

Ghrelin 免疫反应阳性细胞在鸡外周器官中的定位分布与发育性变化

魏凤梅¹, 李玉谷^{1*}, 叶远兰^{1,2}, 张媛¹, 马勇江¹, 江青艳¹

(1. 华南农业大学兽医学院, 广州 510642; 2. 仲恺农业工程学院, 广州 510225)

摘要: 本试验应用免疫组织化学方法和显微图像分析技术, 研究了 2、16、30、44、58 日龄岭南黄鸡外周器官中 Ghrelin 免疫反应阳性细胞的定位分布与发育性变化。结果表明, 在鸡腺胃、肠、心、肝、脾、肺、肾、胰、脑垂体、肾上腺、胸腺、法氏囊中均可观察到 Ghrelin 免疫阳性反应。其阳性细胞类型包括: 腺胃腺小管的内分泌细胞, 肠道黏膜上皮和肠腺内的内分泌细胞, 肠道黏膜下层和肌层间的神经丛, 心内膜下层的蒲肯野纤维, 肝血窦中的枯否氏细胞, 脾的巨噬细胞和网状细胞, 肺的巨噬细胞, 肾脏肾小囊壁层的扁平上皮细胞和脏层的足细胞、球内系膜细胞和球旁复合体, 胰腺的胰岛细胞, 腺垂体的部分嗜酸性细胞和嗜碱性细胞, 肾上腺的嗜铬细胞, 胸腺上皮细胞、胸腺小体和巨噬细胞, 法氏囊黏膜上皮和小结相关上皮内的内分泌细胞、囊小结的网状细胞、巨噬细胞、皮质髓质交界处的上皮细胞等。2~30 日龄鸡, 随着日龄的增长, 各器官中的 Ghrelin 表达量增加, 44、58 日龄则有所下降。

关键词: Ghrelin 免疫反应阳性细胞; 定位; 发育; 鸡

中图分类号: S852.16

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)03-0341-06

Localization and Development of Ghrelin-immunopositive Cells in Periphery Organs of Broiler Chickens

WEI Feng-mei¹, LI Yu-gu^{1*}, YE Yuan-lan^{1,2}, ZHANG Yuan¹, MA Yong-jiang¹, JIANG Qing-yan¹

(1. College of Veterinary Medicine, South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China;

2. Zhong Kai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

Abstract: In order to investigate the distribution of ghrelin-immunopositive cells in chickens, some samples of broiler chickens aged 2, 16, 30, 44 and 58 d were collected and studied by immunohistochemistry and microscopic image analysis. The ghrelin-immunopositive reaction was found in the glandular stomach, intestine, heart, liver, spleen, lung, kidney, pancreas, pituitary, adrenal gland, thymus, and bursa of Fabricius. The types of ghrelin-immunopositive cells (ghrelinic) were as follows: some endocrine cells and nerve plexes in the glandular stomach and intestine; Purkinje fibers in heart; Kupffer's cells in liver; macrophages and reticular cells in spleen; pulmonary macrophages; podocytes, Intraglomerular mesangial cells, Juxtaglomerular cells in kidney; pancreatic islets cells in pancreas; some acidophilic cells and basophilic cells in pituitary; chromaffin cells in adrenal gland; thymic epithelial cells, thymic corpuscles and macrophages in thymus; some endocrine cells, reticular cells, macrophages and epithelial cells in bursa of Fabricius. With the chicken growth, the expressive contents of ghrelin were increased from aged 2 to 30 d, but slightly decreased at aged 44 and 58 d in various organs of chickens.

Key words: ghrelin-immunopositive cells; localization; development; chickens

收稿日期: 2009-09-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(30471268; 30871834)

作者简介: 魏凤梅(1980-), 女, 河南濮阳人, 硕士, 主要从事动物组织胚胎学研究

* 通讯作者: 李玉谷, Tel: 020-85283226, E-mail: liyugu@scau.edu.cn

Ghrelin,一种新发现的脑肠肽激素,最早由Kojima等^[1]从大鼠胃组织中分离提取,是生长激素促分泌素受体(GHSR)的内源性配体,可以刺激垂体释放GH。此外,Ghrelin还参与胃肠道生理功能的调节,如促进胃酸分泌、调节胃肠运动、促进肠上皮细胞的更新、保护胃黏膜等^[2-3];促进哺乳动物摄食活动,但对禽类的摄食有抑制作用^[4-5];刺激促肾上腺皮质激素、氢化可的松、儿茶酚胺和催乳素的释放^[6];调节胰腺内分泌^[7-8]功能;调节能量平衡^[9-10];参与免疫调节^[11];降低心血管阻力,改善心血管功能^[12];促进脂肪沉积^[13];调节卵巢^[14]和睾丸^[15]的功能;增强记忆^[16]等。

关于Ghrelin的形态学,以往在哺乳类进行过一些研究,但在禽类研究较少。Ghrelin分泌细胞最初发现于大鼠胃部泌酸腺的颈部至底部,随后又在脑垂体、肾脏、心脏、胎盘、甲状腺、胰腺、肺脏、脂肪组织、骨骼肌、生殖系统、免疫系统等处检测到*Ghrelin* mRNA的表达及Ghrelin的分泌^[17-19]。此前,本课题组应用免疫组织化学方法,对鸡神经系统中的Ghrelin免疫反应阳性神经元的定位分布和发育性变化进行了研究(另文报道)。本试验进一步探讨Ghrelin免疫反应阳性细胞在鸡外周器官中的定位分布和发育性变化,为深入揭示鸡Ghrelin的生理功能及其作用机制提供形态学资料。

1 材料与方法

1.1 试验动物、样品采集及组织制片

购自广东省农科院畜牧研究所的1日龄岭南黄鸡35只,常规饲养,自由采食和饮水。分别于2、16、30、44和58日龄时,选取眼观健康的鸡各5只,断头处死,采集腺胃、肌胃、十二指肠("U"状弯曲起始向下3cm处)、胰腺、空肠(中部)、回肠、盲肠、结肠、肝脏、心脏(左心室)、肺、胸腺、脾、法氏囊、肾、肾上腺、脑垂体等,立即置于4%多聚甲醛固定液中,4℃固定1h后,修整组织块,继续放入上述固定液中再固定24h,按常规方法制成石蜡切片,厚度为5μm。

1.2 主要试剂

兔抗鼠Ghrelin抗体(康肽生物科技有限公司,批号H-031-31);二抗显色试剂盒(LAB VISIONA公司);多聚赖氨酸(灏洋生物制品科技有限责任公司)。

1.3 免疫组织化学染色

采用SP免疫组织化学染色法。步骤如下:将石蜡切片粘贴在经多聚赖氨酸处理的防脱玻片上;切片经二甲苯脱蜡,梯度酒精复水;甲醇配制的0.3%过氧化氢阻断液中室温孵育10min,以消除内源性过氧化氢酶导致的非特异性背景染色;PBS(0.01mol·L⁻¹,pH7.2。下同)洗涤5min×3次;滴加正常血清封闭液,室温孵育7min,以消除非特异性抗体的染色;PBS略洗;滴加1:1000兔抗鼠Ghrelin血清(一抗),37℃,湿盒内孵育2h;PBS洗涤5min×3次;滴加生物素结合的羊抗兔抗体(二抗),37℃,湿盒内孵育1h;PBS洗涤5min×3次;滴加链霉素抗生物素结合的过氧化物酶,37℃,湿盒内孵育30min;PBS洗涤5min×3次;滴加DAB(二氨基联苯胺),孵育15min;PBS洗涤5min;苏木精复染细胞核、脱水、透明、中性树胶封固,光镜观察并照相。

阴性对照以PBS代替一抗,其他步骤同上。同时,另取相邻切片进行常规苏木精-伊红染色,作为Ghrelin免疫反应阳性细胞定位的参照。

1.4 显微图像分析与统计学处理

应用BH-2 Olympus显微镜,在10×40放大倍数下,在每个年龄组每只鸡的腺胃、小肠、胰腺、胸腺、心脏、肝脏、肾上腺和法氏囊的免疫组织化学染色切片中,各随机选取5个不同视野观察记录 and 数码拍照。应用JD801形态学图像分析系统,测量每个年龄组鸡上述器官中Ghrelin免疫反应阳性细胞的灰度值。灰度值分为256级,从0~255,0为最深,表示阳性反应最强,255为最浅,表示阳性反应最弱。并用SPSS14.0数据分析软件中的单因素方差分析法(ANOVA)中的L-S-D分析不同年龄组鸡上述器官的Ghrelin免疫反应阳性细胞平均灰度值之间的差异性。

2 结果

免疫组织化学染色切片,背景无色或浅黄色。Ghrelin免疫阳性反应为棕褐色或棕黄色颗粒,分布于细胞质中,细胞核内量少或无反应。阴性对照不显示免疫阳性反应,细胞核由于苏木精的复染呈蓝色,细胞质无色。本试验在2、16、30、44、58日龄鸡的腺胃、十二指肠、心、肝、脾、肺、肾、胰腺、脑垂体、肾上腺、胸腺、法氏囊等器官中观察到Ghrelin免疫阳性反应(图1)。

Ghrelin 免疫反应阳性细胞包括: 腺胃黏膜上皮内散在的内分泌细胞和固有层结缔组织中的巨噬细胞, 黏膜下层腺小管上的内分泌细胞, 肌间神经丛中的神经元胞体; 肠道黏膜上皮及腺体内散在的内分泌细胞, 肠道肌间神经丛中的神经元胞体; 胸腺皮质区的扁平上皮细胞和星形上皮细胞及间隙内散在的巨噬细胞, 胸腺髓质区的上皮性网状细胞、巨噬细胞和胸腺小体; 心内膜下层的蒲肯野纤维; 肝血窦中散在的枯否氏细胞; 脾红髓中散在的巨噬细胞, 白髓中的网状细胞和浆细胞; 肺中散在的巨噬细胞; 肾脏肾小囊壁层的扁平上皮细胞和脏层的足细胞, 肾小体血管球中的球内系膜细胞, 球旁复合体中的球旁细胞和球外系膜细胞; 胰腺的胰岛细胞; 腺垂体的部分嗜酸性细胞和嗜碱性细胞; 肾上腺的嗜铬细胞和部分肾间组织细胞; 法氏囊黏膜上皮和小结相关上皮内散在的内分泌细胞, 囊小结的上皮性网状细胞、巨噬细胞和皮质髓质交界处的上皮细胞层等。

不同日龄鸡的 Ghrelin 免疫反应阳性细胞种类基本相同, 但 Ghrelin 的表达量有一定差异。2~30 日龄, 随着日龄的增长, Ghrelin 的表达量增加, 44、

58 日龄则比 30 日龄有所下降(表 1)。与 2 日龄相比, 16 日龄各器官中 Ghrelin 免疫反应阳性细胞的数量有所增加、反应强度有所增大; 肾脏的足细胞、球内系膜细胞、球旁复合体以及肾上腺出现阳性反应; 胸腺髓质区的阳性细胞数量明显增多, 上皮性网状细胞和胸腺小体出现阳性反应; 心内膜下层的蒲肯野纤维阳性反应增强; 肝血窦中的阳性细胞数量增多; 腺胃黏膜下层的阳性反应亦有所增强; 但肠道中的阳性细胞数量和反应强度变化不大。30 日龄, Ghrelin 免疫反应阳性细胞的轮廓更加清晰可辨, 各器官中的阳性细胞数量明显增加、反应强度明显增大; 腺胃腺小叶基部存在较多强阳性反应的腺细胞, 胞体小立方, 胞核圆形或卵圆形, 胞质中充满棕黄色染色颗粒; 小肠黏膜上皮中亦有较多的阳性细胞, 胞体呈长条状, 胞核浅染, 胞质深染成棕黑色; 肠腺内同样有较多的阳性细胞, 胞体呈球形或三角形, 胞核圆而透亮。44、58 与 30 日龄相比, 肝血窦中的阳性细胞明显减少, 其他器官则差别不大, 但反应强度有所减弱。

表 1 不同日龄鸡部分器官中 Ghrelin 免疫反应阳性细胞的灰度值(平均数±标准误)

Table 1 The grayscale of ghrelin-immunopositive cells in some organs of broiler chickens aged 2-58 days(means±SE)

| 日龄/d | 腺胃 | 小肠 | 胸腺 | 心脏 |
|------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Day | Glandular stomach | Intestine | Thymus | Heart |
| 2 | 198.194 9±9.002 7 ^a | 152.381 8±1.004 1 ^a | 154.412 5±2.199 5 ^a | 156.199 9±4.006 7 ^a |
| 16 | 174.016 4±1.912 0 ^a | 142.378 0±1.367 3 ^a | 125.930 5±1.991 3 ^a | 116.151 4±2.205 3 ^b |
| 30 | 96.624 0±1.425 4 ^b | 114.048 5±4.198 4 ^b | 114.565 8±2.526 9 ^b | 96.659 6±0.908 5 ^b |
| 44 | 113.563 5±1.118 0 ^b | 125.331 9±2.103 4 ^a | 134.270 7±1.290 7 ^a | 114.270 5±4.242 2 ^b |
| 58 | 138.167 1±2.237 2 ^b | 139.399 5±0.907 1 ^a | 139.154 4±2.387 2 ^a | 122.436 9±2.320 1 ^a |
| 日龄/d | 肝脏 | 胰腺 | 肾上腺 | 法氏囊 |
| Day | Liver | Pancreas | Adrenal gland | Bursa of Fabricius |
| 2 | 148.516 2±4.006 8 ^a | 165.719 2±12.354 2 ^a | 159.356 0±0.747 6 ^a | 148.694 0±1.500 8 ^a |
| 16 | 137.209 7±2.205 3 ^a | 150.348 7±1.308 4 ^a | 146.602 2±0.963 8 ^a | 134.437 9±1.510 9 ^a |
| 30 | 97.849 8±0.908 5 ^b | 114.076 0±2.334 6 ^b | 108.766 0±1.666 6 ^b | 112.502 3±1.431 2 ^b |
| 44 | 123.833 5±4.242 2 ^a | 140.632 9±1.531 1 ^a | 139.761 4±4.363 7 ^a | 125.550 0±1.483 3 ^a |
| 55 | 125.214 9±2.320 1 ^a | 152.336 0±4.235 1 ^a | 148.711 9±3.615 6 ^a | 138.963 1±1.074 8 ^a |

同一列中标有不同字母表示差异显著($P < 0.05$), 标有相同字母表示差异不显著($P > 0.05$)

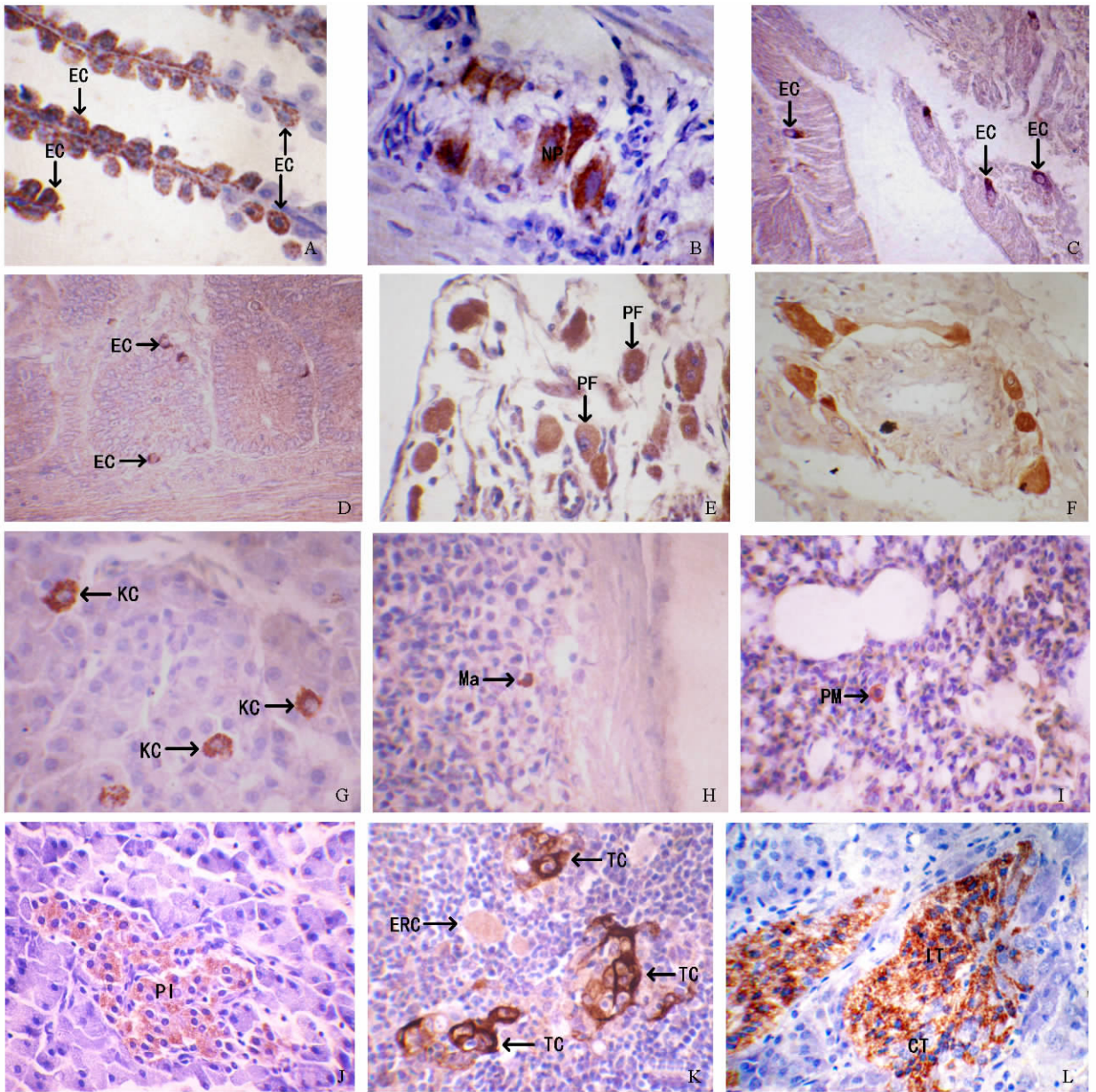
In the same column, different letters indicate significant difference($P < 0.05$), the same letter indicates no difference($P > 0.05$)

3 讨论

3.1 关于鸡外周器官中 Ghrelin 免疫反应阳性细胞的定位分布

本试验在鸡腺胃腺小叶基部观察到众多强染色的 Ghrelin 免疫反应阳性细胞; 在腺胃皱褶基底区存在少量的 Ghrelin 免疫反应阳性细胞, 这些细

胞的免疫染色主要局限于细胞质的基底区, 细胞呈小球形, 也有少数呈长条状。据报道, 3 月龄鸡的 Ghrelin 免疫反应阳性细胞可见于腺胃、小肠和大肠中; 在腺胃, 这些细胞通常位于腺小叶基底部和皱褶基底区, 大多呈小球形, 细胞质基底部有致密的免疫阳性反应, 为“闭合型细胞”, 与胃腔没有直接联系; 还有少量细胞呈长条状, 通过细胞质顶点与胃腔相连, 为“开放型细胞”^[19]。



A. 腺胃; B. 腺胃; C. 小肠; D. 小肠; E. 心内膜; F. 房室束; G. 肝; H. 脾; I. 肺; J. 胰腺; K. 胸腺; L. 肾上腺。EC. 内分泌细胞; NP. 神经丛; PF. 蒲肯野纤维; KC. 枯否氏细胞; Ma. 巨噬细胞; PM. 肺巨噬细胞; PI. 胰岛; TC. 胸腺小体; ERC. 上皮性网状细胞; CT. 嗜铬组织; IT. 肾间组织。免疫组化-苏木精染色(A~I, $\times 600$; J~L, $\times 400$)

A. Glandular stomach; B. Glandular stomach; C. Small intestine; D. Small intestine; E. Endocardium; F. Atrioventricular bundle; G. Liver; H. Spleen; I. Lung; J. Pancreas; K. Thymus; L. Adrenal gland. EC. Endocrine cells; NP. Nerve plexes; PF. Purkinje fibres; KC. Kupffer's cells; Ma. Macrophages; PM. Pulmonary macrophage. PI. Pancreatic islets; TC. Thymic corpuscles; ERC. Epithelial-reticular cell; CT. Chromaffin tissue; IT. Interrenal tissue. IHC-H(A-I, $\times 600$; J-L, $\times 400$)

图1 鸡体内 Ghrelin 免疫反应阳性细胞的定位分布

Fig. 1 Localization of ghrelin-immunopositive cells in broiler chickens

本试验结果显示,16日龄鸡小肠中存在少量的闭合型和开放型 Ghrelin 免疫反应阳性细胞,30日龄阳性细胞剧增,44与30日龄相差不大,但58日龄阳性细胞明显减少。30日龄鸡十二指肠黏膜上

皮、肠绒毛上皮和肠腺上皮内同时存在闭合型和开放型细胞,肠绒毛上皮内存在较多的锥形阳性细胞;空肠和回肠也存在闭合型和开放型阳性细胞,但细胞数量较十二指肠明显减少,在肠腺中存在一定

量的阳性细胞,而在肠绒毛中阳性细胞极少。这与以往报道有所不同。据报道,30 日龄鸡从幽门一直到远端肠道,Ghrelin 免疫反应逐渐下降,在十二指肠中存在两种类型的阳性细胞,而在空肠和回肠中阳性细胞数量减少,且主要为闭合型细胞,在结肠中存在少量的呈三角形的闭合型细胞^[19]。在十二指肠隐窝(肠腺)上皮和绒毛上皮内分布有较多的 Ghrelin 免疫反应阳性细胞,同时存在闭合型和开放型细胞;但在空肠和回肠隐窝上皮中阳性细胞相对较少,通常为闭合型;在结直肠隐窝中只有极少量的阳性细胞,都为闭合型,胞体呈三角形^[20]。此外,本试验还发现,在腺胃肌间神经丛和肠黏膜下层的神经丛中,存在 Ghrelin 免疫反应阳性神经元,免疫反应见于神经元的胞体和胞核内。

本试验结果表明,鸡胸腺的扁平上皮细胞、星形上皮细胞、胸腺小体上皮细胞和巨噬细胞均呈 Ghrelin 免疫阳性反应;2 日龄鸡阳性细胞主要集中在胸腺皮质区的上皮细胞,16、30、44、58 日龄阳性细胞明显增多,胸腺小体上皮细胞出现强阳性反应。脾脏的网状细胞、巨噬细胞和浆细胞也呈 Ghrelin 免疫阳性反应。法氏囊的黏膜上皮中散在有少量的 Ghrelin 免疫反应阳性细胞,固有层中囊小结的上皮性网状细胞、巨噬细胞、皮质髓质交界处的上皮细胞层都呈 Ghrelin 免疫阳性反应。据报道,哺乳类的 T 细胞、B 细胞、巨噬细胞、单核细胞、树状突细胞等能产生 Ghrelin,并有 *GHSR* mRNA 的表达^[11,21]。

本试验结果显示,胰腺的胰岛细胞呈 Ghrelin 免疫阳性反应,且胰岛外周的细胞较中央的细胞免疫反应强,具体是什么细胞有待于今后深入研究。此外,分布于胰腺小叶间结缔组织中的神经元呈 Ghrelin 免疫阳性反应,小叶间导管上皮内散在有 Ghrelin 免疫反应阳性细胞。据报道,大鼠胰岛的 A 细胞和 B 细胞存在 *GHSR*,A 细胞能合成和分泌 Ghrelin,并通过自分泌或旁分泌的方式作用于 A 细胞本身;此外,Ghrelin 可能通过和 *GHSR* 的相互作用,调节 B 细胞胰岛素的分泌^[22]。

本试验结果表明,肾脏的球旁复合体、肾小囊壁层的扁平上皮细胞和脏层的足细胞、球内系膜细胞均呈 Ghrelin 免疫阳性反应。据报道,小鼠肾脏能分泌 Ghrelin;此外,Ghrelin 前体基因在体外培养的大鼠肾小球系膜细胞和小鼠肾小球足细胞中有表达,同时 Ghrelin 受体基因在大鼠肾脏中有表达;Ghrelin 在大鼠肾脏中起着自分泌或旁分泌的作

用^[23]。

本试验发现,位于心内膜下层的蒲肯野纤维和位于房室束周边的特化心肌纤维呈 Ghrelin 免疫阳性反应,说明心脏传导系统的心肌纤维也有内分泌功能。以往研究表明,离体鼠类和人类心肌细胞能合成和分泌 Ghrelin,且 Ghrelin 存在于成年小鼠 HL-1 细胞的细胞质和离体人心肌初级培养物中^[24]。

本试验还发现,肾上腺嗜铬细胞呈 Ghrelin 免疫阳性反应外,肾间组织的部分腺细胞也呈 Ghrelin 免疫阳性反应。据报道,大鼠肾上腺嗜铬细胞可以表达 Ghrelin^[25]。

此外,本试验还表明,肝血窦中的枯否氏细胞、肺中的巨噬细胞也呈 Ghrelin 免疫阳性反应。以上结果进一步说明,Ghrelin 分布广泛,其功能可能复杂。

3.2 关于鸡外周器官中 Ghrelin 的发育性变化

本试验结果表明,2~30 日龄鸡,随着日龄的增长,各器官中的 Ghrelin 表达量增加,44、58 日龄则有所下降。据报道,刚出壳鸡腺胃中只有少量 Ghrelin 免疫反应阳性细胞,而成年鸡腺胃黏膜中分布有许多阳性细胞,成年鸡腺胃阳性细胞密度显著大于刚出壳鸡^[18]。15~19 d 鸡胚,腺胃 *Ghrelin* mRNA 水平较低,出壳后 2 d 升高,一直维持到 30 d,之后 44 d 下降,58 d 又有所上升;肝的 *Ghrelin* mRNA 水平从胚胎期到成年期没有太大的变化;脑的 *Ghrelin* mRNA 水平同肝的相似,只是在 30 d 显著升高^[26]。

参考文献:

- [1] KOJIMA M, HOSODA H, DATE Y, et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach[J]. *Nature*, 1999, 402(6762): 656-660.
- [2] MASUDA Y, TANAKA T, INOMATA N, et al. Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 276(3): 905-908.
- [3] BRZOWSKI T, KONTUREK P C, KONTUREK S J, et al. Exogenous and endogenous ghrelin in gastroprotection against stress-induced gastric damage[J]. *Regulatory Peptides*, 2004, 120(1-3): 39-51.
- [4] NAKAZATO M, MURAKAMI N, DATA Y, et al. A role for ghrelin in the central regulation of feeding[J]. *Nature*, 2001, 409(6817): 194-198.

- [5] FURUSE M, TACHIBANA T, OHGUSHI A, et al. Intracerebroventricular injection of ghrelin and growth hormone releasing factor inhibits food intake in neonatal chicks [J]. *Neurosci Lett*, 2001, 301(2): 123-126.
- [6] TAKAYA K, ARIYASU H, KANAMOTO N, et al. Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, 85(12): 4908-4911.
- [7] BAGNASCO M, TULIPANO G, MELIS M R, et al. Endogenous ghrelin is an orexigenic peptide acting in the arcuate nucleus in response to fasting[J]. *Regulatory Peptides*, 2003, 111(1-3): 161-167.
- [8] OTTO B, CUNTZ U, FRUEHAUF E, et al. Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa[J]. *Eur J Endocrinology*, 2001, 145(5): 669-673.
- [9] BARREIRO M L, TENA-SEMPERE M. Ghrelin and reproduction: a novel signal linking energy status and fertility? [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2004, 226(1-2): 1-9.
- [10] MEIER U, GRESSNER A M. Endocrine regulation of energy metabolism; review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin [J]. *J Clinical Chemistry*, 2004, 50(9): 1511-1525.
- [11] DIXIT V D, TAUB D D. Ghrelin and immunity: A young player in an old field[J]. *Experimental Gerontology*, 2005, 40(11): 900-910.
- [12] NAGAYA N, UEMATSU M, KOJIMA M, et al. Chronic administration of Ghrelin improves left ventricular dysfunction and attenuates development of cardiac cachexia in rats with heart failure[J]. *Circulation*, 2001, 104: 1430-1435.
- [13] TSCHÖP M, SMILEY D L, HEIMAN M L. Ghrelin induces adiposity in rodents[J]. *Nature*, 2000, 407(6806): 908-913.
- [14] AART J L, MATTHIAS P, MARK L H, et al. Biological, physiological, pathophysiological and pharmacological aspects of ghrelin [J]. *Endocrine Reviews*, 2004, 25(3): 426-457.
- [15] BARREIRO M L, GAYTAN F, CASTELLANO J M, et al. Ghrelin inhibits the proliferative activity of immature Leydig cells *in vivo* and regulates stem cell factor messenger ribonucleic acid expression in rat testis [J]. *Endocrinology*, 2004, 145 (11): 4825-4834.
- [16] CARLINI V P, MONZÓN M E, VARAS M M, et al. Ghrelin increases anxiety-like behavior and memory retention in rats[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 299(5): 739-743.
- [17] GNANAPAVAN S, KOLA B, BUSTIN S A, et al. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHSR, in humans[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(6): 2988-2991.
- [18] WADA R, SAKATA I, KAIYA H, et al. Existence of ghrelin-immunopositive and -expressing cells in the proventriculus of the hatching and adult chicken[J]. *Regulatory Peptides*, 2003, 111(1-3): 123-128.
- [19] NEGLIA S, ARCAMONE N, ESPOSITO V, et al. Ghrelin in the gastroenteric tract of birds: Immunoreactivity expression[J]. *Veterinary Research Communications*, 2004, 28(suppl 1): 213-215.
- [20] NEGLIA S, ARCAMONE N, ESPOSITO V, et al. Presence and distribution of ghrelin-immunopositive cells in the chicken gastrointestinal tract[J]. *Acta Histochem*, 2005, 107(1): 3-9.
- [21] HATTORI N, SAITO T, YAGYU T, et al. GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86(9): 4284-4291.
- [22] KAGEYAMA H, FUNAHASHI H, HIRAYAMA M, et al. Morphological analysis of ghrelin and its receptor distribution in the rat pancreas[J]. *Regulatory Peptides*, 2004, 126 (1-2): 67-71.
- [23] MORI K, YOSHIMOTO A, TAKAYA K, et al. Kidney produces a novel acylated peptide, ghrelin [J]. *FEBS Letters*, 2000, 486(3): 213-216.
- [24] MARI' A JI, ROBERTO P, MONTSERRAT B, et al. Growth hormone releasing peptide (ghrelin) is synthesized and secreted by cardiomyocytes[J]. *Cardiovascular Research*, 2004, 62(3): 481-488.
- [25] RAGHAY K, GARCIA-CABALLERO T, BRAVO S, et al. Ghrelin localization in the medulla of rat and human adrenal gland and in pheochromocytomas[J]. *Histol Histopathol*, 2008, 23(1): 57-65.
- [26] CHEN L L, JIANG Q Y, ZHU X T, et al. Ghrelin ligand-receptor mRNA expression in hypothalamus, proventriculus and liver of chicken (*Gallus gallus domesticus*): Studies on ontogeny and feeding condition [J]. *Comp Biochem Physiol Part A*, 2007, 147(4): 893-902.