

大鼠耳蜗前体细胞的体外培养与分化鉴定

姚俊¹, 王帅¹, 魏钦俊¹, 鲁雅洁¹, 邢光前², 曹新^{1*}

(¹南京医科大学生物技术系, 江苏 南京 210029; ²南京医科大学第一附属医院耳鼻咽喉科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 分离、培养大鼠的耳蜗前体细胞, 鉴定其增殖和分化能力, 分析内耳发育相关基因在其分化中的表达。方法: 从新生大鼠的耳蜗组织中分离获得前体细胞, 进行体外培养, 并加入血清诱导分化, 通过免疫细胞化学的方法鉴定其增殖和分化为毛细胞的能力, 利用荧光定量 PCR 的方法分析不同分化阶段的耳蜗前体细胞中内耳发育相关基因的表达。结果: 原代培养的耳蜗前体细胞经免疫细胞化学鉴定呈 nestin、BrdU 阳性, 经血清诱导分化后呈 myosin VII A 阳性。荧光定量 PCR 的结果表明 Sox2、CyclinA2 在耳蜗前体细胞分化的过程中表达逐渐下降, 而 Jagged1 在分化过程中表达不断升高。结论: 分离的耳蜗前体细胞具有增殖能力和分化为毛细胞的潜能, 在其分化过程中 Sox2、CyclinA2 和 Jagged1 可能参与调控大鼠前体细胞的分化和耳蜗组织的发育。

[关键词] 耳蜗前体细胞; 增殖; 分化; 基因表达

[中图分类号] Q813.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)04-450-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20150403

In vitro culture, differentiation, and identification of cochlear progenitor cells derived from newborn rats

Yao Jun¹, Wang Shuai¹, Wei Qinjun¹, Lu Yajie¹, Xing Guangqian², Cao Xin^{1*}

(¹Department of Biotechnology, NJMU, Nanjing 210029; ²Department of Otolaryngology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** We sought to culture and isolate cochlear progenitor cells (CPCs), identify their proliferation and differentiation capacity, and demonstrate the expression of genes involved with the development of inner ear during the CPCs differentiation. **Methods:** CPCs were isolated from newborn rats' cochlea, *in vitro* cultured and differentiated by serum. Proliferation and differentiation of hair cells were identified by immunocytochemistry method. The expressions of Sox2, CyclinA2, and Jagged1 genes during CPCs differentiation were analyzed using real time qRT-PCR. **Results:** The cultured CPCs expressed nestin and BrdU, indicating the proliferation ability of CPCs undergoing mitosis. The expression of myosin VII A in the CPCs-derived differentiated cells indicated the CPCs' potential to differentiate into hair cells. It was also noteworthy that the expressions of Sox2 and CyclinA2 were downregulated and the Jagged1 expression was upregulated during the CPCs differentiation. **Conclusion:** The CPCs *in vitro* culture showed that it has the ability of proliferation and potential of differentiation into hair cells. Additionally, it was suggested that Sox2, CyclinA2 and Jagged1 genes could potentially participate in the modulation of CPCs differentiation and development of cochlear tissues in rats.

[Key words] cochlear progenitor cells; proliferation; differentiation; gene expression

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(04): 450-454]

感音性耳聋主要是因为神经元和听觉毛细胞由于各种因素受到了损伤导致不能自然再生引起的。耳蜗前体细胞(cochlear progenitor cells, CPCs)是具有增殖能力和多向分化潜能的细胞^[1-3], 体外培养

条件下的 CPCs 经血清诱导后能分化为毛细胞和螺旋神经元样细胞, 与其他干细胞相比, 耳蜗前体细胞理论上更容易分化为听觉毛细胞, 提示其可用作治疗感音性耳聋的候选细胞。此外, 体外培养研究 CPCs 分化的机制有助于理解耳蜗组织的发育机制, 为以后修复受损的听觉毛细胞提供依据和指导。本研究中, 首先从新生大鼠的耳蜗中分离、体外培养

[基金项目] 国家自然科学基金(31171217)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: caoxin@njmu.edu.cn

CPCs, 再通过免疫细胞荧光的方法对 CPCs 的增殖能力及血清诱导后的分化潜能进行鉴定, 并检测 Sox2、Jagged1 及 CyclinA2 基因在 CPCs 分化过程中的表达, 为探讨其在大鼠耳蜗发育中的作用机制奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

新生 SD 大鼠由南京医科大学实验动物中心提供; DMEM/F12 培养液、胰蛋白酶(Invitrogen 公司, 美国); 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、Hanks' 平衡盐溶液(Hanks' balanced salt solution, HBSS)(HyClone 公司, 美国); 表皮细胞生长因子(epidermal growth factor, EGF)、无血清培养液添加剂 N2 和 B27、多聚赖氨酸(Sigma 公司, 美国); 碱性成纤维细胞生长因子(basic-fibroblast growth factor, bFGF; Pepro Tech 公司, 英国); 小鼠抗 nestin 单抗、兔抗 BrdU 单抗、兔抗 myosin VII A 多抗(Chemicon 公司, 美国); 羊抗小鼠二抗(Proteintech 公司, 美国); cy3 标记的羊抗兔二抗(Sigma 公司, 美国)。

1.2 方 法

1.2.1 耳蜗组织的分离

新生 1 d SD 大鼠(P1)经 3%戊巴比妥钠腹腔麻醉、75%乙醇浸泡消毒后, 迅速断头处死, 取出双侧颞骨置于 4℃预冷的生理盐水; 解剖显微镜下分离多余的组织, 将耳蜗完全暴露; 剥除未骨化的蜗壳, 沿蜗轴分离螺旋韧带、血管纹及基底膜, 再将基底膜与螺旋韧带、血管纹剥离。分离的基底膜用虹膜剪剪成 0.5 mm³ 大小的碎片, 0.25%胰蛋白酶 37℃消化 25 min, 每 5 min 震荡 1 次; 反复轻轻吹打消化液, 以 10% FBS 中止消化 5 min, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, HBSS 清洗 2 次, 用含无血清培养液添加剂 N2 和 B27 的 DMEM/F12 培养液重悬细胞, 100 目滤网过滤, 滤液离心后去除上清液, 将细胞重悬于培养液中, 用火焰抛光的 Pasteur 管轻轻反复吹打, 获得单细胞悬液。

1.2.2 CPCs 培养

台盼蓝染色后进行细胞计数, 以 5×10⁴ 个/ml 的活细胞密度接种到细胞培养瓶中, 放入 5%CO₂ 的培养箱中, 37℃培养 4 d 后用于 CPCs 增殖与分化能力的鉴定试验, 或每培养 5 d 传代 1 次, 仍以 5×10⁴ 个/ml 的活细胞密度传代。细胞培养液组成: DMEM/F12 培养液(1:1)、EGF(终浓度 20 ng/ml)、bFGF(终浓度 20 ng/ml)、N2(1 ml/100 ml 培养液)、B27(2 ml/

100 ml 培养液)和青霉素(100 U/ml)。

1.2.3 CPCs 增殖能力的鉴定

1.2.3.1 nestin 免疫细胞化学鉴定

将培养 4 d 的 CPCs 收集至离心管, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加入 10%FBS 的 DMEM/F12 培养液重悬细胞, 接种于多聚赖氨酸包被的盖玻片, 置于 5%CO₂ 培养箱 37℃培养 4 h, 吸去血清培养液, 用 0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min×2 次。4%多聚甲醛固定 20 min, 0.01 mol/L PBS 洗涤 5 min×3 次; 1% Triton X-100 37℃孵育 15 min, 0.01 mol/L 的 PBS 洗涤 5 min×3 次; 含 5% FBS 的 0.01 mol/L PBS 37℃封闭 30 min。除去封闭液, 用一抗即小鼠抗 nestin 单抗(1:100)4℃下孵育过夜, 0.01 mol/L PBS 洗涤 5 min×3 次; 加入 cy3 标记的羊抗小鼠二抗(1:100), 37℃孵育 30 min, 0.01 mol/L PBS 洗涤 5 min×3 次。用 Hoechst 33342 标记细胞核 15 min, 0.01 mol/L PBS 漂洗 2 min×2 次, 荧光显微镜下观察, 阴性对照以 PBS 代替一抗。

1.2.3.2 BrdU 免疫细胞化学鉴定

在培养 4 d 的 CPCs 培养液中加入 10 mol/L BrdU 孵育 24 h; 收集细胞, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液; 加入 10% FBS 的 DMEM/F12 培养液重悬细胞, 接种于多聚赖氨酸包被的盖玻片, 置于 5%CO₂ 培养箱 37℃培养 4 h, 吸去血清培养液, 用 0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min×2 次; 4%多聚甲醛固定 20 min, 用含 1% Triton X-100 的 0.1 mol/L PBS 洗涤 5 min×3 次; 1 mol/L HCl 冰上孵育 10 min, 再用含 1% Triton X-100 的 0.1 mol/L PBS 洗涤 5 min×3 次; 2 mol/L HCl 室温孵育 10 min, 0.1 mol/L 硼酸缓冲液室温作用 12 min, 再用含 1% Triton X-100 的 0.1 mol/L PBS 洗涤 5 min×3 次; 用含 5%FBS 的 0.1 mol/L PBS 37℃封闭 30 min; 一抗采用兔抗 BrdU 单抗(1:100), 4℃孵育过夜, 0.1 mol/L PBS 洗涤 5 min×3 次; 加入 cy3 标记的羊抗兔二抗(1:100), 37℃孵育 30 min, 0.1 mol/L PBS 洗涤 5 min×3 次; 荧光显微镜下观察。

1.2.4 CPCs 分化能力的鉴定

细胞培养液中加入 10%血清诱导分化, 将培养 4 d 的 CPCs 收集到离心管中, 1 000 r/min, 弃上清液, 加入 10% FBS 的 DMEM/F12 重悬细胞, 接种于多聚赖氨酸处理的盖玻片上, 5%CO₂ 培养箱 37℃培养 14 d。采用细胞免疫荧光法鉴定分化细胞, 一抗采用兔抗 myosin VII A 多抗(1:200), 二抗采用 cy3 标记的羊抗兔的二抗(1:100), 具体方法同 nestin/

BrdU 鉴定。

1.2.5 荧光定量 PCR 检测内耳发育相关基因 mRNA 表达水平

收集未分化 CPCs 和分化 7、14 d 的贴壁细胞, TRIzol 法分别提取总 RNA, 甲醛凝胶变性电泳验证总 RNA 完整性, 核酸蛋白分析仪测定浓度和纯度; 按 TaKaRa Prime Script RT Reagent Kit 试剂盒方案, 反转录合成 cDNA 第一链; 反转录产物 cDNA 用于荧光定量 PCR (qRT-PCR), 检测 CPCs 分化过程中内耳发育相关基因 (Sox2、Jagged1、CyclinA2) 的 mRNA 表达水平 (β -actin 作对照)。

qRT-PCR 反应体系 (20 μ l): 10 μ l 2 \times SYBR Green I Mix, 0.4/0.4 μ l Primer (F/R), 2 μ l cDNA, 7.2 μ l ddH₂O; 反应条件: 95 $^{\circ}$ C, 15 min; 95 $^{\circ}$ C, 15 s; 60 $^{\circ}$ C, 30 s; 72 $^{\circ}$ C, 30 s; 共 40 个循环; 引物如表 1 所示。

表 1 定量 PCR 引物

Table 1 Primers for qRT-PCR

基因名称	引物序列(5'~3')	退火温 度($^{\circ}$ C)	产物大 小(bp)
Sox2	F: ACCGTGATGCCGACTAGAAA	54.1	93
	R: GCGCCTAACGTACCACTAGAA		
Jagged1	F: CGCCCTCTGAAAAACAGAAC	56.7	68
	R: ACCCAAGCCACTGTTAAGACA		
CyclinA2	F: AGTGCCGCTGTCTCTTTACC	56.7	90
	R: CATAGCATGGGGTGATTCAA		
β -actin	F: AAAGACCTGTACGCCAACAC	56.7	219
	R: GTCATACTCCTGCTTGCTGAT		

2 结果

2.1 耳蜗组织的分离

解剖显微镜下分离新生大鼠的两侧颞骨, 剪去多余的组织后可见完整的耳蜗结构(图 1A)。剥除蜗壳, 剥离螺旋韧带、血管纹和蜗轴, 剩余耳蜗组织即为基底膜(图 1B)。

2.2 CPCs 的培养与增殖能力的鉴定

从 P1 新生大鼠的耳蜗中分离基底膜, 胰酶消化后制成单细胞悬液, 使用倒置显微镜观察原代培养的细胞, 发现在原代培养 1 d 后即可见成球状细胞, 随培养天数的增加可观察到细胞球体积增大, 细胞球内细胞增多, 细胞球大小不一, 球内细胞数量也不一致, 培养 5 d 时周边可见单个细胞。原代培养的细胞球内绝大部分细胞表现出 nestin 和 BrdU 阳性(图 2), 表明 CPCs 具有一定的自我增殖能力。

2.3 CPCs 分化能力的鉴定

CPCs 经诱导分化后, 由悬浮生长变成贴壁生

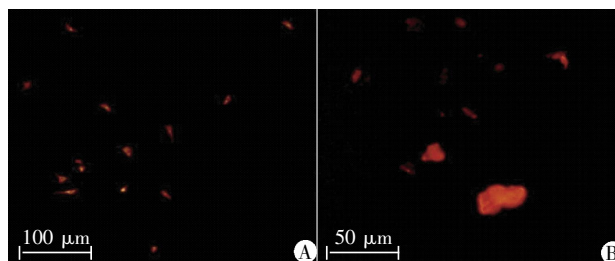
长。分化 14 d 后, 通过免疫细胞荧光染色分化细胞, 荧光显微镜下可以观测到部分细胞表达毛细胞标志物 myosin VII A(图 3), 表明 CPCs 可分化生成毛细胞样细胞。



A: 分离颞骨暴露出耳蜗(红圈内); B: 基底膜。

图 1 新生大鼠耳蜗组织的分离

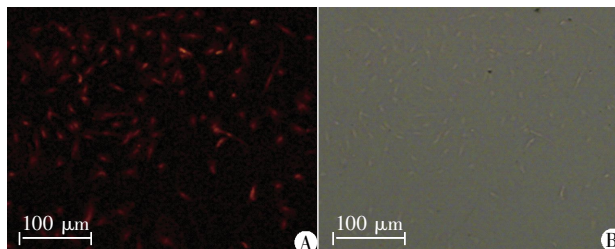
Figure 1 Separation of the cochlea from newborn rats



A: nestin; B: BrdU。

图 2 CPCs 的免疫细胞化学鉴定

Figure 2 Identification of CPCs via immunocytochemistry staining



A: 荧光视野; B: 自然光视野。

图 3 CPCs 分化毛细胞能力的免疫细胞化学鉴定(myosin VII A)

Figure 3 Identification of CPCs' potential to differentiate into hair cells via immunocytochemistry staining (myosin VII A)

2.4 内耳发育相关基因表达水平变化

荧光定量 PCR 检测内耳发育相关的 Sox2、Jagged1 和 CyclinA2 基因 mRNA 表达水平变化, 结果显示: 随着血清诱导分化时间的增加, Sox2 和 CyclinA2 的 mRNA 表达水平均降低, 分化 14 d 后, 检测不到这 2 个基因的 mRNA 表达; 而 Jagged1 的 mRNA 表达水平逐步升高(图 4)。

3 讨论

Malgrange 等^[4]于 2002 年从新生大鼠耳蜗内分

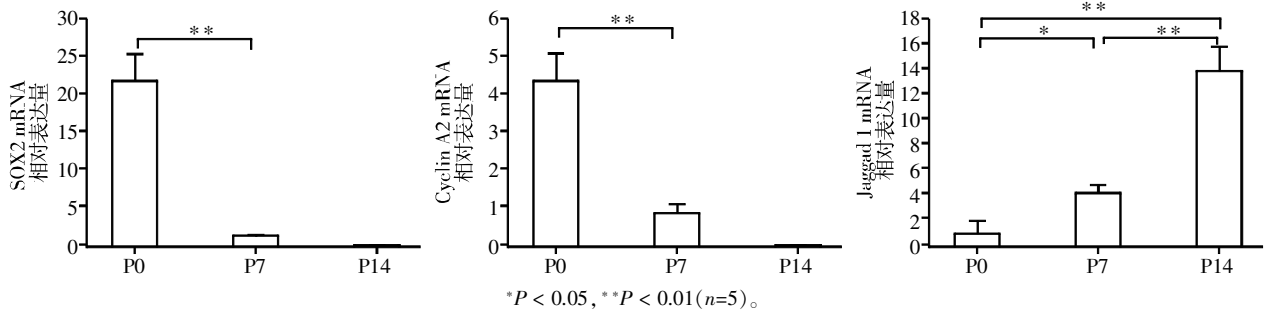


图 4 Sox2、CyclinA2、Jagged1 基因在 CPCs 分化过程中的表达

Figure 4 Expression of Sox2, CyclinA2, and Jagged1 during the CPCs' differentiation

离出一种具有增殖和多向分化潜能的细胞;Li 等^[5]在成年小鼠的内耳椭圆囊中分离培养出一种能够不断增殖和多向分化的细胞,其增殖能力可以维持 10 代以上,具备了干细胞自我更新增殖的能力;Lou 等^[6]从新生大鼠的耳蜗 Corti 器中也分离出此类细胞,这些细胞具有形成“细胞球”的能力,实验表明这类细胞也具有增殖能力和分化潜能。最早认为,这类具有增殖能力和多向分化能力的细胞为耳蜗来源的干细胞,但随着研究的进展,发现这类细胞的增殖能力及其可分化形成的细胞类型均是有限的^[7],相对于干细胞,更符合前体细胞的标准。

本研究也在新生大鼠的耳蜗组织分离出耳蜗前体细胞并成功实现了诱导分化。通过 BrdU 和 nestin 免疫荧光染色鉴定耳蜗前体细胞的增殖能力。BrdU 作为胸苷的替代物,可代替胸腺嘧啶在 DNA 的合成期(S 期),参与 DNA 的合成,后利用抗 BrdU 的单克隆抗体结合,通过 cy3 标记的二抗染色,荧光显微镜下观察增殖细胞,可判断细胞是否具有分裂能力。Nestin 是一种中间丝类型的蛋白,能够特异表达在神经干细胞上的一种分子标记物,在以往研究中发现耳蜗前体细胞也表达 nestin 且诱导分化后会表现出毛细胞样细胞^[6]。而 myosin VII A 基因为毛细胞标记物,故本研究采用 myosin VII A 免疫荧光染色来鉴定耳蜗前体细胞的分化能力。有研究表示,与其他来源的干细胞如基质干细胞、神经干细胞等相比较,耳蜗前体细胞向毛细胞和螺旋神经元细胞分化比例更高,更容易形成听觉毛细胞,是较好的治疗感音性耳聋的候选细胞。

除了将耳蜗前体细胞作为治疗感音性耳聋的候选细胞外,还可以把其作为研究耳蜗组织生长发育的体外模型。在新生鼠体内耳蜗组织的生长发育会伴随着耳蜗前体细胞的分化,通过该体外模型,可以研究耳蜗前体细胞分化的机制,有助于深入理解耳蜗组织的生长发育,进一步为以后修复受损的

毛细胞提供帮助。在本研究中,通过检测 Sox2、CyclinA2、Jagged1 这 3 个基因在耳蜗前体细胞分化过程中表达水平的变化,对这些基因在分化过程中的作用进行初步探讨。

以往研究表明,p27kip1、Rb1 及 Skp2 等细胞周期分子参与耳蜗发育中细胞的增殖、分化的过程^[8-10],本研究选择了其他参与耳蜗发育的细胞周期因子,试图进一步理解耳蜗发育的机制。细胞周期分子 CyclinA 包含同源性较高的 2 种分子:CyclinA1 和 CyclinA2^[11]。有研究表明,CyclinA1 主要参与减数分裂的调控^[12],而 CyclinA2 参与有丝分裂的调控,它具有调控细胞周期 G1/S 期和 G2/M 期转换的作用^[13]。CyclinA2 可与 CDK2 形成复合物,促使 G1 期向 S 期转换,启动 DNA 的合成;CyclinA2 又与 CDK1 形成复合物,促使 G2 期向 M 期转换,使细胞进入有丝分裂^[14]。在本研究中,细胞周期 CyclinA2 在耳蜗前体细胞的分化过程中,表达水平逐渐降低,推测 CyclinA2 参与了耳蜗前体细胞的分化和耳蜗组织的发育过程。转录因子 Sox2 是 Sox 基因家族的一员,具有正常功能的内耳来源于前体细胞的分化和增殖,以及分化后支持细胞与毛细胞的定向增殖,在这一过程中,Sox2 基因在时间上和空间上的严格表达与沉默具有关键的作用^[15-16],表达的紊乱将会引起内耳形态上和功能上的损伤,从而导致疾病的发生。Sox2 基因与感觉神经前体细胞的自我更新状态相关,是前体细胞的早期标志之一。有研究证实,Sox2 基因与毛细胞分化基因 Atoh1 之间的相互拮抗作用在形成毛细胞的过程中起着重要作用^[17]。本研究中,Sox2 基因表达水平随着分化的进行而降低,最终在分化 14 d 后缺失,提示 Sox2 基因也可能是毛细胞损伤后再生的关键元素。Dabdoub 等^[16]发现 Sox2 基因在前感觉区的表达受到 Notch 通路的调节,特别是该通路的一个特异性配体 Jagged1, Jagged1 的激活可以诱导 Sox2 基因的表达。

Jagged1 基因主要在耳蜗支持细胞中表达,在 Corti 器、内耳前后壶腹嵴、内耳支持细胞等感觉器官的维持以及定向分化过程中起着重要的作用,同时也可作为内耳支持细胞发育的一种可靠标记物。本研究中,Jagged1 基因的表达水平随着分化的进行而升高,表明耳蜗前体细胞分化过程中一部分分化为支持细胞。有研究发现,在经维甲酸处理的毛细胞损伤的区域内出现有支持细胞转化的毛细胞样细胞^[18]。

人类的内耳毛细胞是一种不可再生的细胞,从而由各种因素引起的毛细胞损伤都是不可逆的^[19],从而使感音性耳聋成为一个不可逆的过程,弥补受损的毛细胞是较好的治疗方法,本研究中对 CyclinA2、Sox2 和 Jagged1 基因的研究与检测,可能用于诱导耳蜗前体细胞的增殖与毛细胞的定向分化,有利于弥补受损的毛细胞,对于治疗各种原因引起毛细胞损伤导致的感音性耳聋提供了一些依据。

[参考文献]

- [1] Savary E, Hugnot JP, Chassigneux Y, et al. Distinct population of hair cell progenitors can be isolated from the postnatal mouse cochlea using side population analysis [J]. *Stem Cells*, 2007, 25(2): 332-339
- [2] Savary E, Sabourin JC, Santo J, et al. Cochlear stem/progenitor cells from a postnatal cochlea respond to Jagged1 and demonstrate that notch signaling promotes sphere formation and sensory potential [J]. *Mech Develop*, 2008, 125(8): 674-686
- [3] 汪红群, 王正敏, 沈云珍, 等. 新生大鼠耳蜗增殖细胞的培养鉴定及超微结构观察 [J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2007, 42(1): 42-47
- [4] Malgrange B, Belachew S, Thiry M, et al. Proliferative generation of mammalian auditory hair cells in culture [J]. *Mech Develop*, 2002, 112(1-2): 79-88
- [5] Li H, Liu H, Heller S. Pluripotent stem cells from the adult mouse inner ear [J]. *Nat Med*, 2003, 9(10): 1293-1299
- [6] Lou XX, Zhang Y, Yuan CG. Multipotent stem cells from the young rat inner ear [J]. *Neurosci Lett*, 2007, 416(1): 28-33
- [7] Zhong C, Han Y, Qiu J, et al. A comparison of the proliferative capacity and ultrastructure of proliferative cells from the cochleae of newborn rats of different ages [J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2010, 74(2): 192-197
- [8] Kanzaki S, Beyer LA, Swiderski DL, et al. p27Kip1 deficiency causes organ of Corti pathology and hearing loss [J]. *Hear Res*, 2006, 214(1-2): 28-36
- [9] Minoda R, Izumikawa M, Kawamoto K, et al. Manipulating cell cycle regulation in the mature cochlea [J]. *Hearing Res*, 2007, 232(1-2): 44-51
- [10] Sage C, Huang MQ, Karimi K, et al. Proliferation of functional hair cells in vivo in the absence of the retinoblastoma protein [J]. *Science*, 2005, 307(5712): 1114-1118
- [11] Ge RS, Hardy MP. Decreased CyclinA2 and increased cyclin G1 levels coincide with loss of proliferative capacity in rat Leydig cells during pubertal development [J]. *Endocrinology*, 1997, 138(9): 3719-3726
- [12] Ravnik SE, Wolgemuth DJ. The developmentally restricted pattern of expression in the male germ line of a murine CyclinA, CyclinA2, suggests roles in both mitotic and meiotic cell cycles [J]. *Dev Biol*, 1996, 173(1): 69-78
- [13] Yoshizumi M, Hsieh CM, Tsai JC, et al. Disappearance of CyclinA correlates with permanent withdrawal of cardiomyocytes from the cell cycle in human and rat hearts [J]. *J Clin Invest*, 1995, 95(5): 2275-2280
- [14] Pagano M, Pepperkok R, Verde F, et al. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle [J]. *Embo J*, 1992, 11(3): 961-971
- [15] Kelley MW. Hair cell development: Commitment through differentiation [J]. *Brain Res*, 2006, 1091(1): 172-185
- [16] Dabdoub A, Puligilla C, Jones JM, et al. Sox2 signaling in prosensory domain specification and subsequent hair cell differentiation in the developing cochlea [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(47): 18396-18401
- [17] Puligilla C, Dabdoub A, Cheah KS, et al. Sox2 as a prosensory and proneural gene in the developing mouse cochlea [J]. *Dev Biol*, 2008, 319(2): 535-535
- [18] Kiernan AE, Xu JX, Gridley T. The Notch ligand JAG1 is required for sensory progenitor development in the mammalian inner ear [J]. *PLoS Genet*, 2006, 2(1): 27-38
- [19] Edge AS, Chen ZY. Hair cell regeneration [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2008, 18(4): 377-382

[收稿日期] 2014-11-03