

论著 · 实验研究

Ghrelin 及受体 GHSR 表达变化与宫内发育受限仔鼠追赶生长的关系

杨慧明 毛萌 杨凡 杨速飞 熊菲

(四川大学华西第二医院儿科,四川 成都 610041)

[摘要] **目的** 了解 Ghrelin 及生长激素释放促分泌素受体(GHSR)表达变化与宫内发育受限(IUGR)仔鼠追赶生长的关系。**方法** 采用妊娠期食物限制法建立 IUGR 大鼠模型,孕鼠分娩后,获得限食小于胎龄(SGA)仔鼠和限食适于胎龄(AGA)仔鼠为实验组,不限食适于胎龄(AGA)仔鼠为对照组。于0、20、40日龄取胃底和下丘脑组织,实时荧光定量PCR法(real-time FQ-PCR)分别测定 Ghrelin mRNA 和 GHSR mRNA;免疫组织化学法测定 Ghrelin 蛋白和 GHSR 蛋白。**结果** 0日龄限食SGA组仔鼠胃底组织中Gherlin mRNA 和蛋白表达均高于限食AGA组和对照组,下丘脑GHSR mRNA 的表达低于限食AGA组和对照组;20日龄SGA组追赶生长仔鼠胃底 Ghrelin 蛋白、下丘脑GHSR mRNA和蛋白的表达高于SGA未追赶生长和对照组仔鼠;40日龄时3组间则差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** Ghrelin-GHSR可能参与了宫内IUGR胎鼠的生理调节或病理过程,且可能在出生后参与了SGA个体早期追赶生长的调控。

[中国当代儿科杂志,2010,12(7):563-568]

[关键词] 宫内发育受限; Ghrelin; 生长激素释放促分泌素受体; 追赶生长;大鼠
[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)07-0563-06

Relationship between Ghrelin and growth hormone secretagogue receptor expression and catch-up growth in rats with intrauterine growth restriction

YANG Hui-Ming, MAO Meng, YANG Fan, YANG Su-Fei, XIONG Fei. Department of Pediatrics, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China (Mao M, Email: yanghuiming03@163.com)

Abstract: Objective To study the relationship between Ghrelin and growth hormone secretagogue receptor (GHSR) expression and the catch-up growth in rats with intrauterine growth restriction (IUGR). **Methods** The rat model of IUGR was established by food restriction during pregnancy. The small for gestational age (SGA) and appropriate for gestational age (AGA) rat pups from the pregnant rats were used as the experimental group. The AGA rat pups from the pregnant rats without food restriction served as the control group. The samples from the stomach fundus and hypothalamus were taken postnatal days 0, 20 and 40. Ghrelin mRNA and GHSR mRNA expression were determined by real-time fluorescence quantitative PCR (real-time FQ-PCR). Ghrelin protein and GHSR protein expression were examined by immunohistochemistry (IHC). **Results** At postnatal day 0, both Gherlin mRNA and protein levels in the stomach fundus were significantly higher, while GHSR mRNA expression in the hypothalamus were significantly lower in SGA rats from food restriction group than those in AGA rats from restriction and control groups. At postnatal day 20, the ghrelin protein expression in the stomach of fundus, and GHSR mRNA and protein expression in the hypothalamus in SGA catch-up rats were significantly higher than those in SGA non-catch-up growth rats and AGA rats from the control group. At postnatal day 40, there were no significant differences among SGA catch-up growth rats, SGA non-catch-up growth rats and normal AGA rats. **Conclusions** Ghrelin-GHSR might be involved in the physiological regulation and pathological process in IUGR rats. It is also possibly involved in the regulation of catch-up growth in the early life of SGA rats.

[Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12 (7):563-568]

Key words: Intrauterine growth restriction; Ghrelin; Growth hormone secretagogue receptor; Catch-up growth; Rats

[收稿日期]2009-12-29;[修回日期]2010-01-25
[作者简介]杨慧明,女,博士,副主任医师。
[通信作者]毛萌,教授。

母体、胎儿、胎盘的不利因素如妊娠期营养不良、感染、缺氧或内分泌失衡等会导致胎儿宫内发育受限 (intrauterine growth restriction, IUGR), 分娩出小于胎龄儿 (small for gestational age, SGA)。婴儿出生后, 大多数 SGA 将超过相应年龄的正常速度加速生长, 以追赶到原有的生长轨道上, 这一现象被称为追赶生长 (catch-up growth)。但约 8% ~ 20% 的 SGA 不发生追赶生长, 成人期身高仍低于正常。1999 年由 Kojima 等^[1]从大鼠胃组织中发现的含 28 个氨基酸的多肽 Ghrelin 是一种生长激素释放促分泌素受体 (growth hormone secretagogue receptor, GHSR) 的内源性配体, 具有强效的促生长激素 (growth hormone, GH) 释放功能。Ghrelin 主要由胃底细胞分泌, 通过 GHSR 发挥作用, 可使循环中 GH 迅速、显著而持久地增加^[2,4]。GHSR 是一种 α 螺旋 7 次跨膜的 G 蛋白偶联受体, 广泛分布于中枢神经系统及外周组织^[5], GHSR mRNA 在下丘脑有高水平的表达。研究认为 Ghrelin 与存在于下丘脑的能量代谢控制中心以及腹外侧区 (VTA) 的 GHSR 神经元结合, 以 GHSR 依赖的方式激活多巴胺神经元活性, 促进突触形成和多巴胺的循环代谢^[6], 从而发挥效应。

由于 Ghrelin 有促 GH 分泌的作用, 同时具有调节能量代谢的作用, 因此 Ghrelin 及其受体 GHSR 在组织中的表达水平是否对 SGA 个体生长发育过程产生影响, 值得深入研究。本研究通过食物限制法建立 IUGR 大鼠模型, 获取 SGA 和适于胎龄 (appropriate for gestational age, AGA) 仔鼠, 分别采用实时荧光定量 PCR 法 (real-time fluorescence quantitative PCR) 测定 Ghrelin mRNA 和 GHSR mRNA; 免疫组织化学法 (immunohistochemistry, IHC) 测定 Ghrelin 和 GHSR 蛋白在各组仔鼠胃底和下丘脑中的表达, 以初步了解 Ghrelin 及 GHSR 与 SGA 个体出生后的生长发育和追赶生长的关系。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

Gel Doc 1000 凝胶成像系统 (美国 BIO-RAD 公司), FTC2000 型实时荧光定量基因扩增仪 (加拿大枫岭公司), Image-Pro Plus 图像分析系统 (美国 Media Cybernetics 公司), Trizol (美国 MRC 公司), Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit、TaqDNA 聚合酶、dNTP、T4 DNA Ligase、限制性内切酶 (立陶宛 MBI 公司), 琼脂糖凝胶回收试剂盒、产物纯化试

剂盒 (美国 Omega 公司), Marker (北京天为时代), 兔抗人、兔、大鼠、小鼠等 Ghrelin 多克隆抗体 (武汉博士德公司), GHSR 多克隆抗体 (美国 Santa 公司), 生物素标记山羊抗小鼠 IgG (武汉博士德公司), 免疫组化 SP 染色试剂盒 (北京中山生物技术有限公司)。

1.2 动物模型建立及分组

采用妊娠期食物摄入限制法建立 IUGR 大鼠模型 (即一组孕鼠妊娠第 0 ~ 6 天予任意摄取饲料, 从妊娠第 7 天起直至分娩, 均给予对照组饲料量的 30%); 另一组孕鼠妊娠期限食作为对照组, 待其分娩后获得 AGA 仔鼠。各组孕鼠自然分娩后, 电子天平测量新生鼠体重, 精确至 0.001 g。计算出对照组新生鼠体重均数 ($\bar{x}$) 和标准差 (SD), 凡体重低于 $\bar{x} - 2$ SD 的新生鼠确定为 SGA 鼠。活产仔鼠分为限食 SGA 组和限食 AGA 组, 不限食 AGA 仔鼠为对照组, 对各组进行标记。各组仔鼠分别喂养至 40 日龄, 喂养期间, 隔日测量仔鼠体重, 方法同前。至处死之日, SGA 仔鼠中体重大于或等于同日龄仔鼠体重 $\bar{x} - 2$ SD 者为追赶生长仔鼠, 体重仍低于同日龄仔鼠体重 $\bar{x} - 2$ SD 者为未追赶生长仔鼠。

1.3 Ghrelin mRNA 和 GHSR mRNA 的检测

1.3.1 取胃底组织和下丘脑组织 在限食 SGA 组、限食 AGA 组和对照组仔鼠分别为 0 日龄、20 日龄、40 日龄时, 每组随机抽取仔鼠 10 只, 测量并记录体重、身长、尾长后, 断头处死, 低温下分离组织, 根据《大鼠脑组织定位图谱》定位, 切取下丘脑组织, 并剪取胃底组织约 30 ~ 50 mg, 分别放入低温保存的装有 1 mL Trizol 试剂的 1.5 ml EP 管中, -80℃ 冰冻保存, 用于 RNA 提取。同时另取一部分下丘脑和胃底组织放置于 4% 中性甲醛固定液中 4℃ 固定 24 ~ 48 h, 用于组织切片。

1.3.2 提取 RNA 及实时荧光定量 PCR 在无 RNA 酶的环境下制备组织匀浆, 并加入变性液。经酚-氯仿将 RNA 抽提至水相, 与 DNA 和蛋白质分离, 经异丙醇沉淀回收总 RNA。采用 MBI 公司的 Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit, 逆转录合成 cDNA, 在 PCR 仪上进行扩增, PCR 反应体系: 10 × buffer (Mg^{2+} free) 3 μ L, $MgCl_2$ (25mM) 3 μ L, dNTP (25mM) 0.36 μ L, 上游引物 (10 μ M) 1 μ L, 下游引物 (10 μ M) 1 μ L, Taq DNA 合成酶 (5 u/ μ L) 0.3 μ L, ddH₂O 17.54 μ L, cDNA 5 μ L, 条件: 94℃ 2 min, 94℃ 20 s, 54℃ 20 s, 72℃ 30 s, 80℃ 20 s。Ghrelin、GHSR 和内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 基因序

列查自 Genbank (序列号依次为: 59301, 84022, 24383), 上下游引物均由上海生物工程有限公司设计合成。Ghrelin: 上游引物: 5'-CAGAAAGCCCAG-CAGAGAAA-3', 下游引物: 5'-GAAGGGAGCATT-GAACCTGAT-3'。GHSR: 上游引物: 5'-TCTTCTGC-CTCACTGTGCTC -3', 下游引物: 5'-ACCACCACAG-CAAGCATCTT -3'。GAPDH: 上游引物: 5' -CATG-GTCTACATGTTCAGT -3', 下游引物: 5' -GGCTA-AGCAGTTGCTGGTGC -3'。用假定初始拷贝数(X)的 cDNA 模板按 10 倍梯度进行稀释, 制成标准模板系列, 自每个稀释模板中取样 5 μ L, 分别加入 30 μ L 的反应体系中, 行实时荧光定量 PCR, 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 20 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 45 个循环。将逆转录得到的 cDNA 样品中各取 5 μ L, 在同样的反应条件下行 PCR 扩增。收集数据, 绘制动力学曲线。测定各样品的达到荧光域值的循环数(cycle threshold, Ct) Ct 值, 计算出待测样品的相对拷贝数。

1.4 Ghrelin 和 GHSR 蛋白的检测

1.4.1 制片 将在甲醛液中固定好的下丘脑和胃底组织取出, 梯度脱水, 石蜡包埋, 组织切片, 厚度为 4~5 μ m, 脱蜡和水化, 按说明书操作进行免疫组织化学染色, 中性树胶封片。

1.4.2 光镜下观察免疫组化染色结果 在显微图像采集系统内观察各组切片 IHC 的表达情况, 每张切片在相同倍数下(40 $\times$ 10)随机采集 6 个不同视野作为数字图像, 采用 image-pro plus 5.0 软件进行图象分析, 测定反应阳性部位的积分光密度值(integral optical density, IOD)。

1.5 统计学分析

所有实验数据用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理, 结果用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。对所得数据进行方差分析和组间两两比较, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 SGA 和 AGA 仔鼠胃底 Gherlin mRNA 表达

限食 SGA 组 0 日龄仔鼠胃底组织中 Gherlin mRNA 表达高于限食 AGA 组 0 日龄仔鼠及对照组 0 日龄 AGA 仔鼠, 差异有统计学意义, $P<0.05$; 其余各组间胃底组织中 Gherlin mRNA 表达两两比较差异无统计学意义, $P>0.05$ 。结果见表 1。

2.2 SGA 和 AGA 仔鼠下丘脑 GHSR mRNA 表达

限食 SGA 组 0 日龄仔鼠下丘脑 GHSR mRNA 的表达低于限食 AGA 组 0 日龄仔鼠和对照组 0 日龄 AGA 仔鼠, 差异有统计学意义, $P<0.05$; 限食

SGA 组 20 日龄追赶生长仔鼠下丘脑 GHSR mRNA 的表达高于限食 SGA 组未追赶生长 20 日龄仔鼠及对照组 20 日龄 AGA 仔鼠, 差异有统计学意义, $P<0.05$ 。其余各组间两两比较差异无统计学意义, $P>0.05$ 。结果见表 2。

2.3 各组胃底 Ghrelin 免疫染色及阳性细胞 IOD 值比较

限食 SGA 组 0 日龄仔鼠胃底组织中 Ghrelin 免疫阳性细胞的 IOD 值高于限食 AGA 组 0 日龄仔鼠及对照组 0 日龄仔鼠, 差异有统计学意义, $P<0.05$; 限食 SGA 组追赶生长 20 日龄仔鼠胃底组织中 Ghrelin 免疫阳性细胞的 IOD 值高于限食 SGA 组未追赶生长 20 日龄仔鼠及对照组 20 日龄仔鼠, 差异有统计学意义, $P<0.05$; 其余各组间两两比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 3 和图 1。

2.4 各组下丘脑 GHSR 免疫染色及阳性细胞 IOD 值比较

限食 SGA 组 20 日龄追赶生长仔鼠下丘脑中 GHSR 免疫阳性细胞的 IOD 值高于限食 SGA 组未追赶生长仔鼠及对照组 AGA 仔鼠, 差异有统计学意义, $P<0.05$; 其余各组间两两比较差异无统计学意义, $P>0.05$ 。见表 4 和图 2。

表 1 胃底 Gherlin mRNA 表达 ($\bar{x}\pm s$)

组别	仔鼠数(只)	0 日龄	20 日龄	40 日龄
对照组	10	0.50 $\pm$ 0.08	0.82 $\pm$ 0.11	0.88 $\pm$ 0.09
限食 AGA 组	10	0.52 $\pm$ 0.10		
限食 SGA 组 (未追赶生长)	10		0.87 $\pm$ 0.07	0.91 $\pm$ 0.12
限食 SGA 组 (追赶生长)	10		0.84 $\pm$ 0.11	0.90 $\pm$ 0.13
限食 SGA 组	10	0.93 $\pm$ 0.14 ^{a,b}		
F 值		197.98	4.36	3.85
P 值		<0.001	0.053	0.07

a : 与对照组 0 日龄仔鼠比较, $P<0.05$; b: 与限食 AGA 组 0 日龄仔鼠比较, $P<0.05$ 。

表 2 下丘脑 GHSR mRNA 表达 ($\bar{x}\pm s$)

组别	仔鼠数(只)	0 日龄	20 日龄	40 日龄
对照组	10	0.90 $\pm$ 0.15	0.84 $\pm$ 0.11	0.73 $\pm$ 0.10
限食 AGA 组	10	0.90 $\pm$ 0.08		
限食 SGA 组 (未追赶生长)	10		0.87 $\pm$ 0.12	0.72 $\pm$ 0.07
限食 SGA 组 (追赶生长)	10		1.25 $\pm$ 0.21 ^{c,d}	0.72 $\pm$ 0.09
限食 SGA 组	10	0.45 $\pm$ 0.02 ^{a,b}		
F 值		82.37	102.46	4.11
P 值		<0.001	<0.001	0.06

a : 与对照组 0 日龄仔鼠比较, $P<0.05$; b: 与限食 AGA 组 0 日龄仔鼠比较, $P<0.05$; c: 与对照组 20 日龄仔鼠比较, $P<0.05$; d: 与限食 SGA 组未追赶生长 20 日龄仔鼠比较, $P<0.05$ 。

表 3 胃底 Ghrelin 免疫阳性细胞的 IOD 值 ($\bar{x} \pm s$)				
组别	仔鼠数(只)	0 日龄	20 日龄	40 日龄
对照组	10	267 ± 19	3 842 ± 105	9 136 ± 207
限食 AGA 组	10	276 ± 14		
限食 SGA 组(未追赶生长)	10		3 956 ± 91	8 963 ± 359
限食 SGA 组(追赶生长)	10		4 678 ± 124 ^{a,c}	9 208 ± 207
限食 SGA 组	10	447 ± 30 ^{a,b}		
<i>F</i> 值		142.004	117.557	1.981
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	0.172

a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与限食 AGA 组比较, $P < 0.05$; c: 与限食 SGA 组未追赶生长仔鼠比较, $P < 0.05$ 。

表 4 下丘脑 GHSR 免疫阳性细胞的 IOD 值 ($\bar{x} \pm s$)				
组别	仔鼠数(只)	0 日龄	20 日龄	40 日龄
对照组	10	3 479 ± 87	12 473 ± 420	51 644 ± 1 293
限食 AGA 组	10	3 532 ± 116		
限食 SGA 组(未追赶生长)	10		12 353 ± 354	52 344 ± 1 720
限食 SGA 组(追赶生长)	10		13 208 ± 386 ^{a,b}	51 560 ± 665
限食 SGA 组	10	3 431 ± 86		
<i>F</i> 值		1.630	8.528	0.658
<i>P</i> 值		0.229	0.003	0.532

a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与限食 SGA 组未追赶生长 SGA 仔鼠比较, $P < 0.05$ 。

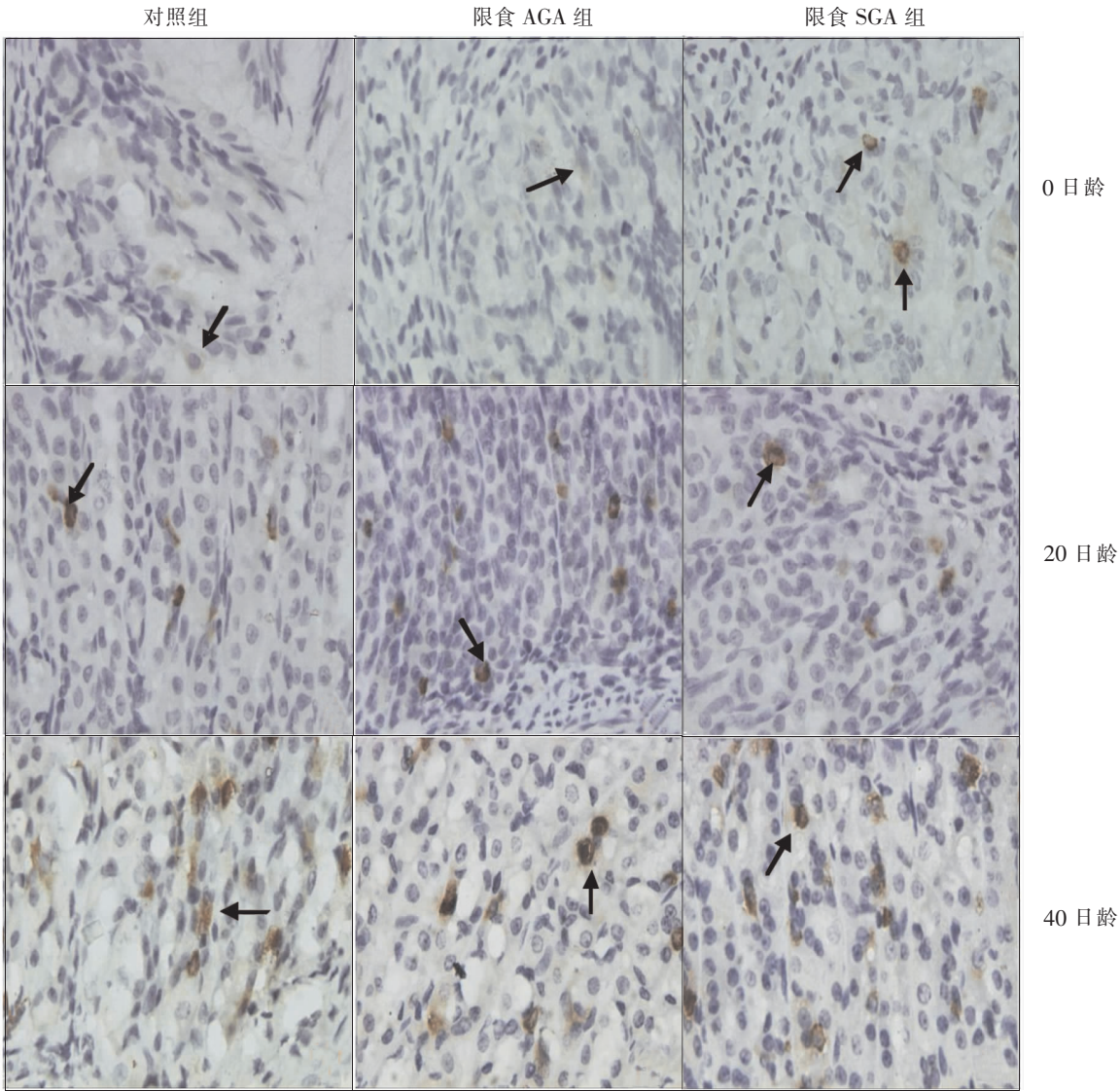


图 1 各组仔鼠胃底 Ghrelin 免疫染色结果(IHC, ×400) 胞浆中出现的黄色 - 棕褐色颗粒物质为 Ghrelin 免疫染色阳性。箭头所指为染色阳性细胞。0 日龄仔鼠中限食 SGA 组 Ghrelin 蛋白表达强度高于其余两组,20 日龄仔鼠中限食 SGA 追赶生长组 Ghrelin 蛋白表达强度高于其余两组。40 日龄仔鼠中 3 组无明显差异。

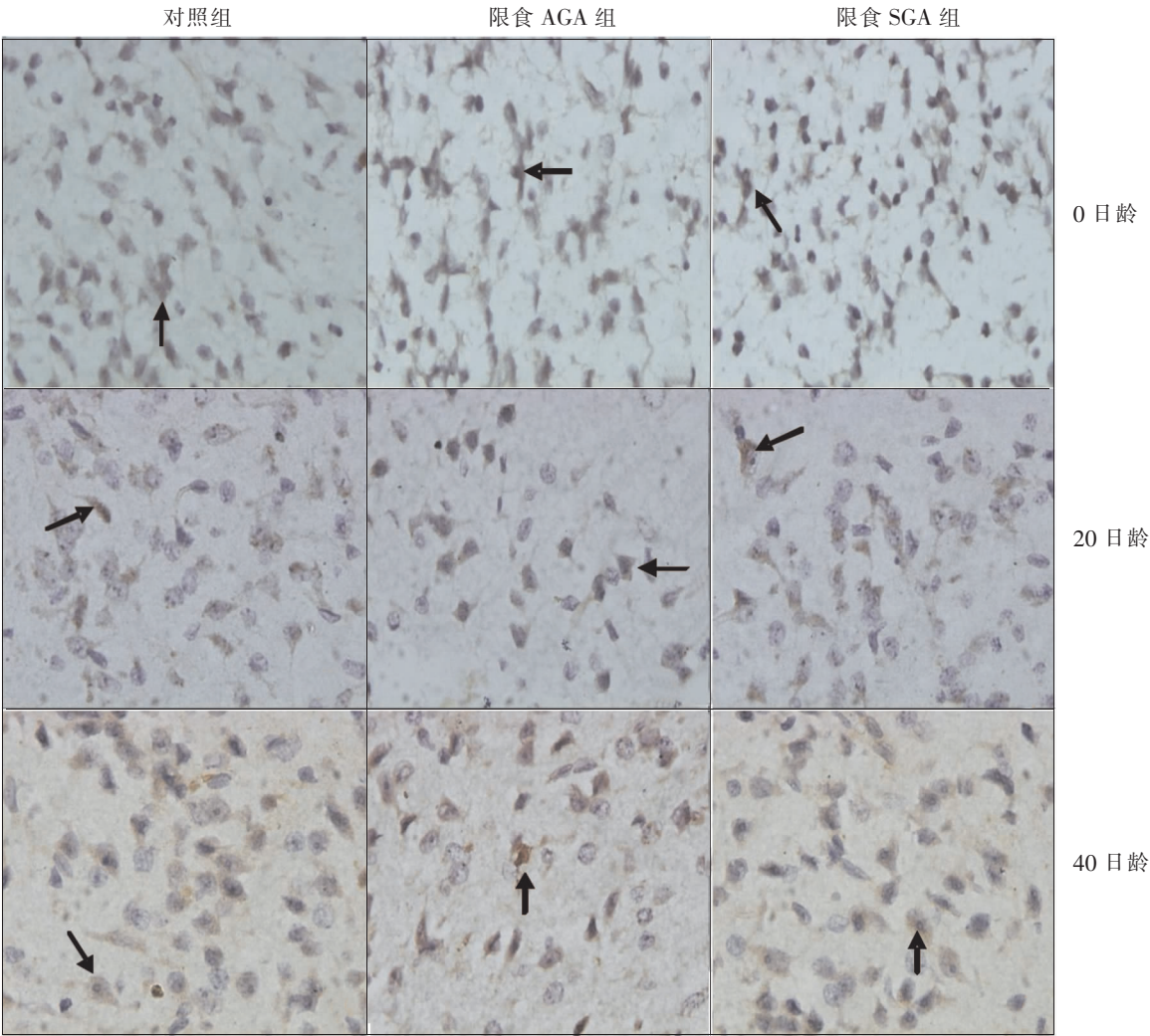


图 2 各组仔鼠下丘脑 GHSR 免疫染色结果(IHC, ×400) 胞浆中出现的黄色 - 棕褐色物质为 GHSR 免疫染色阳性。箭头所指为染色阳性细胞。20 日龄仔鼠中限食 SGA 追赶生长组 GHSR 蛋白表达强度高于其余两组。0 日龄和 40 日龄仔鼠中 3 组无明显差异。

3 讨论

大量动物试验表明,Ghrelin 参与了机体能量平衡的调节。Ghrelin 是一种主要由胃分泌的脑肠肽,联系胃肠道、垂体和下丘脑,发挥对能量平衡的调节作用,是一种生理性的食欲诱导剂^[7]。人类胎儿期至生后 1 岁以内,营养对生长的作用主要是通过营养物质 - 胰岛素 - 胰岛素样生长因子代谢轴调控而实现的。自 Ghrelin 被发现起,日渐增多的证据提示 Ghrelin 在能量不足的状态下可能担当了信号传导和信号反馈的角色^[8-9]。

除了促进食欲,调节能量代谢以外,Ghrelin 另一种重要的生理功能是通过其受体 GHSR 促进 GH 的分泌。无论脑室内给药、静脉注射还是腹腔

内给药,均有很强的促 GH 释放作用。同时,高剂量的 GH 也具有对 Ghrelin 反馈抑制作用^[10]。近年来发现生后未追赶生长的 SGA 的身高通过外源性 GH 介入治疗可得到提高^[11-12]。对 Ghrelin-GHSR 的生理作用及其机制的研究有助于了解机体对 GH 轴的调节以及 Ghrelin 在 GH 轴中所扮演的角色。

一些研究发现人类 SGA 的脐血中 Ghrelin 水平高于 AGA 婴儿,且与出生体重呈负相关;对人类的前瞻性队列研究显示宫内发育受限的胎儿的生长激素-胰岛素样生长因子 (GH-IGF) 轴发生了改变,Ghrelin 水平显著上升^[13]。Gohlke 等^[14]对单卵双生子的研究结果提示 Ghrelin 可能参与了出生后的追赶生长。

本研究发现,对照组仔鼠 Ghrelin mRNA 和蛋白在胃粘膜中的表达随日龄增加而增加,这与 Lee

等^[15]观察到的出生后胃内 Ghrelin 表达水平持续上升的现象是一致的。

0 日龄的限食 SGA 组仔鼠胃粘膜中 Ghrelin 基因和蛋白的表达均高于限食组和对照组的 AGA 仔鼠,下丘脑 GHSR mRNA 的表达却低于限食组 AGA 和对照组 AGA 仔鼠,提示在 IUGR 胎儿对宫内营养不良的适应过程中,Ghrelin-GHSR 可能参与了其中的生理调节或病理过程,或是宫内的营养状况和环境对胎鼠胃粘膜中分泌 Ghrelin 的细胞产生了影响,使得 Ghrelin 表达上调,分泌增多;而下丘脑中 GH-SR mRNA 表达降低,可能是因为妊娠期营养不良对胎儿不同器官的影响程度不同,对某些脑细胞功能的影响较大。

20 日龄的限食 SGA 组追赶生长仔鼠胃底 Ghrelin 蛋白、下丘脑 GHSR mRNA 和蛋白表达均明显增高,高度提示在仔鼠的早期生长发育过程中,Ghrelin-GHSR 系统可能对 SGA 追赶生长起到一定促进作用。当生长到 40 日龄时,追赶生长仔鼠、未追赶生长仔鼠和对照组的 Ghrelin 和 GHSR 基因及蛋白表达水平均未发现差异,提示 Ghrelin-GHSR 系统调控体格生长,促进追赶生长的重要阶段应该是在仔鼠 40 日龄以前。但 Ghrelin-GHSR 调节追赶生长的具体机制以及是否有其他内分泌因素参与调控尚待进一步研究。

[参 考 文 献]

[1] Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach[J]. Nature, 1999, 402(6762):656-660.

[2] Takahashi H, Kurose Y, Kobayashi S, Sugino T, Kojima M, Kangawa K, et al. Ghrelin enhances glucose-induced insulin secretion in scheduled meal-fed sheep[J]. J Endocrinol, 2006,189(1): 67-75.

[3] Vestergaard ET, Hansen TK, Gormsen LC, Jakobsen P, Moller N, Christiansen JS, et al. Constant intravenous ghrelin infusion in healthy young men: clinical pharmacokinetics and metabolic effects[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007, 292(6): E1829-1836.

[4] Iqbal J, Kurose Y, Canny B, Clarke IJ. Effects of central infusion of ghrelin on food intake and plasma levels of growth hormone,

luteinizing hormone, prolactin, and cortisol secretion in sheep [J]. Endocrinology, 2006, 147(1): 510-519.

[5] Zigman JM, Jones JE, Lee CE, Saper CB, Elmquist JK. Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain[J]. J Comp Neurol, 2006, 494(3):528-548.

[6] Abizaid A, Liu ZW, Andrews ZB, Shanabrough M, Borok E, Elsworth JD, et al. Ghrelin modulates the activity and synaptic input organization of midbrain dopamine neurons while promoting appetite[J]. J Clin Invest, 2006, 116(12):3229-3239.

[7] Drazen DL, Vahl TP, D'Alessio DA, Seeley RJ, Woods SC. Effects of a fixed meal pattern on ghrelin secretion:Evidence for a learned response independent of nutrient status[J]. Endocrinology, 2006, 147(1): 23-30.

[8] Zigman JM, Nakano Y, Coppari R, Balthasar N, Marcus JN, Lee CE, et al. Mice lacking ghrelin receptors resist the development of diet-induced obesity[J]. J Clin Invest, 2005, 115(12):3564-3572.

[9] Wang X, Liang L, Du L. The effects of intrauterine undernutrition on pancreas ghrelin and insulin expression in neonate rats[J]. J Endocrinol, 2007, 194(1): 121-129.

[10] Vestergaard ET, Dall R, Lange KH, Kjaer M, Christiansen JS, Jorgensen JO. The ghrelin response to exercise before and after growth hormone administration [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2007, 92(1): 297-303.

[11] Vickers MH, Hofman PL, Gluckman PD, Lobie PE, Cutfield WS. Combination therapy with acipimox enhances the effect of growth hormone treatment on linear body growth in the normal and small-for-gestational-age rat[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006, 291(6): E1212-E1219.

[12] Lagrou K, Vanderfaeillie J, Froidecoeur C, Thomas M, Massa G, Tenoutasse S, et al. Effect of 2 years of high-dose growth hormone therapy on cognitive and psychosocial development in short children born small for gestational age[J]. Eur J Endocrinol, 2007, 156(2):195-201.

[13] Chiesa C, Osborn JF, Haass C, Natale F, Spinelli M, Scapillati E,et al. Ghrelin, leptin, IGF-I, IGFBP-3, and insulin concentrations at birth: is there a relationship with fetal growth and neonatal anthropometry? [J]. Clin Chem, 2008, 54(3): 550-558.

[14] Gohlke BC, Huber A, Hecher K, Fimmers R, Bartmann P, Roth CL. Fetal insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II, and ghrelin in association with birth weight and postnatal growth in monozygotic twins with discordant growth[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2005, 90(4): 2270-2274.

[15] Lee HM, Wang G, Englander EW, Kojima M, Greeley GeorgeH Jr. Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric distribution, ontogeny, influence of endocrine, and dietary manipulations[J]. Endocrinology, 2002, 143(1):185-190.

(本文编辑:黄 榕)