3 974 429	5 233 688
	S1	188 332	386 997	679 865	1 349 267
	抑制率 (%)	12.86	14.80	17.11	25.78

2.3 性能验证

2.3.1 准确度 用 25-OH VD 纯品配制高值 98.75 ng/mL 和低值 3.17 ng/mL 2 个浓度的检测样本,进行连续测定,每天对高水平和低水平样本进行 3 次重复测定,连续测定 5 d。分别取测试结果均值,计算相对偏差。结果显示,相对偏差分别为 -2.09%、-0.63%,均在 ±10% 范围内,证明建立的方法准确度符合行业标准要求。

2.3.2 精密度 根据 NCCLS EP7-A2 文件^[10],用 25-OH VD 纯品配制高值和低值 2 个浓度的检测样本,各重复测定 10 次,计算 10 次测量结果的平均值(\bar{x})和标准差(s),根据公式变异系数(CV)= $\bar{x}/s \times 100\%$,得出批内重复性;选取 3 个批次的试剂,同时

测定 2 个浓度的样品各 10 次,计算 10 次测量结果的 \bar{x} 和 s ,得出批间重复性。结果显示,建立的方法批内 CV 的平均值为 2.1%,批间 CV 的平均值为 4.4%,均小于 10%,具有良好的精密度。

2.3.3 线性试验 根据 NCCLS EP6-A2 文件^[11],用 25-OH VD 纯品配制高值 98.75 ng/mL 和低值 3.17 ng/mL 2 个浓度的检测样本,按体积比 1:5、2:4、3:3、4:2、5:1 混合成 5 个浓度梯度,作为预测值。将每个浓度样本重复测定 3 次,计算其平均值作为实测浓度,将平均值(X)和预测值(Y)作线性回归分析。建立的方法在 3.17~98.75 ng/mL 内实测值与预测值之间线性关系良好($Y = 0.9758X + 0.5177, r^2 = 0.9999$)。见表 2。

表 2 25-OH VD 线性试验结果

样本	预测值 (ng/mL)	测定浓度 (ng/mL)			
		测试一	测试二	测试三	平均值
样本 1	98.75	97.41	97.58	95.04	96.68
样本 2	82.82	83.19	81.99	80.24	81.81
样本 3	66.89	66.33	66.73	66.15	66.40
样本 4	50.96	50.55	49.45	49.61	49.87
样本 5	35.03	34.17	35.69	34.18	34.68
样本 6	19.10	19.77	19.77	18.69	19.41
样本 7	3.17	3.13	3.14	3.18	3.15

2.3.4 干扰试验 根据 CLSI EP7-A2^[12] 文件实验方案,将配制好的同稀释浓度干扰测试样本重复检测 2 次,用低、中、高 3 个浓度水平的样本作为基础样本,将每个基础样本分为 5 份,其中一份加入不含

干扰物的样本稀释液为对照样本,另外 4 份中加入等体积的不同浓度干扰物质作为分析样本,每份样本重复测定 3 次取平均值,计算干扰率。干扰率=(分析样本测定浓度平均值-基础样本测定浓度平均值)/基础样本测定浓度平均值×100%。计算添加干扰物后与无干扰物时的干扰效应,以偏倚≤10%为判断标准。结果显示,当生物素浓度为 250 nmol/L、三酰甘油浓度为 1 500 mg/dL、血红蛋白浓度为 1 500 mg/dL、胆红素浓度为 200 mg/dL 时,干扰率均小于 8%,说明本方法的抗干扰能力较强。见表 3。

表 3 25-OH VD 干扰试验结果

干扰物质	干扰物添加浓度	干扰样本测定浓度 平均值(ng/mL)	基础样本测定浓度 平均值(ng/mL)	干扰率(%)
生物素	250 nmol/L	3.25	3.38	4.00
		46.08	49.16	6.68
		92.41	97.05	5.02
三酰甘油	1 500 mg/dL	3.18	3.35	5.35
		48.22	50.28	4.27
		89.08	92.81	4.19
血红蛋白	1 500 mg/dL	3.3	3.51	6.36
		45.79	47.87	4.54
		93.23	97.13	4.18
胆红素	200 mg/dL	3.19	3.40	6.58
		47.53	50.09	5.39
		91.67	95.57	4.25

2.3.5 稳定性 将生物素化 25-OH VD 衍生物 -20 ℃ 避光保存,碱性磷酸酶标记的 25-OH VD 单克隆抗体 4 ℃ 避光保存,3 个浓度的检测样本(浓度分别为 6.5 ng/mL、30 ng/mL、60 ng/mL) -20 ℃ 保存。首次测定后,分别于 7、14、21、30 d 进行测定,每个样品重复测定 3 次,求得平均值。以首次测定结果(0 d)为标准,计算稳定性,以 90%~110% 作为试剂稳定的评价标准。25-OH VD 化学发光法检测试剂在 4 ℃ 条件下 21 d 内稳定性均在 90%~110% 内,具有较好的稳定性,21 d 后 25-OH VD 稳定性明显下降。见表 4。

表 4 25-OH VD 稳定性(%)

保存时间 (d)	不同浓度样品		
	6.5 ng/mL	30 ng/mL	60 ng/mL
7	106.2	97.5	99.3
14	102.1	95.7	93.2
21	96.7	93.2	92.1
30	85.3	82.1	79.5

2.3.6 准确度方法学比对 根据 NCCLS EP9-A2^[13] 文件实验方案,由江苏省省级机关医院提供 200 例

临床样本,同时使用比对方法(ELISA 法)和建立的方法进行测定,以 ELISA 法所测结果为 X 轴,本文方法所测结果为 Y 轴,进行回归分析。回归方程为 $Y=1.006 2X-0.166 3$, $r^2=0.9792$ 。对截距 a 和斜率 b 分别作 t 检验,由 200 例样本数查得 95% 置信区间 $t_{0.05/2}=1.972$, $t_a=-0.3542<1.972$,说明截距 a 无限接近于 0,无统计学意义; $t_b=94.310 7>1.972$,说明斜率 b 不等于 0,有统计学意义。说明两者的测定结果有良好的一致性。

3 讨论

维生素 D 是人体必须的脂溶性维生素。在儿童中,严重缺乏会导致佝偻病;在中老年人中,缺乏维生素 D 会导致骨质疏松,易引发骨折等问题。此外,有研究表明,25-OH VD 还与糖尿病、癌症、心血管疾病和自身免疫性疾病有关^[14-16],大剂量补充维生素 D 的维生素 D 匮乏人群来说,更需要定期监测体内 25-OH VD 的含量以防过量导致中毒^[17],因此准确监测 25-OH VD 的总量至关重要。

本文建立的方法采用全自动化学发光免疫分析仪,且使用生物素-链霉亲和素信号放大体系,使 25-OH VD 的测定更便捷、快速,灵敏度更高。本研究对准确度、精密密度、线性、干扰、稳定性和方法学比对进行了系统研究。其中,准确度偏差和批内、批间精密密度均小于 10%,满足临床需求,具有较好的重现性及可靠性;在 3.17~98.75 ng/mL 之间测量值与靶值之间线性良好;在生物素浓度不大于 250 nmol/L、三酰甘油浓度不大于 1 500 mg/dL、血红蛋白浓度不大于 1 500 mg/dL、胆红素浓度不大于 200 mg/dL 等干扰下,不产生明显干扰作用。研究表明,分别用 ELISA 法和金标准 LC-MS/MS 法进行 25-OH VD 的方法比对,结果发现 LC-MS/MS 法测定的 25-OH VD 数值明显低于 ELISA 法,表明 ELISA 法低估了体内维生素 D 的缺乏,但保证严格实验条件下,ELISA 法可作为筛查 25-OH VD 的方法,且 ELISA 法与 LC-MS/MS 法具有较好的相关性,可经公式方程互换^[18]。鉴于 ELISA 法在常规临床实验室的广泛使用,因此,我们将本文建立的方法与英国 IDS 公司开发的 25-OH VD 检测试剂盒(ELISA 法)同时测定 200 例临床样本,比对结果表明 2 种方法结果具有较好的相关性。磁微粒化学发光免疫分析法具有稳定性强,重复性好等优点,克服了 ELISA 法结果受反应温度、反时间及加样等因素影响的缺陷,并且省时、快速。

综上所述,本研究建立的 25-OH VD 磁微粒化学发光免疫分析法可应用于临床定量检测人血清中 25-OH VD 的含量,其准确度、精密密度、线性、抗干扰能力以及稳定性均满足临床要求。

4 参考文献

[1] Zarei M, Javanbakht MH, Chams-Davatchi C, *et al.* Evaluation of vitamin D status in newly diagnosed pemphigus vulgaris patients[J]. Iran J Public Health, 2014, 43(11): 1544-1549.

[2] Zerwekh JE. Blood biomarkers of vitamin D status[J]. Am J Clin Nutr, 2008, 87(4): 1087S-91S.

[3] Holick MF. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets[J]. J Clin Invest, 2006, 116(8): 2062-2072.

[4] Heaney RP. Vitamin D: how much do we need, and how much is too much? [J]. Osteoporos Int, 2000, 11(7): 553-555.

[5] Grange RD, Thompson JP, Lambert DG. Radioimmunoassay, en-

zyme and non-enzyme-based immunoassays[J]. Br J Anaesth, 2014, 112(2): 213-216.

[6] 冯海英, 王颖, 林丽荣, 等. 两种 25-羟基维生素 D 测定方法的评价[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2013, 34(14): 2101.

[7] Stepman HC, Vanderroost A, Van Uytvanghe 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.

[8] 汪晨, 吴洁, 宗晨, 等. 化学发光免疫分析方法与应用进展[J]. 分析化学, 2012, 40(1): 3-10.

[9] 杜晔, 李基, 彭波. 碱性磷酸酶标记抗人绒毛膜促性腺激素抗体的工艺比较[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2015, 7(5): 333-340.

[10] National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods; Approved guideline-second edition. NCCLS document EP5-A2[S]. Wayne, PA: NCCLS, 2004.

[11] National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures; A statistical approach; Approved guideline. NCCLS document EP6-A2 [S]. Wayne, PA: NCCLS, 2003.

[12] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Interference testing in clinical Chemistry, Approved guideline-second edition. CLSI document EP7-A2[S]. Wayne, PA: CLSI, 2005.

[13] National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP9-A2. Method comparison and bias estimation using patient samples[S]. Wayne, PA: NCCLS, 2002.

[14] Bjelakovic G, Glud LL, Nikolova D, *et al.* Vitamin D supplementation for prevention of cancer in adults[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2014, (6): CD007469.

[15] Thacher TD, Fischer PR, Pettifor JM, *et al.* A comparison of calcium, vitamin D, or both for nutritional rickets in Nigerian children [S]. N Engl J Med, 1999, 341(8): 563-568.

[16] Holick MF. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis[J]. Am J Clin Nutr, 2004, 79(3): 362-371.

[17] Regalado Lam Chew Tun R, Porhownik N, Taback S, *et al.* Effect of high dose vitamin D3 therapy on serum vitamin D3 levels in vitamin D insufficient adults with cystic fibrosis[J]. Clin Nutr ESPEN, 2018, 23: 84-88.

[18] 毛旭东, 吴彦, 盛宏光, 等. 液相色谱-质谱联用法(LC-MS/MS)和酶联免疫法(ELISA)对体内 25(OH)D3 水平的测定[J]. 中国骨质疏松志, 2013, 19(6): 584-586.

(收稿日期:2019-11-13)

(本文编辑:刘群)