

梅花鹿 Ghrelin 全长 cDNA 克隆及其序列分析

张曼 金鑫 田巧珍 刘骄 王云鹤 杨银凤*

(内蒙古农业大学 兽医学院, 呼和浩特市 010018)

摘要 为获得梅花鹿 Ghrelin cDNA 全序列,以梅花鹿皱胃黏膜上皮组织提取的总 RNA 为模板,通过 RT-PCR 和 RACE 法克隆了梅花鹿皱胃中 Ghrelin 基因 cDNA 的全序列。结果表明梅花鹿 Ghrelin cDNA 序列全长为 539 bp,其中 5'非翻译区(5'UTR)为 46 bp,3'UTR 为 128 bp,开放阅读框(ORF)为 351 bp,该 ORF 编码 116 个氨基酸残基。将梅花鹿 Ghrelin 基因的 cDNA 与人和其他动物的 Ghrelin 相比,发现:梅花鹿 Ghrelin 与驯鹿、山羊、绵羊和牛的同源性达 90.4%~99.1%;与恒河猴、人、猪、犬的同源性达 76.6%~66.9%;与鸡和野鸽的同源性分别为 36.4%和 35.4%。研究表明 Ghrelin 的结构具有明显的种属特异性,因此 Ghrelin 在反刍动物体内可能有着重要的生理功能。

关键词 梅花鹿; Ghrelin; cDNA 克隆; 同源性分析

中图分类号 S865.4⁺2

文章编号 1007-4333(2017)12-0095-06

文献标志码 A

Full-length cDNA sequence cloning and analysis of Ghrelin in *Cervus nippon*

ZHANG Man, JIN Xin, TIAN Qiaozhen, LIU Jiao, WANG Yunhe, YANG Yinfeng*

(College of Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

Abstract In order to obtain the full-length cDNA of Ghrelin in *Cervus nippon*, RT-PCR and RACE methods were used by using total RNA of abomasus tissue in *C. nippon* as template. The results of sequence analysis revealed a 539 bp length cDNA containing 46 bp 5'-untranslated region (5' UTR), 128 bp 3'-untranslated region (3' UTR) and 351 bp open reading frame (ORF) encoding 116 amino acids. The cDNA sequence alignments of *C. nippon* Ghrelin gene with human and other animals showed that the cDNA sequence homology of *C. nippon* Ghrelin was 90.4% - 99.1% to reindeer, goat, sheep and cattle, 66.9% - 76.6% with rhesus monkey, human, pig and dog, only 36.4% with chicken and *C. livia*. These results indicated that the structure of Ghrelin displayed an obvious varietal specificity, suggesting that Ghrelin might play an important physiological function role in ruminants.

Keywords *Cervus nippon*; Ghrelin; cDNA clone; homology analysis

梅花鹿(*Cervus nippon*)属偶蹄目、鹿科、鹿属,是东亚季风区特有鹿类,被世界自然保护联盟(IUCN)列为濒危物种,也是我国国家 I 级重点保护动物。梅花鹿全身是宝,它的茸、鞭、血、肉、胎、脂、筋、尾、角、骨、皮等,均有药用价值,是本草纲目可供药用的名贵中药^[1]。Kojima 等^[2]从鼠胃中提取出一种可以激活 G 蛋白耦联受体—生长激素促分泌素受体(Growth hormone secretagogue receptor,

GHS-R)并可促进生长激素(Growth hormone, GH)分泌的多肽。这种 GHS-R 的内源性配体被称为 Ghrelin。纯化后的 Ghrelin 是一个含有 28 个氨基酸残基的多肽,其 mRNA 主要存在于胃底腺的颈部和底部,但在动物的下丘脑、垂体、脑干、胰腺、肌肉、肠、肾、心、肺、胎盘和性腺中也有表达^[3-5]。Ghrelin 除了具有调节 GH 的释放,还能够增加食欲、促进胃肠蠕动、调节体质量、治疗肠道

收稿日期:2016-10-26

基金项目:内蒙古自然科学基金资助项目(2013MS0408)

第一作者:张曼,博士研究生,E-mail:zhangman90514@163.com

通讯作者:杨银凤,博士,教授,主要从事动物解剖组织学和分子生物学研究,E-mail:julie1963@163.com

疾病和愈合辐射引起的伤口等作用^[6-8]。目前,大多数有关 Ghrelin cDNA 全序列的研究都集中在人、鸡、牛、羊、猪等动物,有关梅花鹿 Ghrelin 的研究报道较少,本课题组前期研究已完成了梅花鹿 Ghrelin cDNA 部分序列的克隆及分析^[9],但尚未见梅花鹿 Ghrelin cDNA 全序列的报道。因此,本研究拟以梅花鹿为研究对象,利用 RACE 技术克隆 Ghrelin 全长 cDNA,以获得梅花鹿 Ghrelin 全序列信息,以期为进一步研究该基因的表达、蛋白结构和生物学功能及 Ghrelin 基因的调控机制奠定基础,丰富国内外反刍动物在该基因研究方面的资料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验动物由内蒙古包头市大圣鹿场提供,将梅

花鹿屠宰后立即刮取其皱胃黏膜上皮组织,放入液氮中冷冻,−70 °C 保存。

1.2 主要试剂

总 RNA 提取试剂盒、TaKaRa Ex Taq DNA Polymerase、PCR 产物纯化试剂盒、限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III、3'RACE 试剂盒、5'RACE 试剂盒、PMD18-T 载体、质粒提取试剂盒。

1.3 试验方法

1.3.1 引物的设计及合成

根据本课题组已获得的梅花鹿 Ghrelin cDNA 部分序列设计 3' 和 5'RACE 引物,引物序列见表 1,由大连宝生物公司合成。

1.3.2 梅花鹿皱胃黏膜上皮组织总 RNA 的提取

根据 Promega 公司的总 RNA 提取试剂盒说明进行操作。用无 Rase 去离子水溶解 RNA 沉淀,−70 °C 保存备用。

表 1 5'和 3'RACE 引物
Table 1 List of 5' and 3' RACE primers

| 基因名称 Primer name | 引物序列 Sequence | 用途 Application |
|---------------------|--|-------------------|
| P1 | 5'-(dT) _n GCGTGCTCTGGCTGGACTTG-3' | |
| P2 | 5'-GCGTGCTCTGGCTGGACTTG-3' | 3'RACE 所需引物 |
| P3 | 5'-TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT-3' | |
| P4 | 5'-CCATTTGAGCATTTA-3' | |
| P5 | 5'-AACGCCCCCTTTGACATTGG-3' | 5'RACE 所需引物 |
| P6 | 5'-CTGCACCTTCCGCCTGACTTC-3' | |
| P7 | 5'-CCGACGAAACCCTGGCTGATG-3' | |
| P8 | 5'-ATGGCTTCTTAGGTTTCCTTTCTCTG-3' | |

1.3.3 3'RACE

以梅花鹿皱胃黏膜上皮组织总 RNA 为模版,加入 P1 进行 RT 反应合成 cDNA 第一条链,以此 cDNA 为模板,以 P2 与 P3 为引物进行 PCR 扩增。具体的反应组分和条件按试剂盒说明进行。

1.3.4 5'RACE

以梅花鹿皱胃黏膜上皮组织总 RNA 为模版,加入 P4 进行 RT 反应合成 cDNA 的第一条链,纯化后通过 T4 RNA 连接酶将单链的 cDNA 进行环化,以此为模板进行巢式 PCR。分别以 P5 与 P6、

P7 与 P8 为引物进行 2 次 PCR。具体的反应组分和条件见试剂盒说明。

1.4 3'RACE 和 5'RACE 产物的克隆、筛选、鉴定及测序

将 3' 和 5' RACE PCR 扩增产物按 TaKaRa PCR 产物纯化试剂盒进行纯化,将纯化后的 cDNA 连接到 PMD18-T 载体,热激转化到宿主菌 JM109 感受态细胞,经 LB 选择平板培养基培养过夜后挑取白色菌落。经限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切鉴定正确的质粒送大连宝生物公司进行序列测定。

2 结果与分析

2.1 3'RACE 及 5'RACE 扩增结果

3'和 5'RACE PCR 扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测分别得到约 300 和 440 bp 的片段(图 1)。用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 对 3'和 5'RACE 产物作酶切鉴定,将酶切鉴定正确的梅花鹿 Ghrelin DNA 质粒送大连宝生物公司进行序列测定。

2.2 梅花鹿 Ghrelin cDNA 的全序列

通过 3'和 5'RACE 技术,成功克隆出梅花鹿 Ghrelin cDNA 的全序列长度为 539 bp(GenBank 登录号. KX938335),包含 46 bp 的 5'非编码区和 128 bp 的 3'非编码区,351 bp 的开放阅读框(ORF),

预计该 ORF 编码 116 个氨基酸残基,起始与终止密码子分别为 ATG 和 TGA(图 2)。

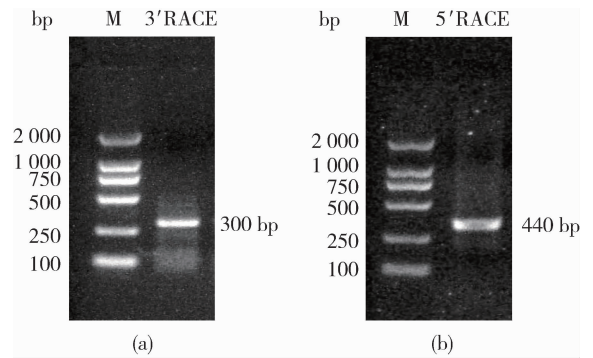


图 1 3'和 5'RACE 产物的琼脂糖凝胶电泳
Fig.1 Electrophoresis analysis of 3'RACE (a) and 5'RACE (b) product

| | |
|--|-------|
| CCT CTG CCC GGA ACC CCA GGT CCG TCT GCC TCC AGC CAG GGA AGCC ATG CCT | 52 |
| | M P 2 |
| GCC CCA TGG ACC GTC TGC AGC CTG CTG CTG CTC AGC GTG CTC TGG CTG GAC | 103 |
| A P W T V C S L L L L S V L W L D | 19 |
| TTG GCC ATG GCG GGC TCC AGC TTT CTG AGC CCT GAA CAT CAG AAA CTG CAG | 154 |
| L A M A G S S F L S P E H Q K L Q | 36 |
| AGA AAG GAA CCT AAG AAG CCA TCA GGC AGA CTG AAG CCC CGG GCC CTG GAA | 205 |
| R K E P K K P S G R L K P R A L E | 53 |
| GGC CAG TTT GAC CCG GAG GTG GGA AGT CAG GCG GAA GGT GCA GAG GAC GAG | 256 |
| G Q F D P E V G S Q A E G A E D E | 70 |
| CTG GAA ATC CGG TTC AAC GCC CCC TTT GAC ATT GGG ATC AAG CTG TCA GGG | 307 |
| L E I R F N A P F D I G I K L S G | 87 |
| GCT CAG TCC CTC CAG CAT GGC CAG ACG CTG GGG AAG TTT CTT CAG GAC ATC | 358 |
| A Q S L Q H G Q T L G K F L Q D I | 104 |
| CTT TGG GAA GAA GCC GAC GAA ACC CTG GCT GAT GAG TGA CCA GCC CTG GGA | 409 |
| L W E E A D E T L A D E * | 116 |
| CCA ACC CCC GTC CGT TCT CCA CCC TCA GAA GCT CTC ACG TGG CTT CCA GGA | 460 |
| CAC TTC CGA GAC CAC ATG CAG CTC TGA GGG GTG CTA GCC TAG GAG GTG AAT | 511 |
| AAA TGC TCA AAT GGA AAA AAA AAA AAA A | 539 |

信号肽和成熟肽分别用下划线和方框表示。

Signal peptide is underlined; The activation peptide is boxed.

图 2 梅花鹿 Ghrelin cDNA 的全序列和氨基酸序列

Fig.2 cDNA sequence and amino acid sequence of Ghrelin gene in *Cervus nippon*

2.3 梅花鹿 Ghrelin cDNA 全序列的同源性比较

使用 DNASTar 分析软件将梅花鹿 Ghrelin cDNA 全序列和其它动物进行生物进化树分析(图 3)。结果显示梅花鹿 Ghrelin cDNA 的全序列与驯鹿的同源性最高,为 99.1%;与山羊、绵羊和牛的同源性较高,分别为 93.0%、92.1%和 90.4%;与恒河猴、猪、人和犬的同源性较低,分别为 76.6%、70.1%、66.9% 和 68.4%;与鸡和野鸽等禽类的同

源性最低,仅为 36.4%和 35.4%。

2.4 梅花鹿 Ghrelin 编码的氨基酸及其同源性比较

根据梅花鹿 Ghrelin 的 cDNA 序列运用 DNASTar(Lasergene 5.01)推导其编码的氨基酸序列,得到其编码的 116 个氨基酸残基,其中包括 23 个信号肽,27 个成熟肽及 66 个 c-末端肽。将梅花鹿 Ghrelin 前原肽序列与人和其它动物比较(图 4(a)),

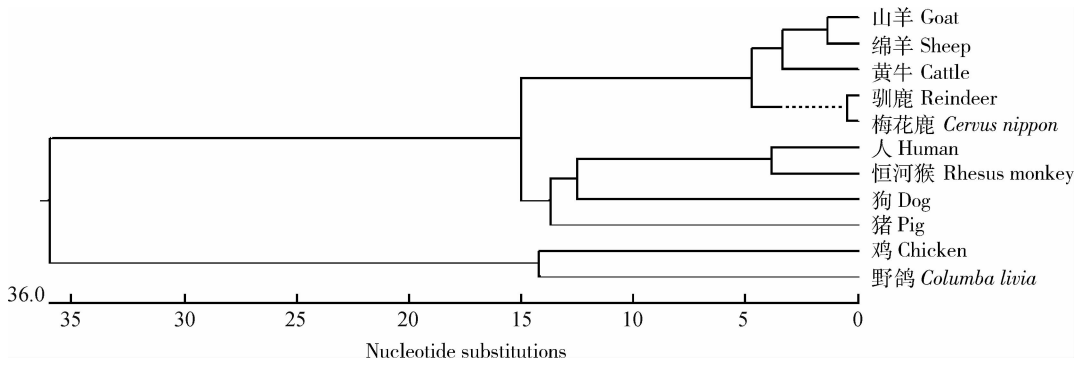


图3 梅花鹿 Ghrelin cDNA 全序列与其他动物的 Ghrelin 生物进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree analysis of *Cervus nippon* Ghrelin cDNA sequences with other species animal

| | | |
|-------------------------|--|----|
| 梅花鹿 <i>Cervusnippon</i> | 1 M--PAPWTVCSL---LLLS--VLWL--DLAMAGSSFLSPEHQKLQ-RKEPKKPSGRLKPR | 50 |
| 驯鹿 Reindeer | 1 M--PAPWTICSL---LLLS--VLWL--DLAMAGSSFLSPEHQKLQ-RKEPKKPSGRLKPR | 50 |
| 山羊 Goat | 1 M--PAPRTICSL---LLLS--MLWM--DLAMAGSSFLSPEHQKLQ-RKEPKKPSGRLKPR | 50 |
| 黄牛 Cattle | 1 M--PAPWTICSL---LLLS--VLCM--DLAMAGSSFLSPEHQKLQ-RKEAKKPSGRLKPR | 50 |
| 绵羊 Sheep | 1 M--PAPRTIYSL---LLLS--LLWM--DLAMAGSSFLSPEHQKLQ-RKEPKKPSGRLKPR | 50 |
| 狗 Dog | 1 M--PSLGTMCSL---LLFS--VLWV--DLAMAGSSFLSPEHQKLQQRKESKKPPAKLQPR | 51 |
| 恒河猴 Rhesusmonkey | 1 M--PSPGTVCSL---LLLG--MLWL--DLAMAGSSFLSPEHQRAQQRKESKKPPAKLQPR | 51 |
| 人 Human | 1 M--PSPGTVCSL---LLLG--MLWL--DLAMAGSSFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR | 51 |
| 猪 Pig | 1 M--PSTGTICSL---LLLS--VLLMA-DLAMAGSSFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR | 52 |
| 野鸽 Columbalivia | 1 M--FLRSALLGI---LLSS--SLWT--EPSLAGSSFLSPEYKKLQQNDPKKPSAQL--H | 49 |
| 鸡 Chicken | 1 M--FLRVILLGI---LLLS--ILGT--ETALAGSSFLSPTYKNIQQQKDRKPTARL--H | 49 |

(a) 信号肽和成熟肽 Signal and mature peptide

| | | |
|-------------------------|---|-----|
| 梅花鹿 <i>Cervusnippon</i> | 51 ALEGQFDPEVGSQAEGAEDELEIRFNAPFDI-GIKLSGAQSLQHGQTLGKFLQDILWEEADETLADE | 116 |
| 驯鹿 Reindeer | 51 ALEGQFDPEVGSQAEGAEDELEIRFNAPFDI-GIKLSGAQSLQHGQTLGKFLQDILWEEADETLADE | 116 |
| 山羊 Goat | 51 ALEGQFDPDVGSQEEGAEDELEIRFNAPFNI-GIKLSGAQSLQHGQTLGKFLQDILWEEAEETLADE | 116 |
| 黄牛 Cattle | 51 TLEGQFDPEVGSQAEGAEDELEIRFNAPFNI-GIKLAGAQSLQHGQTLGKFLQDILWEEAEETLANE | 116 |
| 绵羊 Sheep | 51 ALEGQFDPDVGSQEEGAEDELEIRFNAPFNI-GIKLSGAQSLQHGQTLGKFLQDILWEEAEETLADE | 116 |
| 狗 Dog | 52 ALEGLGPEDETSQVEEAEDELEIRFNAPFDV-GIKLSGPQYHQHGQALGKFLQEVWLWEDTNEALADE | 117 |
| 恒河猴 Rhesusmonkey | 52 ALGGWLRPEDGDQAEGAEDELEIQFNAPFDV-GIKLSGVYQQHSQALGKFLQDILWEEAKEAPADK | 117 |
| 人 Human | 52 ALAGWLRPEDGGQAEGAEDELEVRFNAPFDV-GIKLSGVYQQHSQALGKFLQDILWEEAKEAPADK | 117 |
| 猪 Pig | 53 ALEGLGPEDESGEVEGTEDKLEIRFNAPCDV-GIKLSGAQSDQHGQPLGKFLQDILWEEVTEAPADK | 118 |
| 野鸽 Columbalivia | 50 RRGTEGFWDPEAEAEEDDRNSIEIKFNVPFEIGVRITEEYQYRQVLEKMLGDTLGASAQATQMKN | 116 |
| 鸡 Chicken | 50 RRGTESFWDTDETEGEDDNNNSVDIKFNVPFEIGVKITEREYQYEQALEKMLQDILAENAEETRTKS | 116 |

(b) C-末端肽 C-terminal peptide

“*”代表氨基酸高度保守的位置；下划线代表成熟肽部分。

* indicates highly conserved residues of these ferritins; Single underline means mature peptide.

图4 梅花鹿 Ghrelin 与其他动物 preproghrelin 的氨基酸序列比较

Fig. 4 Amino acid sequence alignments of *Cervus nippon* and other animals preproghrelin in amino acid sequences

编码的 preproghrelin 与驯鹿的同源性最高, 为 98.3%; 与牛、山羊、绵羊的同源性较高, 为 90% 以上, 与其他动物的次之, 而与野鸽的最远, 其同源性仅为 39.3%。进一步分析其编码的氨基酸发现, 梅花鹿的 Ghrelin 成熟肽与驯鹿的 Ghrelin 成熟肽的同源性高达 100%。

3 讨论

Ghrelin 是生长激素促分泌素受体 1a 的一个内源性配体, 主要是由胃的泌酸部黏膜产生^[1], 但也在人、禽类、反刍动物的小肠、大肠、肺、肾、心、胰腺、垂体和下丘脑内都有表达^[5,10-11]。本研究利用 RACE 技术, 从梅花鹿皱胃黏膜上皮组织中克隆出长度为 539 bp 的 Ghrelin 基因全长 cDNA 序列。经 DNASTAR 分析软件 MegAlign ClustelV (Slow/Accurate) 进行序列同源性比较和生物进化树分析发现, 梅花鹿 Ghrelin cDNA 的全序列与驯鹿的亲缘关系最近, 与山羊、绵羊和牛的亲缘关系较近, 而与恒河猴、人、猪、猫和犬的亲缘关系较远, 与鸡的亲缘关系最远。

长度为 539 bp 的 Ghrelin cDNA 序列中包含 351 bp 的开放阅读框(ORF), 推导出长度为 116 个氨基酸的前原肽, 其中的信号肽、成熟肽、C-末端分别由 23 个氨基酸、27 个氨基酸和 66 个氨基酸构成。将梅花鹿的前原肽与其他动物及人的进行比较, 结果显示在 116 个氨基酸内存在某些高度保守的序列位点(图 4)。通过 DNASTAR 分析软件将其与其他动物的前原肽进行相似性分析, 结果发现梅花鹿 Ghrelin 与驯鹿的相似度最高, 与牛、山羊、绵羊的相似度较高。

梅花鹿 Ghrelin 信号肽与驯鹿的信号肽相比仅有 1 个氨基酸不同, 而与牛羊等反刍动物相比有 3~5 个不同。并且在梅花鹿 Ghrelin 的信号肽部分同样发现“LL”结构的保守区, 说明 Ghrelin 蛋白分泌到胞外是通过膜泡运输方式, 也说明梅花鹿 Ghrelin 信号肽序列具有高度保守性。预测的梅花鹿 Ghrelin 成熟肽是由 27 个氨基酸残基组成, 其活性中心具有典型的“GSSF”结构, 此结构的第 3 位丝氨酸(Ser3) 对于其活性的正常发挥具有重要作用^[1], 并且与驯鹿、山羊、绵羊、牛、麝和猫的成熟肽一样缺乏 Gln14^[12-16]。由此可见, 梅花鹿 Ghrelin 的 cDNA 序列和氨基酸均与牛羊等反刍动物的接近, 并且与驯鹿的最为相近, 这说明 Ghrelin 在物种

表达上具有种属特异性。

参考文献 References

- [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] 宋延龄, 刘志涛. 珍稀动物—梅花鹿及其研究[J]. *生物学通报*, 2005, 40(7): 1-3
Song Y L, Liu Z T. Research the rare animal *Cervus nippon* [J]. *Bulletin of Biology*, 2005, 40(7): 1-3 (in Chinese)
- [3] Feng K, Zhang G R, Wei K J, Xiong B X. Molecular cloning, tissue distribution, and ontogenetic expression of ghrelin and regulation of expression by fasting and refeeding in the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology*, 2013, 319(4): 202-212
- [4] 张曼, 金鑫, 刘骥, 杨银凤. Ghrelin 在驯鹿组织器官中的表达 [J]. *中国农业大学学报*, 2015, 20(4): 147-151
Zhang M, Jin X, Liu J, Yang Y F. Examination of expression of ghrelin in the reindeer organs [J]. *Journal of China Agricultural University*, 2015, 20(4): 147-151 (in Chinese)
- [5] Wang J X, Li P, Peng K M, Jin S H. cDNA cloning of ghrelin and ontogeny of ghrelin mRNA expression in the gastrointestinal tract of African ostrich chicks [J]. *Regulatory Peptides*, 2011, 167(1): 50-55
- [6] Pillar G, Shehadeh N. Abdominal fat and sleep apnea; the chicken or the egg [J]. *Diabetes Care*, 2008, 31(2): 303-309
- [7] Onishi S, Kaji T, Yamada W, Nakame K, Moriguchi T, Sugita K, Yamada K, Kawano T, Mukai M, Souda M, Yamada S, Yoshioka T, Tanimoto A, Ieiri S. The administration of ghrelin improved hepatocellular injury following parenteral feeding in a rat model of short bowel syndrome [J]. *Pediatric Surgery International*, 2016, 3975-1171
- [8] Liu C, Hao Y, Huang J, Li H, Yang Z, Zeng Y, Liu J, Li R. Ghrelin accelerates wound healing in combined radiation and wound injury in mice [J]. *Experimental Dermatology*, 2017, 26(2): 186-193
- [9] 程兰玲, 杨银凤, 李涛, 陈荣. 梅花鹿 Ghrelin cDNA 的克隆及序列分析 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2010: 149-150
Cheng L L, Yang Y F, Li T, Chen R. Cloning and analysis of the cDNA of *Cervus nippon* ghrelin [J]. *Heilongjiang Animal Husbandry and Veterinary*, 2010: 149-150 (in Chinese)
- [10] Shao Y, Liu S, Tang X, Gao J, Wu G, Li Z. Ontogeny of ghrelin mRNA expression and identification of ghrelin immunopositive cells in the gastrointestinal tract of the peking duck, *Anas platyrhynchos* [J]. *General and Comparative Endocrinology*,

- 2010,166(1):12-18
- [11] Miller D W, Harrison J L, Brown Y A, Doyle U, Lindsay A, Adam C L, Lea R G. Immunohistochemical evidence for an endocrine/paracrine role for ghrelin in the reproductive tissues of sheep[J]. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2005, 3:60
- [12] 杨银凤, 余兴邦, 王冠玉, 都格尔斯仁, 包花尔, 徐斯日古楞. 中国驯鹿生长素 Ghrelin 全长 cDNA 的克隆及序列分析[J]. 中国兽医学报, 2014, 34(10):1647-1652
Yang Y F, Yu X B, Wang G Y, Dugeersiren, Bao H E, Xusiriguleng. Cloning and analysis of the full-length cDNA of China reindeer ghrelin [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2014, 34(10):1647-1652 (in Chinese)
- [13] Ida T, Miyazato M, Lin X Z, Kaiya H, Sato T, Nakahara K, Murakami N, Kangawa K, Kojima M. Purification and characterization of caprine ghrelin and its effect on growth hormone release [J]. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2010, 42(1):99-105
- [14] Kojima M, Ida T, Sato T. Structure of mammalian and nonmammalian ghrelins [J]. *Vitamins and Hormones*, 2008, 77:31-46
- [15] Ida T, Miyazato M, Naganobu K, Nakahara K, Sato M, Lin X Z, Kaiya H, Doi K, Noda S, Kubo A, Murakami N, Kangawa K. Purification and characterization of feline ghrelin and its possible role [J]. *Domestic Animal Endocrinology*, 2007, 32(2):93-105
- [16] Ishida Y, Sakahara S, Tsutsui C, Kaiya H, Sakata I, Oda S, Sakai T. Identification of ghrelin in the house musk shrew (*Suncus murinus*): cDNA cloning, peptide purification and tissue distribution [J]. *Peptides*, 2009, 30(5):982-990

责任编辑: 杨爱东