

娄安钢,季久秀,相思宇,等. miR-6523a 对延边黄牛垂体细胞中生长激素分泌的影响[J]. 江苏农业科学,2020,48(13):202-207.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.13.041

miR-6523a 对延边黄牛垂体细胞中生长激素分泌的影响

娄安钢¹, 季久秀², 相思宇¹, 金太花², 张 睿¹, 崔长艳¹, 关立增^{1,2}

(1. 延边大学农学院, 吉林延吉 133002; 2. 临沂大学农林科学学院, 山东临沂 276005)

摘要:为研究血液外胞体中 miRNA 对延边黄牛垂体细胞中生长激素(GH)分泌的影响,本研究选择在延边黄牛和韩延牛血液外胞体中显著差异表达的 miR-6523a,利用实时定量 PCR(qPCR)和 Western Blot 技术,研究了 miR-6523a 对延边黄牛垂体细胞中 GH 分泌水平的影响及 miR-6523a 与靶基因间的调控机制。生物信息学分析和双荧光素酶报告基因系统结果显示,miR-6523a 靶向了 *SSTR5* 的 3'非翻译区(UTR);qPCR 和 Western Blot 检测结果显示,与对照组相比,添加 miR-6523a-mi 能极显著提高延边黄牛垂体细胞中 *GH* mRNA 和蛋白的表达($P < 0.01$),而添加 miR-6523a-in, *GH* mRNA 和蛋白的表达有所降低,但和对照组相比差异不显著($P > 0.05$);与对照组相比,添加 miR-6523a-mi 能极显著抑制 *SSTR5* mRNA 和蛋白的表达($P < 0.01$),而添加 miR-6523a-in, *SSTR5* mRNA 和蛋白的表达均有所提高,但和对照组相比差异不显著($P > 0.05$)。本研究表明,miR-6523a 可通过调节 *SSTR5* 基因的表达而调控垂体细胞中 GH 的分泌,本研究结果将为研究外胞体 miRNA 调控动物生长发育机制提供理论依据。

关键词:miR-6523a; 延边黄牛; 垂体细胞; GH; *SSTR5*

中图分类号:S823.8⁺11 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)13-0202-06

延边黄牛具有生长速度慢、生长周期长和出栏率低等缺点,导致饲料资源浪费和饲养成本提高,这严重制约了延边黄牛养殖业的健康发展^[1-3]。因

此,如何提高纯种延边黄牛的生长速度、缩短其养殖周期是加快延边黄牛养殖产业快速发展的关键。研究表明,外胞体(exosome)中 miRNA 对动物的生长发育发挥着重要的调控作用。如 Melnik 等研究发现,牛乳 exosome 中的 miRNA-21 可以促进犊牛的生长^[4]。陈婷用来源于猪 exosome 的 miR-PC-86, miR-PC-263 处理 C2C12 细胞,结果显示二者可调控 C2C12 细胞上胰岛素样生长因子 1 受体(IGF-1R)的表达,从而对猪肌细胞生长发挥调控

收稿日期:2019-08-11

基金项目:国家自然科学基金(编号:31660614)。

作者简介:娄安钢(1980—),男,吉林延吉人,博士,讲师,主要从事动物的遗传与育种研究。E-mail:1163986278@qq.com。

通信作者:关立增,博士,副教授,硕士生导师,主要从事动物基因的表达与调控研究。E-mail:guanlizeng@163.com。

[9] Sharma D, Abrol D P, Ahmad H, et al. Migratory beekeeping in Jammu and Kashmir, India[J]. Bee World, 2013, 90(2): 44-47.

[10] 唐黎标. 蜜蜂转地饲养经验谈[J]. 中国蜂业, 2013, 64(22): 17, 24.

[11] Sharma R, Bhatia R. Economics of stationary and migratory beekeeping in Himachal Pradesh[J]. Agricultural Science Digest, 2001, 21(3): 196-197.

[12] William G M, Weiss M, Patrick W M, et al. Internal hive temperature as a means of monitoring honey bee colony health in a migratory beekeeping operation before and during winter[J]. Apidologie, 2017, 48(5): 666-680.

[13] 刘 珊, 王刘豪, 郭 军, 等. 转地蜂群病原微生物及肠道共生菌的变化[J]. 中国农业科学, 2017, 50(5): 951-958.

[14] 张祖芸, 余玉生, 张学文, 等. 两个意蜂品种及其杂交子代的形态特

征和杂种优势分析[J]. 南方农业学报, 2014, 45(3): 479-483.

[15] Ruttner F. Biogeography and taxonomy of honeybees[M]. Berlin: Springer-Verlag, 1988: 284.

[16] 张祖芸, 余玉生, 杨若鹏, 等. 微小生物形态测定仪在蜜蜂形态学中的应用[J]. 中国蜂业, 2012, 63(增刊4): 23-26.

[17] 罗凌娟, 朱立蕃, 张祖芸, 等. 蜜蜂形态测定方法研究[J]. 中国蜂业, 2014, 65(增刊2): 18-20.

[18] 曾志将. 工蜂形态指标与产量的关联度分析[J]. 中国养蜂, 1992, 42(3): 23.

[19] 谭 昱, 张 炫, 和绍禹, 等. 中国东方蜜蜂的形态学及生物地理学研究[J]. 云南农业大学学报, 2005, 20(3): 410-414.

[20] Pilati L, Prestamburgo M. Sequential relationship between profitability and sustainability: the case of migratory beekeeping[J]. Sustainability, 2016, 8(1): 94.

的作用^[5]。由此可见,exosome 中的一些 miRNA 可能与动物生长发育存在密切的关系,那么 exosome 中 miRNA 是否具有调控延边黄牛生长速度、提高生长效率的作用有待进一步研究。

在动物生长发育过程中,生长轴起着关键的作用^[6-7]。而在生长轴中腺垂体分泌的生长激素(GH)是最重要的成分之一^[8-9]。因此,为更全面地了解 exosome 中 miRNA 在调节延边黄牛生长过程中的作用,本研究在前期工作中选择以延边黄牛和在长发育速度、初生质量及各年龄段体尺体质量等均极显著高于延边黄牛的韩延牛作为研究对象,利用生物信息学技术分析了延边黄牛及韩延牛血液 exosome 中显著影响 GH 分泌的差异表达 miRNA,并筛选出显著差异表达的 miR - 6523a。但关于 miR - 6523a 对延边黄牛垂体中 GH 的分泌的影响机制还不清楚,因此本研究旨在在体外垂体细胞水平上探究 miR - 6523a 对延边黄牛垂体 GH 分泌的调控机制,进而为进一步研究外胞体 miRNA 调控动物生长发育机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 主要仪器 Bio - Rad 650 型酶标仪(美国 Bio - Rad 公司);倒置生物显微镜(日本 Olympus 公司);荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司);2406 - 2 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司);凝胶成像系统(英国 Ultro - Violet Products 公司)。

1.1.2 主要试剂 *Xho* I、*Xba* I,购自宝生物工程(大连)有限公司;DMEM/F12 培养液、胎牛血清、0.25% 胰蛋白酶、胶原酶 II 及青霉素、链霉素、Lipofectamine™ 2000,均购自 GIBCO 公司;GH 抗体、SSTR5 抗体,均购自 Abcam 公司; β - *actin* 抗体,购自北京博奥森生物技术有限公司;总蛋白提取试剂盒,购自北京佳兰生物科技有限公司;miR - 6523a 的模拟物(mimics)(miR - 6523a - mi)、抑制剂(inhibitor)(miR - 6523a - in)、阴性对照(NC)、抑制剂阳性对照(iNC),均由上海吉玛制药技术有限公司合成;双荧光报告基因检测试剂盒购自 Promega 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 miR - 6523a 的靶基因预测 利用 targetscan 和 RNAhybrid 分析软件对 miR - 6523a 与 GH 合成分泌相关的基因(*GHRHR*、*SSTR2*、*LEF1*、*POU1F1* 和

SSTR5 等)的靶关系进行预测。

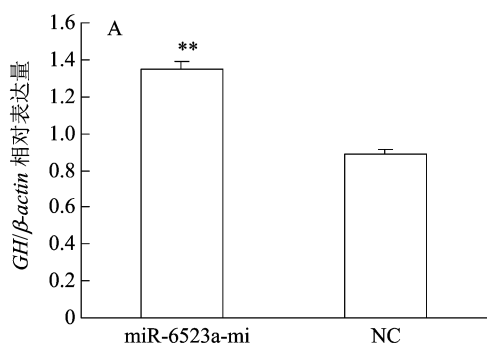
1.2.2 延边黄牛垂体细胞原代培养 垂体细胞原代培养方法参考文献[10]。在无菌条件下分离 3 头延边黄牛的垂体组织,分别剪碎至 1 mm × 1 mm × 1 mm 的组织块,用 pH 值为 7.0 的磷酸缓冲盐溶液(PBS)冲洗 3 遍后,接种于 75 mL 培养瓶中,加入 DMEM/F12 培养液,放入 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养,待细胞从组织块中爬壁生长至 80% 时,采用 0.25% 胶原酶消化,并通过差速贴壁法分离细胞,获得垂体原代培养细胞。

1.2.3 miR - 6523a 对延边黄牛腺垂体细胞中 GH mRNA 转录水平的影响 按“1.2.2”节中所述方法对延边黄牛的垂体组织细胞进行原代培养后,按 2.0 × 10⁶ 个细胞/孔的密度将垂体细胞接种至 6 孔培养板中,待细胞汇合度为 60% ~ 70% 时进行转染试验。转染前采用 2 mL PBS 漂洗细胞 1 次,并加入 0.7 mL DMEM/F12 培养液和 100 μL 1 μmol/L 生长抑素(SS),之后分别将 miR - 6523a 的 mimics、inhibitor、NC 对照、iNC 对照分别稀释到 100 μL DMEM/F12 培养液中。然后将 10 μL 转染试剂 Lipofectamine™ 2000 稀释至 100 μL DMEM/F12 培养液中,之后将上述稀释液分别按 1 : 1 体积比混合,室温孵育 10 min 后,将 200 μL 混合物加入到上述预处理的细胞孔中,使 mimics、inhibitor、NC 对照、iNC 对照最终浓度为 200 pmol/L,每组设 3 次重复。为了避免转染毒性,6 h 后吸弃含转染试剂的培养基,同时置换新的培养基继续培养 48 h,收集细胞,提取总 mRNA。采用荧光定量 PCR(qPCR)法检测 GH mRNA 的转录情况,具体步骤参考文献[10]中的方法进行。

1.2.4 miR - 6523a 对延边黄牛腺垂体细胞中 GH 蛋白表达的影响 根据总蛋白提取试剂盒的步骤对“1.2.3”节中获得的细胞进行总蛋白提取,并进行 GH 蛋白 Western Blot 检测具体步骤如下:按常规方法配制 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分离胶和 5% PAGE 浓缩胶并放入垂直电泳槽中,待其凝固后,拔出木梳并向梳孔中加入 1 × 甘氨酸缓冲液,然后加入 50 μg 制备的总蛋白样品进行电泳。电泳结束后,将上述蛋白胶进行转膜,所用膜为聚偏氟乙烯(PVDF),转膜条件为 110 V、60 ~ 70 min,转膜结束后取出 PVDF 膜,进行丽春红染色,检验转膜效果;之后采用 1 × TBST 溶液洗涤膜数次,去除丽春红染色液,再用 5% 脱脂奶粉室温条件下封闭 2 h;

之后将封闭的 PVDF 膜放入 5 mL 离心管中,加入 2 mL GH 蛋白一抗,4 ℃ 条件下孵育过夜(12 h)。孵育结束后,采用 1 × TBST 缓冲液洗涤 PVDF 膜 3 次,每次 10 min。将洗涤后的 PVDF 膜放入新的 5 mL 离心管中,加入 2 mL 1 : 5 000 稀释的 GH 蛋白二抗,室温孵育 2 h。孵育结束后,用 1 × TBST 缓冲液洗涤 PVDF 膜 3 次,每次 5 min。然后将 PVDF 膜置于发光液中显色 1 min 后,在凝胶成像系统中曝光,并与 β -actin 内参基因的表达进行比较,计算 GH 蛋白的相对表达量。

1.2.5 miR-6523a 与 *SSTR5* 靶关系验证 将能与 miR-6523a 种子序列匹配的 *SSTR5* 3'非翻译区(UTR)区域的上、下游 30 bp 之内的序列进行人工合成,同时将与 miR-6523a 种子序列匹配区域的 5 个碱基进行人工突变作为对照,逐步确定 miR-6523a 真正结合位点。然后用限制性内切酶 *Xho* I 和 *Xba* I 酶切上述人工合成的片段及人工突变片段,将酶切产物分别与荧光素酶基因报告载体(pirGLO 载体)连接,构建重组 pirGLO-*SSTR5*-3'UTR 表达载体和突变载体,获取无内毒素质粒。之后将 miR-6523a 的 mimic、NC 与构建好的 pirGLO-*SSTR5*-3'UTR 正常或缺失载体分别稀释为 200 pmol/L,然后在转染试剂 Lipofectamine™ 2000 的作用下共转染中国仓鼠卵巢癌细胞(CHO)细胞,具体转染过程参考“1.2.3”节中的方法。48 h 后收集细胞、裂解,按荧光素酶检测试剂盒步骤检测荧光素酶的活性,以验证 miR-6523a 与 *SSTR5* 之间的靶关系。



A 为垂体细胞转染 miR-6523a-mi 后, *GH* mRNA 的相对转录水平; B 为垂体细胞转染 miR-6523a-in 后, *GH* mRNA 的相对转录水平; **表示差异极显著($P < 0.01$)。图 2、图 4、图 5 同

图 1 miR-6523a 对 *GH* mRNA 转录水平的影响

1.2.6 miR-6523a 对延边黄牛腺垂体细胞中 *SSTR5* 的 mRNA 转录水平和蛋白表达的影响 *SSTR5* mRNA 转录水平的 qPCR 检测和蛋白的 Western Blot 检测均参考“1.2.3”和“1.2.4”节中的方法进行。

1.2.7 数据分析 采用 SPSS 13.0 软件进行数据分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示。*、** 分别表示与 NC 或 iNC 对照组比较差异显著($P < 0.05$)、极显著($P < 0.01$)。

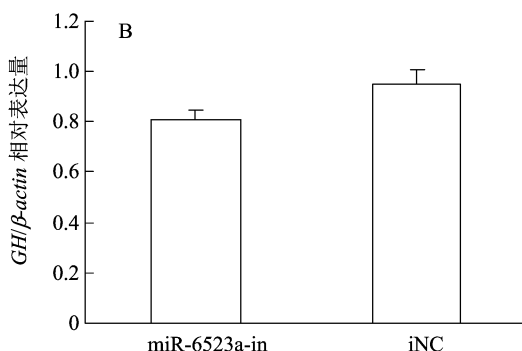
2 结果与分析

2.1 miR-6523a 与调控 GH 分泌相关基因靶关系预测

本试验使用 targetscan 和 RNAhybrid 分析软件对 miR-6523a 与 GH 合成分泌相关的基因(*GHRHR*、*SSTR2*、*LEF1*、*POU1F1*、*SSTR5* 等)靶关系进行分析。结果显示,miR-6523a 的靶基因为 *SSTR5*。

2.2 miR-6523a 对 *GH* 基因 mRNA 转录水平的影响

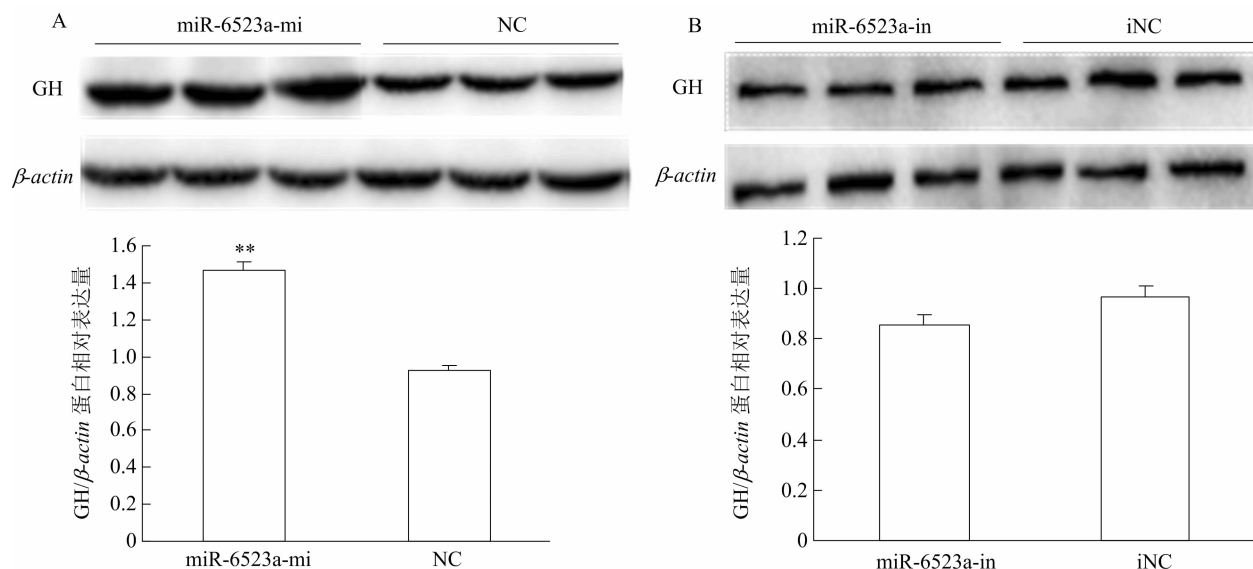
为分析 miR-6523a 对延边黄牛垂体 *GH* 基因表达的影响,本研究首先用 miR-6523a mimics 及 inhibitor 转染原代培养的延边黄牛垂体细胞,然后对 *GH* 基因 mRNA 表达进行检测。由图 1 可知,与对照组相比,添加 miR-6523a-mi 能够极显著提高 *GH* mRNA 的转录水平($P < 0.01$),而添加 miR-6523a-in 能降低 *GH* mRNA 的转录水平,但与对照组相比差异不显著($P > 0.05$)。



2.3 miR-6523a 对 GH 蛋白表达的影响

为了进一步验证 miR-6523a 对延边黄牛垂体 GH 蛋白表达的影响,本研究在 *GH* mRNA 转录检测

结果基础上进一步对 GH 蛋白的表达水平进行 Western Blot 检测。由图 2 可知,与对照组相比,添加 miR-6523a-mi 能够极显著提高 GH 蛋白表达水平



A 为垂体细胞转染 miR-6523a-mi 后, GH 蛋白的相对表达量; B 为垂体细胞转染 miR-6523a-in 后, GH 蛋白的相对表达量

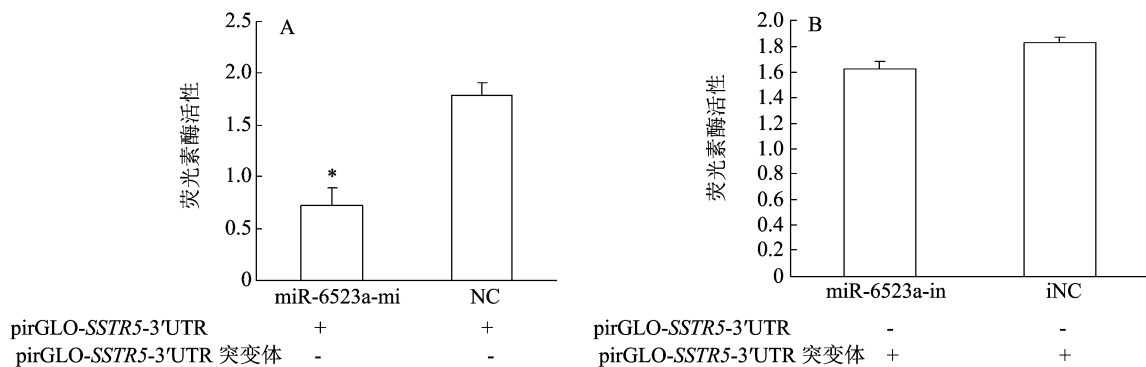
图2 miR-6523a 对 GH 蛋白表达的影响

($P < 0.01$), 而添加 miR-6523a-in 能降低 GH 蛋白的表水平, 但与对照组相比差异不显著($P > 0.05$)。

2.4 miR-6523a 与 *SSTR5* 靶关系验证

为验证 miR-6523a 与 *SSTR5* 之间是否存在靶位关系, 本研究将 pirGLO-*SSTR5*-3'UTR 正常或突变载体分别与 miR-6523a/NC 共转染 CHO 细胞, 从而通过荧光素酶活性的变化反映 miR-6523a

与 *SSTR5* 是否存在靶关系。由图 3 可知, miR-6523a 能显著降低 pirGLO-*SSTR5*-3'UTR 正常质粒荧光素酶的活性, 而对 pirGLO-*SSTR5*-3'UTR 突变体无抑制效果。由此可知, miR-6523a 能结合并作用于 *SSTR5* 的 3'UTR 区域, miR-6523a 与 *SSTR5* 之间存在靶位关系。



A 为 pirGLO-*SSTR5*-3'UTR 正常质粒与 miR-6523a mimics 和 NC 共转染, 48 h 后荧光素酶的活性变化;

B 为 pirGLO-*SSTR5*-3'UTR 突变质粒与 miR-6523a mimics 和 NC 共转染, 48 h 后荧光素酶的活性变化; *表示差异显著($P < 0.05$)

图3 荧光素酶活性测定

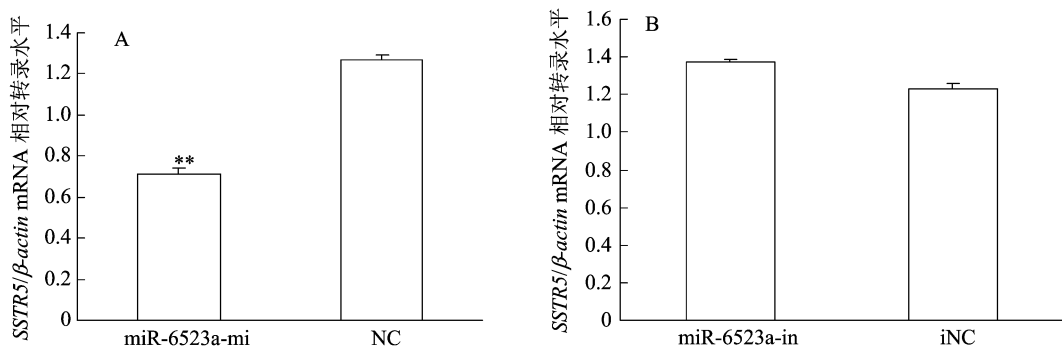
2.5 miR-6523a 对 *SSTR5* 基因 mRNA 表达的影响

为验证 miR-6523a 对 *SSTR5* 基因的调控功能, 本试验首先用 miR-6523a mimics 及 inhibitor 转染原代培养的延边黄牛垂体细胞, 然后对 *SSTR5* 基因 mRNA 转录水平进行 qPCR 检测。由图 4 可知, 与对照组相比, 添加 miR-6523a-mi 能够极显著降低 *SSTR5* mRNA 的转录水平($P < 0.01$), 而添加

miR-6523a-in 能提高 *SSTR5* mRNA 的转录水平, 但与对照组相比差异不显著($P > 0.05$)。

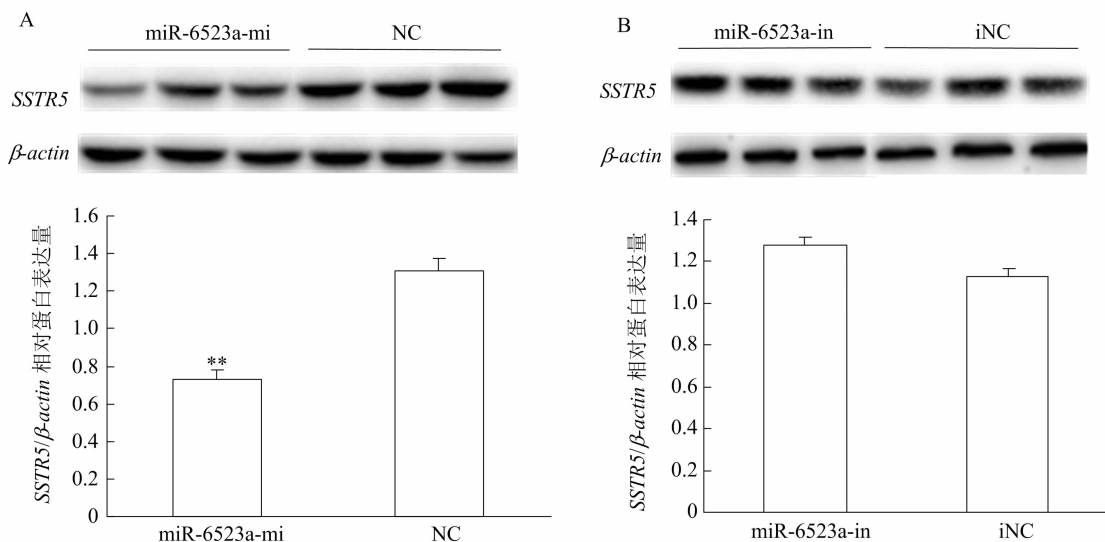
2.6 miR-6523a 对 *SSTR5* 蛋白表达的影响

为了进一步验证 miR-6523a 对延边黄牛垂体 *SSTR5* 蛋白表达的影响, 本研究在 *SSTR5* mRNA 转录检测结果基础上进一步对 *SSTR5* 蛋白表达的变化进行 Western Blot 检测。由图 5 可知, 与对照组相比, 添加 miR-6523a-mi 能够极显著降低 *SSTR5*



A 为垂体细胞转染 miR-6523a-mi 后, *SSTR5* mRNA 的转录水平; B 为垂体细胞转染 miR-6523a-in 后, *SSTR5* mRNA 的转录水平

图4 miR-6523a 对 *SSTR5* mRNA 转录的影响



A 为垂体细胞转染 miR-6523a-mi 后, *SSTR5* 蛋白的相对表达量; B 为垂体细胞转染 miR-6523a-in 后, *SSTR5* 蛋白的相对表达量

图5 miR-6523 a对 *SSTR5* 蛋白表达的影响

蛋白的表达水平 ($P < 0.01$), 而添加 miR-6523a-in 能提高 *SSTR5* 蛋白的表达水平, 但与对照组相比差异不显著 ($P > 0.05$)。

3 讨论与结论

外胞体中的 miRNA 可通过血液等体液的运输, 被运输到动物机体的各个组织细胞并可通过细胞膜进入细胞内, 从而在生长调控、细胞间通讯交流、免疫调节、信号传递等过程中发挥着重要的作用^[11-12]。研究表明, exosome 中的 miRNA 具有调控动物生长的功能^[4-5]。此外笔者所在课题组在对生长性能有显著差异的延边黄牛和韩延牛血液 exosome 中的 miRNA 进行差异分析时, 也发现在 2 个品种牛 exosome 中的 miRNA 存在着显著性差异, 因此笔者所在课题组选择以在延边黄牛和韩延牛血液 exosome 中有显著差异的 miRNA 去研究其对

延边黄牛的生长性能的调控具有一定意义。

笔者所在课题组的前期研究工作证明, 外胞体中的 miR-6523a 在延边黄牛和韩延牛之间呈现显著性差异表达, 因此推理 miR-6523a 可能参与了生长调控过程, 可能是造成延边黄牛和韩延牛生长性能差异的主要因素之一, 而在动物生长发育过程中, 生长轴起着关键的作用, 而在生长轴中腺垂体分泌的 GH 是最重要的成员之一^[13]。GH 可通过与生长激素结合蛋白 (GHBP) 结合而运输, 与靶器官上生长激素受体 (GHR) 结合, 促使胰岛素样生长因子 (IGFs) 的产生并进入血液循环, IGFs 再通过与胰岛素样生长因子结合蛋白 (IGFBP) 结合转运到全身组织细胞, 刺激骨、软骨细胞的生长和分化, 调节蛋白质、糖及脂肪的代谢等^[14]。因此, 本研究对 miR-6523a 与 GH 分泌之间的关系进行了探索。为初步确定 miR-6523a 是否与 GH 的分泌调控有

关,本研究首先通过生物学分析软件对 miR - 6523a 与 GH 分泌相关的调控基因进行了靶关系分析。研究资料表明,与 GH 合成分泌相关的基因主要有 *GHRHR*、*SSTR2*、*LEF1*、*POU1F1*、*SSTR5* 等^[15]。鉴于此,笔者所在课题组利用 targetscan 和 RNAhybrid 分析软件分别对 miR - 6523a 与 *GHRHR*、*SSTR2*、*LEF1*、*POU1F1* 和 *SSTR5* 的靶关系进行分析。分析结果表明,miR - 6523a 的种子序列只与 *SSTR5* 基因存在靶关系。研究表明,*SSTR5* 与生长抑素(SS)结合后通过与 G 蛋白偶联进而调控 GH 的合成^[16]。而通过进一步的荧光素酶报道基因验证结果显示,miR - 6523a 能显著降低 pirGLO - *SSTR5* - 3'UTR 正常质粒荧光素酶的活性,而对缺失载体的荧光素酶活性无影响,上述结果不仅说明 miR - 6523a 与 *SSTR5* 之间存在着靶位关系,同时可初步推测 miR - 6523a 是通过调控 *SSTR5* 的表达而影响 GH 分泌的。

为进一步验证 miR - 6523a 是否参与了垂体细胞 GH 的分泌调节,本研究利用 miR - 6523a mimics 和 inhibitor 对延边黄牛垂体细胞进行了转染试验,并利用 qPCR 和 Western Blot 技术对延边黄牛垂体细胞中 *GH* mRNA 和蛋白表达水平进行了检测。qPCR 和 Western Blot 检测结果显示,通过转染 miR - 6523a mimics 能极显著增加 *GH* mRNA 和蛋白的表达,而转染 miR - 6523a inhibitor 能降低相应 *GH* mRNA 和蛋白的表达,该结果说明 miR - 6523a 参与了调控垂体细胞中 GH 的分泌过程。

虽然,本研究通过生物信息学分析和报告基因系统验证了 miR - 6523a 与 *SSTR5* 的靶关系,但在垂体细胞水平上 miR - 6523a 对 *SSTR5* 基因表达具体影响结果仍然未知。因此,笔者所在课题组对延边黄牛垂体细胞进行 miR - 6523a mimics 和 inhibitor 转染试验,并利用 qPCR 和 Western Blot 检测 *SSTR5* 基因的 mRNA 和蛋白的表达变化。结果显示,通过转染 miR - 6523a - mi 能极显著降低 *SSTR5* mRNA 和蛋白的表达,而转染 miR - 6523a - in 能提高 *SSTR5* mRNA 和蛋白的表达。因此,此结果进一步证明了 miR - 6523a 与 *SSTR5* 之间存在靶关系,并说明 miR - 6523a 是通过与 *SSTR5* 作用而间接正调控 GH 分泌的。

总之,本研究结果证明,miR - 6523a 可以通过靶向 *SSTR5* 进而调节 GH 的表达。本研究成果将为

进一步研究外胞体 miRNA 调控动物生长发育机制提供理论依据,也将为延边黄牛生长发育调控提供新的作用靶标。

参考文献:

- [1] 王志刚,刘 和,杨胤轩. “延边黄牛”地理标志的历史沿革、发展现状、存在问题及前景展望[J]. 农业经济与管理,2014(3): 67 - 71.
- [2] 金海国,曹 阳,臧延青,等. 微卫星 DNA 与延边黄牛肉用生长性状关系[J]. 中国兽医学报,2004,24(3):285 - 288.
- [3] 夏广军,严昌国,金海国,等. 延边黄牛 *TG* 基因多态性与胴体和肉质性状相关性分析[J]. 中国兽医学报,2014,34(3):500 - 504.
- [4] Melnik B C, John S M, Schmitz G. Milk is not just food but most likely a genetic transfection system activating mTORC1 signaling for postnatal growth[J]. Nutrition Journal,2013,12(1):103 - 108.
- [5] 陈 婷. 猪乳外胞体中 mRNAs、蛋白质和 miRNAs 的挖掘及功能分析[D]. 广州:华南农业大学,2014:17 - 37.
- [6] 刘建文,施用晖,乐国伟. 动物生长轴的激素调控[J]. 中国饲料,2003(14):7 - 9.
- [7] 姜克杰,赵景鹏,黄 辉. 神经内分泌生长轴及其对畜禽的生长调控[J]. 中国饲料添加剂,2006(11):1 - 4.
- [8] Deghenghi R, Avallone R, Torsello A, et al. Growth hormone - inhibiting activity of cortistatin in the rat [J]. Journal of Endocrinological Investigation,2001,24(11):RC31 - RC33.
- [9] Korbonits M, Grossman A B. Growth hormone - releasing peptide and its analogues; novel stimuli to growth hormone release[J]. Trends in Endocrinology and Metabolism,1995,6(2):43 - 49.
- [10] 关立增,姜安钢,朴明淑,等. 延边黄牛与韩延牛血液 Exosome 对延边黄牛垂体细胞中 GH 含量的影响[J]. 安徽农业科学,2016,44(1):105 - 107.
- [11] Alvarez - Erviti L, Seow Y, Yin H, et al. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes[J]. Nature Biotechnology,2011,29(4):341 - 345.
- [12] Valadi H, Ekström K, Bossios A, et al. Exosome - mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells [J]. Nature Cell Biology,2007,9(6):654 - 659.
- [13] 王开云,张国生,曾检华,等. 利用生长轴各激素调控动物生长[J]. 江西畜牧兽医杂志,2008(6):4 - 6.
- [14] 张成龙. 南方黄牛生长发育及其垂体组织转录组分析[D]. 扬州:扬州大学,2016:21 - 45.
- [15] 柒启恩. SD - 大鼠垂体 miRNAs 的时序表达规律及功能分析[D]. 广州:华南农业大学,2015:32 - 76.
- [16] Horvath T L, Diano S, Sotonyi P, et al. Minireview: ghrelin and the regulation of energy balance: a hypothalamic perspective [J]. Endocrinology,2001,142(10):4163 - 4169.