

论著·实验研究

孕鼠叶酸缺乏对子鼠胰岛素样生长因子系统甲基化的影响

吴蒙蒙 杨凡 屈艺 母得志

(四川大学华西第二医院儿科 / 出生缺陷与相关妇儿疾病教育部重点实验室, 四川 成都 610041)

[摘要] **目的** 观察孕期叶酸缺乏对胎鼠生长发育及胰岛素样生长因子(IGF)系统甲基化的影响。**方法** 将22只Sprague-Dawley雌鼠随机分为叶酸缺乏组($n=12$)和正常对照组($n=10$),分别喂养叶酸缺乏饲料和普通饲料,2周后与雄鼠交配,两组各8只雌鼠成功受孕,于怀孕第20天对孕鼠剖腹取胎,每组取32只胎鼠测量其头尾长、体重。两组分别另取8只胎鼠,采用ELISA法对其脑、肝脏组织中的叶酸、IGF-1、胰岛素样生长因子结合蛋白(IGFBP)-3水平进行检测。两组分别另取3只胎鼠,使用全基因组甲基化测序方法检测其脑、肝脏组织IGF系统的甲基化情况。同时采用ELISA法对两组孕鼠血清IGF-1、IGFBP-3水平进行检测。**结果** 叶酸缺乏组胎鼠头尾长、体重较正常对照组降低($P<0.05$);叶酸缺乏组孕鼠血清IGF-1、IGFBP-3与胎鼠脑、肝脏组织中的叶酸、IGFBP-3水平均低于正常对照组($P<0.05$);叶酸缺乏组胎鼠脑组织中IGF-1R、IGF-2R、IGFBP-2、IGFBP-5、IGFBP-6、IGFBP-7的甲基化水平均高于正常对照组($P<0.05$);而在肝脏组织中,相比于正常对照组,叶酸缺乏组胎鼠IGF-1R、IGF-2R、IGFBP-3、IGFBP-5甲基化水平增加,IGF-2甲基化水平则下降($P<0.05$)。**结论** 孕鼠叶酸缺乏会影响胎鼠宫内的生长发育,其机制可能与胰岛素生长因子系统的甲基化异常有关。**[中国当代儿科杂志, 2017, 19(4): 470-474]**

[关键词] 叶酸缺乏;胰岛素样生长因子;DNA甲基化;胎鼠

Effects of maternal folate deficiency on the methylation of insulin-like growth factor system in the offspring rats

WU Meng-Meng, YANG Fan, QU Yi, MU De-Zhi. Department of Pediatrics, West China Second University Hospital, Sichuan University/Key Laboratory of Birth Defects and Related Diseases of Women and Children (Sichuan University), Ministry of Education, Chengdu 610041, China (Yang F, Email: 506742295@qq.com)

Abstract: Objective To study the effects of maternal folate deficiency on fetal growth and development and the methylation profiles of insulin-like growth factor system in the offspring rats. **Methods** Twenty-two Sprague-Dawley female rats were randomly assigned to two groups: a folate deficient group ($n=12$) and a control group ($n=10$). They were fed with folate deficient and normal diet respectively. Dams were mated after 2 weeks of feeding. Eight female rats from each group were pregnant. On the 20th day of gestation, the fetuses were delivered by caesarean section. Thirty-two fetal rats from each group were randomly selected and the body length and weight were measured. Eight fetal rats from each group were randomly selected and ELISA was used to measure the level of folate content, IGF-1 and IGFBP-3 in the fetal brain and liver. Three fetal rats from each group were randomly selected and methylated DNA immunoprecipitation sequencing (MeDIP-Seq) was used to detect the methylation level of insulin-like growth factor system in the fetal brain and liver. ELISA was used to measure the level of IGF-1 and IGFBP-3 in the maternal serum from both groups. **Results** The mean fetal length and weight were lower in the folate deficient group than in the control group ($P<0.05$). The levels of IGF-1 and IGFBP-3 in the maternal serum, as well as folate content and IGFBP-3 in the fetal brain and liver were significantly lower in the folate deficient group than in the control group ($P<0.05$). The methylation levels of IGF-1R, IGF-2R, IGFBP-2, IGFBP-5, IGFBP-6 and IGFBP-7 in the fetal brain were higher in the folate deficient group

[收稿日期] 2016-12-04; [接受日期] 2017-03-02

[基金项目] 国家自然科学基金(81330016; 81270724; 81630038); 四川省科技厅应用基础研究项目(2010JY0059); 四川省科技厅基金(2014SZ0149; 2016TD0002)。

[作者简介] 吴蒙蒙,女,硕士研究生。

[通信作者] 杨凡,女,教授。

than in the control group ($P<0.05$). The methylation levels of IGF-1R, IGF-2R, IGFBP-3 and IGFBP-5 in the fetal liver were higher in the folate deficient group than in the control group. The methylation of IGF-2 gene showed a significant reduction in the folate deficient group ($P<0.05$). **Conclusions** Maternal folate deficiency may cause retardation of growth and development of the offspring, which is possibly associated with the changes of methylation profiles of insulin-like growth factors. [Chin J Contemp Pediatr, 2017, 19(4): 470-474]

Key words: Folate deficiency; Insulin-like growth factors; DNA methylation; Fetal rats

在体内, 叶酸主要参与氨基酸的相互转换、DNA 合成、甲基化反应等多种重要的代谢过程, 与细胞增殖、分化密切相关^[1]。研究表明, 孕期叶酸缺乏可引起子代多种先天畸形的发生, 如唇腭裂、神经管畸形等, 孕期叶酸补充可降低神经管畸形的发生率, 但并不能完全阻止神经管畸形的发生, 提示可能有其他的机制参与。近年来随着表观遗传学研究的深入, 越来越多的证据表明, 孕期叶酸缺乏可通过改变子代基因组 DNA 甲基化模式而对其生长发育造成影响^[2-3]。DNA 甲基化是表观遗传学的重要组成部分, 在维持基因组稳定, 调控胚胎正常发育等方面起着重要作用^[4]。胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factors, IGFs) 是一类与细胞增殖、分化、凋亡等功能密切相关的生长调控因子, 由具有特定功能的配体 (IGF-1、IGF-2)、受体 (IGF-1R、IGF-2R) 及胰岛素样生长因子结合蛋白 (IGFBPs) 组成^[5]。IGFs 是胚胎和出生后生长的重要调控因子, 在生长发育中起着至关重要的作用。迄今, 关于叶酸缺乏与 IGFs 间的关系研究很少, 本实验通过构建叶酸缺乏的孕鼠模型, 观察围孕期叶酸缺乏对胎鼠生长发育的影响, 通过甲基化免疫共沉淀高通量测序技术 (MeDIP-seq), 探索叶酸缺乏组和正常对照组胎鼠的 IGFs 相关基因的 DNA 甲基化差异, 同时检测孕鼠血清和胎鼠脑、肝脏组织中的 IGF-1、IGFBP-3 因子水平, 初步探讨 IGFs 表达变化在孕鼠叶酸缺乏所致子代生长发育异常中的作用。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

健康清洁级未经产成年 Sprague-Dawley (SD) 雌鼠 22 只及其饲料均购自成都达硕生物科技有限公司。叶酸、大鼠 IGF-1、大鼠 IGFBP-3 酶联免疫吸附测定试剂盒均购自武汉伊莱瑞特生物科技有限公司。

1.2 动物模型的制备

将 22 只 SD 雌鼠随机分为叶酸缺乏组 ($n=12$) 和正常对照组 ($n=10$)。叶酸缺乏组大鼠喂养饲料是在正常对照组基础上剔除叶酸, 两组饲料配方详见表 1^[5]。两组大鼠均自由饮水和进食, 在喂养 2 周后与未行饮食干预的正常成年 SD 雄鼠 1:1 合笼交配。每日下午 18:00 合笼, 次日上午 7:00~8:00 抽取雌鼠阴道分泌物于载玻片上, 显微镜下观察到精子的当日计为孕第 0 天, 随即转入普通饲养笼中, 继续喂饲各组相应饲料直至取材。

表 1 两组大鼠饲料的组成成分 (g/kg)

饲料成分	正常对照组	叶酸缺乏组
淀粉	380.5	380.5
氨基酸混合物	200.0	200.0
糊化淀粉	152.0	152.0
蔗糖	100.0	100.0
豆油	70.0	70.0
纤维	50.0	50.0
矿物质混合物	35.0	35.0
维生素混合物	10.0	—
剔除叶酸的维生素混合物	—	10.0
胆碱酒石酸盐	2.5	2.5

1.3 标本采集及实验记录

两组雌鼠均于孕第 20 天称重后, 腹腔注射 10% 水合氯醛 (3.33 mL/kg) 麻醉, 剖腹取胎; 然后快速剪开胸腔, 暴露心脏, 孕鼠心脏穿刺取血, 室温放置 2 h, 2230 r/min 离心 20 min, 血清分装保存供后续 ELISA 分析用。每一窝胎鼠随机取 6 只迅速分离其脑、肝脏组织, PBS 冲洗, 液氮速冻, -80°C 冰箱保存备用。每一窝胎鼠再随机取 4 只测量记录其头尾长、体重, 并记录孕鼠每窝总活胎数。

1.4 ELISA 法检测叶酸、IGF-1 及 IGFBP-3 水平

每一窝胎鼠随机取 1 只, 即每组各取 8 只胎鼠脑及肝脏组织, 采用 ELISA 法测定孕鼠血清 IGF-1、IGFBP-3 含量及胎鼠脑、肝脏组织中叶酸、

IGF-1、IGFBP-3 水平。具体操作步骤按照试剂盒说明书进行。

1.5 MeDIP-seq 行全基因组 DNA 甲基化测序

各组随机取 3 只非同窝胎鼠脑及肝脏组织行全基因组甲基化测序。使用组织基因组提取试剂盒 (Omega 公司, 美国) 提取胎鼠脑、肝脏组织 DNA, DNA 经 Qubit Fluorometer 定量仪和 0.8% 琼脂糖凝胶电泳质检合格后备用。将基因组 DNA 进行超声随机片段化, 片段化后进行末端修复、3' 末端加 A 碱基, 连接测序接头。用 5-mC 抗体对已连接测序接头的 DNA 进行沉淀, 富集甲基化 DNA 片段, 并对抗体富集结果进行 qPCR 验证, 最后建立文库, 文库检测合格后上机测序。

1.6 差异甲基化基因筛选

根据 MeDIP-seq 测序结果, 计算差异甲基化基因的差异倍数, 利用统计学分析检验 P 值, 若差异倍数 >2 , 或 $\leq 1/2$ 且 P 值 <0.05 , 则表明两组间基因的甲基化存在差异。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计软件对数据进行统计学分析。正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间的比较采用两独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组雌鼠受孕情况及胚胎情况

对照组雌鼠 10 只, 受孕 8 只; 叶酸缺乏组雌鼠 12 只, 受孕 8 只。对照组平均每窝胎鼠为 15.0 ± 1.3 只, 叶酸缺乏组平均每窝胎鼠为 14.0 ± 1.3 只, 差异无统计学意义 ($t=1.53$, $P>0.05$)。胎鼠的外观未见畸形, 无脑膨出、脊柱裂等发育畸形。

2.2 两组孕鼠及胎鼠体格生长指标

两组孕鼠的初始体重比较差异无统计学意义

($P>0.05$), 但予以相应饲料 2 周后及孕第 20 天时, 叶酸缺乏组孕鼠的体重远远低于正常对照组 ($P<0.05$) (表 2)。与正常对照组相比, 叶酸缺乏组胎鼠平均头尾长、体重都显著降低 ($P<0.05$) (表 3)。

2.3 两组孕鼠血清 IGF-1、IGFBP-3 水平及两组胎鼠脑、肝脏组织中叶酸、IGF-1、IGFBP-3 水平的比较

叶酸缺乏组孕鼠血清 IGF-1、IGFBP-3 水平及胎鼠脑、肝脏组织中叶酸、IGFBP-3 水平均低于正常对照组 ($P<0.05$)。与正常对照组相比, 叶酸缺乏组胎鼠脑、肝脏组织中 IGF-1 表达水平略下降, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 4~5。

表 2 两组孕鼠体重的比较 ($\bar{x} \pm s$, g)

组别	n	初始体重	造模 2 周后体重	孕 20 d 体重
正常对照组	8	238 ± 9	290 ± 14	420 ± 26
叶酸缺乏组	8	241 ± 6	258 ± 11	367 ± 17
t 值		0.588	5.178	4.885
P 值		0.566	<0.001	<0.001

表 3 两组胎鼠头尾长、体重的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	头尾长 (cm)	体重 (g)
正常对照组	32	3.99 ± 0.90	4.16 ± 0.19
叶酸缺乏组	32	3.66 ± 0.16	3.35 ± 0.37
t 值		9.978	11.153
P 值		<0.001	<0.001

表 4 两组孕鼠血清 IGF-1 和 IGFBP-3 水平比较

($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	n	IGF-1	IGFBP-3
正常对照组	8	1062 ± 151	2512 ± 504
叶酸缺乏组	8	359 ± 88	1665 ± 115
t 值		9.830	4.633
P 值		<0.001	0.002

表 5 两组胎鼠脑及肝脏组织中叶酸、IGF-1、IGFBP-3 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	脑组织			肝脏组织		
		叶酸 (ng/mL)	IGF-1 (pg/mL)	IGFBP-3 (pg/mL)	叶酸 (ng/mL)	IGF-1 (pg/mL)	IGFBP-3 (pg/mL)
正常对照组	8	188 ± 28	789 ± 85	3411 ± 673	174 ± 40	582 ± 97	2413 ± 450
叶酸缺乏组	8	110 ± 16	691 ± 115	2203 ± 548	77 ± 16	578 ± 62	346 ± 50
t 值		6.934	1.951	3.939	6.375	0.109	12.910
P 值		<0.001	0.071	0.002	<0.001	0.915	<0.001

2.4 两组胎鼠脑、肝脏组织中 IGFs 基因的甲基化水平比较

胎鼠脑组织 IGFs 基因的 MeDIP 测序结果显示：叶酸缺乏组 IGF-1R、IGF-2R、IGFBP-2、IGFBP-5、IGFBP-6、IGFBP-7 的甲基化水平均高于正常对照组（表 6）；而在肝脏组织中，相比于正常对照组，叶酸缺乏组 IGF-1R、IGF-2R、IGFBP-3、IGFBP-5 甲基化水平增加，IGF-2 甲基化水平则下降（表 7）。

表 6 与正常对照组比较叶酸缺乏组胎鼠脑组织甲基化水平变化（ $n=3$ ）

基因名	缩写	差异倍数	P 值	改变方向
胰岛素样生长因子 1 受体	IGF-1R	9.292	0.003	上调
胰岛素样生长因子 2 受体	IGF-2R	2.285	0.009	上调
胰岛素样生长因子结合蛋白 2	IGFBP-2	3.274	0.041	上调
胰岛素样生长因子结合蛋白 5	IGFBP-5	2.199	0.009	上调
胰岛素样生长因子结合蛋白 6	IGFBP-6	3.465	0.027	上调
胰岛素样生长因子结合蛋白 7	IGFBP-7	3.570	0.049	上调

表 7 与正常对照组比较叶酸缺乏组胎鼠肝脏组织甲基化水平变化（ $n=3$ ）

基因名	缩写	差异倍数	P 值	改变方向
胰岛素样生长因子 2	IGF-2	0.353	0.013	下调
胰岛素样生长因子 1 受体	IGF-1R	3.494	0.035	上调
胰岛素样生长因子 2 受体	IGF-2R	2.362	0.043	上调
胰岛素样生长因子结合蛋白 3	IGFBP-3	2.693	0.024	上调
胰岛素样生长因子结合蛋白 5	IGFBP-5	3.249	0.041	上调

3 讨论

在本研究中，我们发现与正常对照组相比，叶酸缺乏组胎鼠脑、肝脏组织叶酸浓度降低，且雌鼠体重，胎鼠头尾长、体重下降，但胎鼠无神经管畸形的发生。这与先前的多数研究结果^[6-7]相一致。提示单纯的叶酸缺乏可能是导致胎鼠宫内生长发育迟缓的原因之一；而围孕期叶酸的缺乏则尚不足以引起胎鼠神经管畸形的发生，这可能与机体复杂的代偿调控机制密切相关。Kim 等^[8]构建了雄鼠叶酸缺乏的动物模型，发现雄鼠叶酸缺乏会降低胎鼠肝脏组织叶酸浓度，但脑组织叶酸浓度组间无差异。这与本研究结果并不一致，可能是因为相较于雄鼠的低叶酸，孕鼠的叶酸缺

乏影响更为直接和严重，引起胎鼠包括脑组织在内的重要器官叶酸水平的下降。

本研究结果显示叶酸缺乏组孕鼠血清 IGF-1、IGFBP-3 浓度要远低于正常对照组，表明母体的营养会影响循环中 IGF-1、IGFBP-3 的水平。Bowman 等^[9]的研究表明循环中 IGF-1 减少，可降低组织器官对营养素的摄取能力，并使细胞增殖、分化、成熟障碍，可致使宫内生长迟缓的发生。研究发现宫内生长迟缓组孕后期母亲的 IGF-1 水平要明显低于正常对照组^[10]。而另一项研究则发现与早产适于胎龄儿相比，早产宫内生长迟缓儿 IGF-1、IGFBP-3 浓度降低^[11]。上述研究结果提示 IGF-1、IGFBP-3 参与了胎儿宫内生长受限的调控。本研究发现叶酸缺乏组胎鼠脑、肝脏组织的 IGFBP-3 水平都显著低于正常对照组，但 IGF-1 的水平在两组胎鼠脑、肝脏组织中则无明显差异。血循环中的 IGFBP-3 主要与 IGF-1 结合，其作用是延长 IGF-1 的半衰期，并可通过调控 IGF-1 对其受体的结合，进而促进或抑制 IGF-1 的生物学活性。此外，IGFBP-3 也具有不依赖于 IGF-1、直接调控细胞生长的作用^[12]。出现上述现象的原因可能与 IGFBP-3 水平的降低有关。循环中 IGFBP-3 水平的降低，会降低其与 IGF-1 的结合率，使 IGF-1 作用半衰期缩短，清除率增加，则进一步降低循环中 IGF-1 的浓度，但却可增加 IGF-1 的组织利用率，从而使组织中的 IGF-1 下降不显著。

MeDIP-Seq 的结果显示叶酸缺乏组胎鼠肝脏组织 IGFBP-3 的甲基化水平增加，且与脑组织相比，胎鼠肝脏组织的 IGFBP-3 下降更为显著。这可能是因为肝脏是 IGFBP-3 的最主要的合成部位，因此在肝脏组织差异最为明显。研究表明，特定基因的甲基化水平上调可导致基因沉默，而甲基化水平上调则可促进基因表达^[1]。因此，基于本研究结果，我们推测孕鼠叶酸缺乏可能通过影响 IGFBP-3 的甲基化水平，进而导致基因表达的改变，可能参与胚胎生长发育的调控。

IGF-1 主要调控出生后的生长发育，IGF-2 则在胚胎期的生长调控中发挥作用。IGF-1R 可介导 IGF-1 和 IGF-2 的许多生物学效应，但 IGF-2R 仅能与 IGF-2 结合。IGF-1R 与配体结合后，可促进细胞有丝分裂，抑制细胞凋亡^[13]。本研究通过对两组胎鼠 IGFs 相关基因的甲基化水平比较，发现与正常对照组相比，叶酸缺乏组脑、肝脏组织的

IGF-1R、IGF-2R 甲基化水平都增加, 但 IGF-2 基因的甲基化水平则在肝脏组织中表现为下调, 而 IGF-1 的甲基化水平则在组间无差异。以上结果提示了在胚胎发育期, 主要是 IGF-2 参与了胎鼠生长发育的调控, 而 IGF-1R、IGF-2R 甲基化的表达异常则可能导致相应受体表达的异常, 引起相应细胞信号通路的异常而影响细胞增殖、分化, 从而影响胚胎正常的生长发育。

IGFBPs 不仅可调控 IGF 配体的生物活性, 还可独立参与机体的多种生物学功能。研究表明^[14], 基因敲除 IGFBP-2 可使 16 周龄雄鼠的松质骨骨密度下降 40%, 而外源性给予 IGFBP-2, 则可促进成骨细胞的增殖。通过构建 IGFBP-5 基因过表达转基因小鼠, 研究发现 IGFBP-5 基因的过表达会增加新生小鼠的死亡率, 抑制宫内及青春期前的生长, 损害肌肉的发育, 并使雌鼠的生育能力下降^[15]。而 IGFBP-6 基因过表达时, 转基因小鼠出生后体重明显下降, 小脑的大小和重量也降低。但基因敲除 IGFBP-5 或 IGFBP-6, 小鼠的表型则无明显变化, 可能是通过对其他 IGFBPs 的调控来弥补上述基因的功能^[16]。IGFBP-7 则在调控细胞增殖分化、调控变态反应与参与机体免疫应答等方面有着重要的作用^[17]。上述研究表明 IGFBP-2、IGFBP-5、IGFBP-6、IGFBP-7 在调控生长发育中发挥着重要的作用, 而本研究发现叶酸缺乏组胎鼠脑组织 IGFBP-2、IGFBP-5、IGFBP-6、IGFBP-7 的甲基化水平均高于正常对照组, 表明孕鼠叶酸缺乏会影响胎鼠 IGFBPs 的甲基化表达, 可能通过干预上述基因的表达, 而影响胎鼠的生长发育。

总之, 本研究发现围孕期叶酸缺乏会导致胎鼠 IGFs 基因甲基化水平的改变, 且伴随着孕鼠血清 IGF-1、IGFBP-3 的降低及胎鼠头尾长、体重的下降, 提示围孕期叶酸缺乏可能通过影响 IGFs 基因的甲基化而对子代的生长发育造成影响。但本研究仅初步探讨了叶酸缺乏对子代 DNA 甲基化的影响, 在后续研究中, 将进一步验证 IGFs 基因的甲基化程度与相应基因表达的关系, 深入探讨 IGFs 基因在叶酸缺乏所致胚胎发育异常中的机制。

[参 考 文 献]

[1] Ly A, Hoyt L, Crowell J, et al. Folate and DNA methylation[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2012, 17(2): 302-326.

[2] Crider KS, Yang TP, Berry RJ, et al. Folate and DNA methylation: a review of molecular mechanisms and the evidence for folate's role[J]. *Adv Nutr*, 2012, 3(1): 21-38.

[3] Imbard A, Benoist JF, Blom HJ. Neural tube defects, folic acid and methylation[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2013, 10(9): 4352-4389.

[4] McKay JA, Mathers JC. Diet induced epigenetic changes and their implications for health[J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2011, 202(2): 103-118.

[5] Agrogiannis GD, Sifakis S, Patsouris ES, et al. Insulin-like growth factors in embryonic and fetal growth and skeletal development (Review)[J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(2): 579-584.

[6] 李岫, 梁良, 姚志刚, 等. 叶酸缺乏致胎鼠宫内发育迟缓及肝脏胰岛素生长因子系统表达变化[J]. *现代生物医学进展*, 2014, 14(4): 601-607.

[7] Burgoon JM, Selhub J, Nadeau M, et al. Investigation of the effects of folate deficiency on embryonic development through the establishment of a folate deficient mouse model[J]. *Teratology*, 2002, 65(5): 219-227.

[8] Kim HW, Kim KN, Choi YJ, et al. Effects of paternal folate deficiency on the expression of insulin-like growth factor-2 and global DNA methylation in the fetal brain[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2013, 57(4): 671-676.

[9] Bowman CJ, Streck RD, Chapin RE. Maternal-placental insulin-like growth factor (IGF) signaling and its importance to normal embryo-fetal development[J]. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 2010, 89(4): 339-349.

[10] Ferrero S, Mazarico E, Valls C, et al. Relationship between foetal growth restriction and maternal nutrition status measured by dual-energy X-ray absorptiometry, leptin, and insulin-like growth factor[J]. *Gynecol Obstet Invest*, 2015, 80(1): 54-59.

[11] Chiesa C, Osborn JF, Haass C, et al. Ghrelin, leptin, IGF-1, 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.

[12] Ranke MB. Insulin-like growth factor binding-protein-3 (IGFBP-3)[J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2015, 29(5): 701-711.

[13] Savage MO. Insulin-like growth factors, nutrition and growth[J]. *World Rev Nutr Diet*, 2013, 106: 52-59.

[14] Clemmons DR. Role of IGF binding proteins in regulating metabolism[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2016, 27(6): 375-391.

[15] Salih DA, Tripathi G, Holding C, et al. Insulin-like growth factor-binding protein 5 (Igfbp5) compromises survival, growth, muscle development, and fertility in mice[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(12): 4314-4319.

[16] Bach LA. Insulin-like growth factor binding proteins 4-6[J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2015, 29(5): 713-722.

[17] Akiel M, Rajasekaran D, Gredler R, et al. Emerging role of insulin-like growth factor-binding protein 7 in hepatocellular carcinoma[J]. *J Hepatocell Carcinoma*, 2014, 1: 9-19.

(本文编辑: 万静)