

Zn²⁺对球等鞭金藻 3011 细胞膜电位和膜通透性的影响

赵培, 王雪青*, 陈庆森, 彭博丽, 亢凯, 陈欢

(天津商业大学生物技术与食品科学学院, 天津市食品生物技术重点实验室, 天津 300134)

摘要:目的: 用亲脂性阴离子荧光染料双(1,3-二巴比妥酸)-三次甲基氧烯洛尔和碘化丙啶标记球等鞭金藻 3011 (*Isochrysis galbana* 3011), 研究 *Isochrysis galbana* 3011 受 Zn²⁺ 作用时膜电位和膜通透性的变化。方法: 对处理藻液进行流式细胞技术检测和荧光显微镜镜检, 通过对比实验设计, 实验数据使用 SPSS17.0 统计软件进行方差分析。结果: 5 μg/L Zn²⁺ 作用 4min 可使 *Isochrysis galbana* 3011 细胞内荧光强度明显增强, 并促使膜的通透性发生剧烈变化, 与对照组比较具有统计学意义。结论: 找到一种快速动态测定 *Isochrysis galbana* 3011 细胞膜状态的方法, 发现 5 μg/L 的 Zn²⁺ 能引起 *Isochrysis galbana* 3011 细胞膜的部分去极化, 并改变膜的通透性, Zn²⁺ 的吸收有可能与钠通道联动有关。

关键词: 球等鞭金藻 3011; 锌离子; 流式细胞技术; 膜电位; 膜通透性

Effect of Zn²⁺ on Membrane and Membrane Permeability of *Isochrysis galbana* 3011

ZHAO Pei, WANG Xue-qing*, CHEN Qing-sen, PENG Bo-li, KANG Kai, CHEN Huan

(Tianjin Key Laboratory of Food Biotechnology, College of Biotechnology and Food Science, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China)

Abstract: Flow cytometry and fluorescence microscope were used to explore the effect of Zn²⁺ on membrane potential and membrane permeability in *Isochrysis galbana* 3011. The processed microalga were detected by flow cytometry and fluorescence microscope with DiBAC₄(3) and PI staining through single-factor tests. The statistical software of SPSS 17.0 was used for variance analysis of the data. The results showed that the membrane potential in macrophage was increased significantly and the membrane permeability was changed after stimulated with Zn²⁺ in 5 μg/L for 4 min. Therefore, a dynamic membrane status was observed and 5 μg/L Zn²⁺ could lead to partial membrane depolarization and change the membrane permeability of *Isochrysis galbana* 3011, which may be linked to sodium ion channel.

Key words: *Isochrysis galbana* 3011; Zn²⁺; flow cytometry; membrane potential; membrane permeability

中图分类号: Q949.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)05-0066-05

锌是生物体所必需的一种生命元素, 作为 50 余种酶类约 300 种酶的辅助因子, 参与蛋白质^[1]、核苷酸、糖以及脂类的代谢, 同时在基因转录、免疫调节^[2]、细胞生长^[3-4]、成熟、分化过程也扮演重要的角色^[5]。适当的剂量可以提高酶的表达量, 调节生长因子的活性^[6], 促进细胞生长^[7]。Tandogan 等^[8]也曾经观察到 Zn²⁺ 的存在对细胞中 G6PDH 酶有激活作用, 但只限于一定的浓度, 如浓度进一步加大, 对该酶的活性有抑制作用。

尽管锌是生物生长的必需微量营养素, 有关锌如何吸收和调节的机制研究相对较少。人们早已认同微藻是功能食品及药品的有效来源。因此揭示微藻利用锌的机制, 阐明活性物质代谢和转化的途径就显得尤为重要。而目前在这一方面的研究较少。

细胞膜电位和膜电阻的大小与膜完整性、通透性密切相关, 能够灵敏反映细胞生命状态或其受损程度。应用流式细胞技术(flow cytometry, FCM)对细胞膜电位和

收稿日期: 2011-04-11

基金项目: 天津市自然科学基金重点项目(08JCZDJC16600)

作者简介: 赵培(1978—), 女, 讲师, 硕士, 主要从事微藻生理生化研究。E-mail: zhaopei@tjcu.edu.cn

* 通信作者: 王雪青(1962—), 女, 教授, 博士, 主要从事微藻生理生化研究。E-mail: wangxq@tjcu.edu.cn

膜通透性变化的研究已有所报道^[9-10]。但大多数研究对象为动物细胞^[11-12]。利用FCM对荧光物质的检测,研究藻细胞对锌的不同通透性和摄取动力学的研究还未见报道,且这方面研究所展示的前景是值得期待的。故本实验以球等鞭金藻3011(*Isochrysis galbana* 3011)为生物材料,建立非创伤性藻细胞膜电位变化检测方法,研究Zn²⁺对藻细胞膜电位和膜通透性的影响,探讨其对膜电信号的影响特性,比较处理前后细胞膜电位的变化规律,从细胞水平探讨Zn²⁺的促渗机制,为揭示微藻摄取重金属离子的机理提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

球等鞭金藻3011(*Isochrysis galbana* 3011)由中国海洋大学微藻种质库惠赠。

双(1,3-二巴比妥酸)-三次甲基氧烯洛尔(DiBAC₄(3))、碘化丙啶(PI) 美国Sigma公司; ZnSO₄、KCl、KBr、NaF、SrCl₂等均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

FACSCalibur 流式细胞仪 美国BD公司; 倒置荧光显微镜 日本尼康公司; 超纯水系统 美国密里博公司; HPG-280BX 光照培养箱 哈尔滨市东联电子技术开发有限公司。

1.3 藻种活化与传代培养

预培养藻种的基础营养液配方按人工海水加f/2培养基配制,控制在20~24℃,光照周期(D:L)为12h:12h,培养基初始pH7,光照度为500~1500lx。活化3次后进行实验。

1.4 锌刺激

以f/2培养基培养*Isochrysis galbana* 3011到指数生长期,分成8组,同时分别添加一定ZnSO₄溶液,使Zn²⁺终质量浓度分别为0、5、10、20、40、80、160、320 μg/L,染色,以流式细胞仪检测膜电位和膜通透性,以荧光显微镜镜检染色后细胞状态。

1.5 流式细胞术检测

荧光染料PI用Milli-Q超纯水配制成5mg/mL,4℃避光保存,将DiBAC₄(3)溶于无水乙醇配成1mg/mL储备液,4℃避光保存。培养到指数期的样品以无菌PBS缓冲液洗涤,10000r/min离心15min,并重复2~3次,稀释成10⁶cells/mL以下,对具有*Isochrysis galbana* 3011细胞形态的细胞上样,各取1mL样品加入流式管中,以此时的荧光值作为阴性对照,以20 μg/mL终质量浓度PI染色,避光孵育15min后,上样。DiBAC₄(3)终质量浓度为2 μg/mL,避光孵育20min后,上样,每隔1min记录。DiBAC₄(3)、PI标记的同样细胞密度的上样管

为是静息膜电位作为阴性管,同样标记并分别添加一定量的ZnSO₄溶液的上样管作为阳性管。流式细胞仪系用氩离子激光激发光源,功率15mW,发射光波长488nm,DiBAC₄(3)的绿色荧光用530nm/30nm带通滤片收集,PI发出的红色荧光用585nm/42nm带通滤片收集,分析细胞数为10000,荧光强度对数模式测定。PI、DiBAC₄(3)染色时,当荧光强度大于对照细胞时认为是PI⁺、DiBAC₄(3)⁺,当荧光强度低于对照细胞时,认为染色为PI⁻、DiBAC₄(3)⁻,应用Cellquest软件(Becton Dickinson)收集、储存、处理数据。结果以染色细胞数占门内细胞数百分数表示。

1.6 荧光显微镜观察

将各组细胞样品以同样染料浓度染色后涂于玻片上,立即在玻片上观察,每隔1min照相记录。

1.7 统计学分析

实验结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用SPSS17.0软件进行统计分析。多组间比较采用方差齐性检验和单因素方差分析(One way ANOVA)。进一步进行组间两两比较时,若方差齐时,采用SNK检验;若方差不齐时,采用Games-Howell检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 FCM检测Zn²⁺对*Isochrysis galbana* 3011的影响

当细胞膜完好时,PI不能进入细胞内,当细胞凋亡或死亡后,因为细胞膜缺损而进入细胞发荧光,故检测PI的荧光强度可以作为Zn²⁺影响*Isochrysis galbana* 3011细胞膜通透性的指标。由表1可见,随Zn²⁺刺激质量浓度的增大,对细胞膜的通透性影响逐渐变大;以5 μg/L和10 μg/L Zn²⁺处理组对细胞膜的影响最显著,分别以处理6min和7min与对照组比较具有统计学意义。10 μg/L Zn²⁺处理组处理6min和7min,被PI着色的胞膜破损的细胞占门内细胞总数的0.6%~0.7%左右,且趋势为逐渐减小,可解释为对*Isochrysis galbana* 3011细胞膜通透性的影响越来越小。相反以5 μg/L的Zn²⁺加入量处理7min,被PI着色的细胞占门内细胞总数的47%左右,说明5 μg/L的Zn²⁺加入量对细胞膜通透性影响最大,细胞膜受损最严重。这些结果明显小于目前以获取生物量为培养目的的Zn²⁺加入量^[13-14],0.2~50mg/L为促进质量浓度,100mg/L以上为抑制质量浓度。

氧杂菁(oxonol)类的DiBAC₄(3)是阴离子性慢反应的亲脂性膜电位敏感荧光探针,根据其在细胞内外及线粒体内外重新分布来判断细胞膜电位的变化。细胞受到Zn²⁺刺激后,摄取DiBAC₄(3),使之与细胞内成分结合,引起细胞内荧光强度瞬时上升。当DiBAC₄(3)进入细胞内增多时,荧光强度增强,表明细胞膜电位负值减小,

表1 Zn²⁺对 *Isochrysis galbana* 3011 细胞膜通透性(PI⁺/ DiBAC₄(3)⁻)的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Table 1 Effect of Zn²⁺ on membrane permeability (PI⁺/ DiBAC₄(3)⁻) of *Isochrysis galbana* 3011 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

%

Zn ²⁺ 质量 浓度/(μg/L)	作用时间/min						
	1	2	3	4	5	6	7
0	3.9000 ± 0.07000	3.8933 ± 0.03512	4.0667 ± 0.12097	3.8767 ± 0.06110	4.0500 ± 0.10440	3.8933 ± 0.07234	3.9800 ± 0.04583
5	3.2333 ± 0.15275	3.3700 ± 0.06245	3.4800 ± 0.03000	3.5267 ± 0.08505	2.7933 ± 0.10066	3.1567 ± 0.06110	47.1933 ± 0.27934**
10	1.4700 ± 0.10583	1.0567 ± 0.16042	1.0933 ± 0.03215	1.0400 ± 0.16093	1.0700 ± 0.05568	0.7000 ± 0.05292**	0.6300 ± 0.01732*
20	1.5500 ± 0.06557	1.3600 ± 0.15524	1.5200 ± 0.31321	1.5433 ± 0.06807	1.3633 ± 0.15503	1.7567 ± 0.06028	2.0500 ± 0.04000
40	2.2000 ± 0.10000	2.5267 ± 0.09018	1.8100 ± 0.55678	2.4367 ± 0.08737	2.5300 ± 0.09849	2.6500 ± 0.07937	2.6433 ± 0.08622
80	7.4500 ± 0.09539	7.5633 ± 0.05686	7.7367 ± 0.05033	8.0533 ± 0.07024	7.3067 ± 0.01528	7.6767 ± 0.07506	7.4833 ± 0.07638
160	13.1567 ± 0.99279	13.4533 ± 0.68091	13.6700 ± 1.19113	12.8033 ± 0.74474	12.8367 ± 0.33081	12.5200 ± 0.10000	12.6467 ± 0.08386
320	15.7433 ± 0.31565	15.8833 ± 0.09504	16.0867 ± 0.21127	15.0467 ± 0.15822	15.4300 ± 0.21656	15.3333 ± 0.10970	14.6633 ± 0.07506

注: 与对照(0mg/L)组比较, *, 差异显著($P < 0.05$), **, 差异极显著($P < 0.01$)。下同。

表2 Zn²⁺对 *Isochrysis galbana* 3011 细胞膜电位(PI⁺/ DiBAC₄(3)⁻)的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Table 2 Effect of Zn²⁺ on membrane potential (PI⁺/ DiBAC₄(3)⁻) of *Isochrysis galbana* 3011 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

%

Zn ²⁺ 质量 浓度/(μg/L)	作用时间/min						
	1	2	3	4	5	6	7
0	2.5567 ± 0.08963	2.4933 ± 0.04726	2.5033 ± 0.08021	2.5100 ± 0.08000	2.5000 ± 0.08544	2.4933 ± 0.06658	2.5067 ± 0.09504
5	0.7533 ± 0.11676	1.1567 ± 0.06110	0.8700 ± 0.18193	1.4167 ± 0.11060*	14.3000 ± 0.30000**	5.2200 ± 0.20000**	0.0500 ± 0.06245*
10	0.5600 ± 0.01000	0.5367 ± 0.03786	0.4933 ± 0.08622	0.5233 ± 0.09018	0.8333 ± 0.07506	0.9633 ± 0.10599	1.5233 ± 0.28589
20	0.1567 ± 0.03055	0.5567 ± 0.06506	0.6100 ± 0.08544	0.7200 ± 0.05568	0.8100 ± 0.03000	0.8567 ± 0.06028	0.5400 ± 0.08544
40	4.8333 ± 0.07638	4.9600 ± 0.07211	4.7633 ± 0.06028	4.5367 ± 0.03215	4.1433 ± 0.04509	4.6000 ± 0.05000	3.9700 ± 0.07810
80	10.0533 ± 0.05508	9.2433 ± 0.13051	9.5700 ± 0.08544	9.2667 ± 0.06028	9.2300 ± 0.16703	8.4867 ± 0.43097	8.8700 ± 0.24637
160	13.5967 ± 0.14844	13.3533 ± 0.06506	13.4100 ± 0.18028	14.1767 ± 0.23029	13.8533 ± 0.06506	14.1033 ± 0.10693	13.6200 ± 0.07550
320	12.7833 ± 0.10066	13.5933 ± 0.04509	13.7767 ± 0.61720	14.1700 ± 0.06557	14.2800 ± 0.10536	13.9433 ± 0.05686	13.4233 ± 0.09504

细胞膜发生去极化; 反之, 当 DiBAC₄(3) 进入细胞内减少时, 荧光强度减弱, 表明细胞膜电位负值增加, 细胞膜发生超极化。由表 2 可知, 加入 5 μg/L Zn²⁺ 后, *Isochrysis galbana* 3011 细胞表现受到 Zn²⁺ 刺激后胞内荧光强度瞬时增强, 从刺激 4min 开始到 7min 结束。这一质量浓度处理组的膜电位变化与对照组之间的差异有统计学意义。其他处理组细胞内前后荧光强度并无明显的增高或降低。显示 Zn²⁺ 可引起 *Isochrysis galbana* 3011 细胞膜电位去极化, 且其效应非一定范围内随 Zn²⁺ 质量浓度变化而变化, 而是 5 μg/L Zn²⁺ 达到极值。

细胞膜安静状态下电位是内负外正, 当受到刺激之后有部分变成内正外负, 膜电位负值减小。由结果推测, Zn²⁺ 对膜电位的影响应该和两种因素有关: 电荷密度以及本身对细胞膜的作用。Zn²⁺ 首先和细胞膜接触并起作用, 使得细胞去极化, 膜电位负值降低, 而染料是带负电的, 所以在电场的驱动之下进入细胞; 但同时由于 Zn²⁺ 带正电, 这种正电的存在对去极化的结果有一定负的补偿效应。随着 Zn²⁺ 质量浓度的增大(0~5 μg/L) 其对细胞膜的作用增强, 导致其去极化效果越明显, 但同时随着电荷密度的增大, 其负的补偿效应也越不明显。这也就是表 2 中随 Zn²⁺ 质量浓度增大(5~320 μg/L)

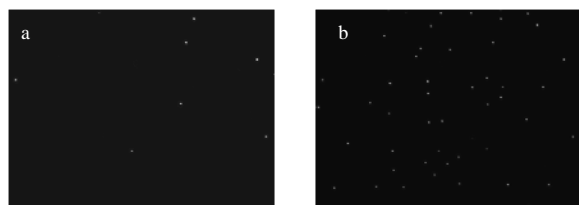
对细胞膜电位改变影响不大的原因。对于 5 μg/L Zn²⁺ 而言, 负的补偿效应最大, 这个因素占主要地位因而显示了对膜电位改变的最大值。

细胞膜电位是由于某些离子如 K⁺、Na⁺ 等在细胞膜两侧的不均衡分布, 以及这些离子在膜两侧分布发生改变而形成的, 因此凡影响到细胞膜内外离子浓度或其分布以及细胞膜状态的因素都可引起细胞膜电位的改变。由此可见 Zn²⁺ 进入藻细胞的作用机理与膜电位的改变诱发钠通道联动有关。提示钠通道可能是 Zn²⁺ 引起膜电位去极化的作用机制之一。这与有些研究显示 Zn²⁺ 诱使膜通透性转运孔的打开相似^[15]。

膜脂质组成及膜生物物理特性的改变与细胞的许多功能变化有关, 它可影响物质跨膜转运、膜结合酶活性、配体与膜受体的结合、细胞的分化与细胞识别等方面。膜电位是细胞膜上各种泵为维持细胞内外不同离子浓度梯度而形成的, 是细胞膜最重要的生物物理特性之一, 细胞跨膜电位梯度的改变, 伴有膜脂质动力学及膜脂质结构及膜特性的变化, 如膜的微黏滞性、离子通透性、膜的厚度或膜蛋白结构的变化等^[16]。目前膜电位的测定主要有 3 种方法, 分别是倒置荧光显微镜法、激光扫描共聚焦显微镜法和流式细胞技术, 都是

采用 DiBAC₄(3) 作为膜电位荧光探针。DiBAC₄(3) 染料可以快速检测膜电位的动态变化, 且不损伤细胞^[17-18]。利用荧光染料 DiBAC₄(3) 和流式细胞仪检测细胞膜电位, 这一方法具有操作简单, 重复性好的特点, 可无损伤地测定不同大小的细胞膜电位, 与离子通道特异性激动剂和拮抗剂合用, 可快速反映药物对离子通道的影响。倒置荧光显微镜法比较简单, 但缺点是无法对多个细胞进行检测; 激光扫描共聚焦显微镜法样品准备过程复杂, 实验成本高, 成像时间较长, 不利于测量膜电位的快速变化。

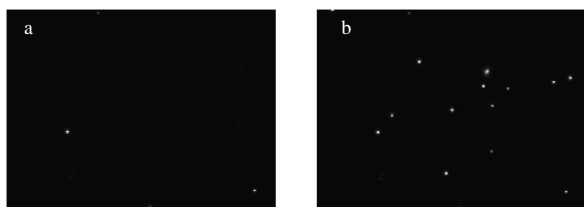
2.2 Zn²⁺ 刺激后 *Isochrysis galbana* 3011 的荧光强度检测结果



同一视野、相同绿色荧光场下的照片; a. 处理 0min; b. 处理 7min。

图1 5 µg/L Zn²⁺ 处理 *Isochrysis galbana* 3011 的 PI 单染状况

Fig.1 Fluorescent micrographs of *Isochrysis galbana* 3011 with the exposure of 5 µg/L Zn²⁺ and PI staining



同一视野、相同蓝色荧光场下的照片; a. 处理 0min; b. 处理 5min。

图2 5 µg/L Zn²⁺ 处理 *Isochrysis galbana* 3011 的 DiBAC₄(3) 单染状况

Fig.2 Fluorescent micrographs of *Isochrysis galbana* 3011 with exposure of 5 µg/L Zn²⁺ and DiBAC₄(3) staining

PI 与细胞内 DNA 和 RNA 物质相作用生成红色荧光物质, 在 Zn²⁺ 作用下膜破裂, 产生一定通透性, 细胞内含物被 PI 染成红色。DiBAC₄(3) 使细胞在蓝色光下发出绿色荧光, 去极化的细胞发出强烈的绿色荧光。DiBAC₄(3) 单染显示荧光物质充满整个细胞, 使细胞发出亮绿色而且可以非常清楚地辨别细胞形状。由图 1 可见, 处理 7min 较多细胞出现红色荧光, 说明细胞通透性受到极大影响, 这一结果与流式细胞仪的检测结果相似。相比表 1 中流式细胞仪的检测结果 5 µg/L Zn²⁺ 处理 0min 与 7min 被 PI 着色的细胞数占门内细胞数的 3% 和

47%, 这一结果与图 1 处理 0min 与 7min 能发出红色荧光的细胞数比例基本一致。由图 2 可见, 有些细胞出现绿色荧光说明这些细胞正处于去极化状态, 这一结果也与流式细胞仪的检测结果相似。在表 2 中 5 µg/L Zn²⁺ 处理 *Isochrysis galbana* 3011 0min 与 5min 通过 DiBAC₄(3) 染色细胞发生去极化的比例分别为 0.7% 和 14% 左右, 与图 2 发出绿色荧光的细胞比例基本一致。表明用荧光显微镜观察的方式进一步印证了流式细胞仪的检测结果。

3 结 论

3.1 获得了动态快速检测 *Isochrysis galbana* 3011 细胞膜电位与膜通透性变化的方法, 即 DiBAC₄(3)、PI 染色结合流式细胞仪检测与倒置荧光显微镜镜检, 可以在不损伤细胞膜的基础上更精确、更便捷地反应细胞膜电位与膜通透性的变化趋势。

3.2 5 µg/L 的 Zn²⁺ 能显著引起 *Isochrysis galbana* 3011 细胞膜的部分去极化, 并改变膜的通透性, 该结果与对照组相比具有统计学意义。

3.3 Zn²⁺ 进入藻细胞的作用机理与膜电位的改变诱发钠通道联动有关及与膜通透性转运孔的打开有关。该结果可为揭示微藻摄取重金属离子的机理, 具富锌功能性的海洋食品的研发提供参考。

参考文献:

- [1] PIFL C, WOLF A, REBERNIK P, et al. Zinc regulates the dopamine transporter in a membrane potential and chloride dependent manner[J]. Neuropharmacology, 2009, 56(2): 531-540.
- [2] GLENDEN M, BISHOP I F, SCHEIBER R D. Synergistic accumulation of iron and zinc by cultured astrocytes[J]. Journal of Neural Transmission, 2010, 117(7): 809-817.
- [3] JUNG J H, HA N K, JEAN K. Zinc (II) ion mediates tamoxifen-induced autophagy and cell death in MCF-7 breast cancer cell line[J]. Biometals, 2010, 23(6): 997-1013.
- [4] SOUZA V, ESCOBAR M C, BUCIO L, et al. Zinc pretreatment prevents hepatic stellate cells from cadmium-produced oxidative damage[J]. Cell Biology and Toxicology, 2004, 20(4): 241-251.
- [5] URANI C, MELCHIORETTO P, GRIBALDO L. Regulation of metallothioneins and ZnT-1 transporter expression in human hepatoma cells HepG2 exposed to zinc and cadmium[J]. Toxicol In Vitro, 2010, 24(2): 370-374.
- [6] BANUDEVI S, SENTHILKUMAR K, SHARMILA G. Effect of zinc on regulation of insulin-like growth factor signaling in human androgen-independent prostate cancer cells[J]. Clin Chim Acta, 2010, 411(3/4): 172-178.
- [7] AURELIE M, CELINE F, HENRI M. Response of cultured tomato cells subjected to excess zinc: role of cell wall in zinc compartmentation[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2009, 31(6): 1197-1204.
- [8] TANDOGAN B, ULUSU N N. Effects of cadmium and zinc ions on purified lamb kidney cortex glucose-6-phosphate dehydrogenase activity [J]. J Enzyme Inhib Med Chem, 2006, 21(2): 225-230.
- [9] HOWARD M, SHAPIRO. Membrane potential estimation by flow

- cytometry[J]. Methods, 2000, 21(3): 271-279.
- [10] PROSPERI E, CROCE A C, BOTTIROLI G, et al. Flow cytometric analysis of membrane permeability properties influencing intracellular accumulation and efflux of fluorescein[J]. Cytometry, 1986, 7(1): 70-75.
- [11] ARMEN V G, SIMON C L, GEORGE B, et al. The Zn^{2+} -transporting pathway in pancreatic β -cells[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(14): 9361-9372.
- [12] HJORTOE G M, HAGEL G M, TERRY B R, et al. Functional identification and monitoring of individual α and β cells in cultured mouse islets of Langerhans[J]. Acta Diabetol, 2004, 41(4): 185-193.
- [13] IVANOVA J, TONCHEVA T, CHERNEV G, et al. Effect of Ag^+ , Cu^{2+} and Zn^{2+} containing hybrid nanomatrixs on the green algae *Chlorella keissleri*[J]. Plant Physiology, 2008, 34(3/4): 339-347.
- [14] KATJA K, RENATA B, LAURA S. Effects of free Cu^{2+} and Zn^{2+} ions on growth and metal accumulation in freshwater algae[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 1997, 16(2): 220-229.
- [15] DEVINNEY M J, MALAIYANDI L M, VERGUN O, et al. A comparison of Zn^{2+} - and Ca^{2+} -triggered depolarization of liver mitochondria reveals no evidence of Zn^{2+} -induced permeability transition[J]. Cell Calcium, 2009, 45(5): 447-455.
- [16] THANOU M, KOTZE F, SCHARRINGHAUSEN A T, et al. Effect of degree of quaternization of *N*-trimethyl chitosan chloride for enhanced transport of hydrophilic compounds across intestinal caco-2 cell monolayers[J]. J Controlled Release, 2000, 64(1/3): 15-25.
- [17] WILSON H A, CHUSED T M. Lymphocyte membrane potential and Ca^{2+} sensitive potassium channels described by oxonol dye fluorescence measurements[J]. J Cellular Physiol, 1985, 125(1): 72-81.
- [18] YAMDA A, GAJA N, OHYA S, et al. Usefulness and limitation of DiBAC₄(3), a voltage sensitive fluorescent dye for the measurement of membrane potentials regulated by recombinant argonconductance Ca^{2+} activated K^+ channel in HEK293 cells[J]. J Pharmacol, 2001, 86(3): 342-350.