

## nNOS 磷酸化在大鼠神经病理性疼痛发病中的作用及其机制

何庆标<sup>1</sup>, 闵宇懿<sup>2</sup>, 张绍杰<sup>1</sup>, 莫力<sup>1</sup>, 王育明<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>武警广东省总队医院麻醉科, 广东 广州 510507; <sup>2</sup>南方医科大学南方医院儿科, 广东 广州 510515)

**[摘要]** 目的:探索神经结扎(spinal nerve ligation, SNL)模型大鼠脊髓内神经元型一氧化氮合酶(neuronal nitric oxide synthase, nNOS)的磷酸化是否对神经病理性疼痛具有调节作用,研究 nNOS 磷酸化在神经病理性疼痛中的作用机制。方法:选用雄性 SPF 级 SD 大鼠 60 只,随机分为 4 组。假手术组:只暴露脊神经,不结扎;实验组:制作 SNL 模型,鞘内注射钙依赖性蛋白激酶 II (phosphorylated calcium/calmodulin dependent kinase II, p-CaMK II)抑制剂 KN93;阴性对照组:制作 SNL 模型,鞘内注射 DMSO;模型组:制作 SNL 模型,不给药。于术前 1 d、术后 1~5 d 以及鞘内给药后 1~4 h 测定机械痛阈值。采用 Western blot 检测腰段脊髓组织 p-CaMK II、nNOS 与 p-nNOS 的表达水平,利用免疫共沉淀以及免疫荧光实验检测 nNOS 与其接头蛋白 CAPON 是否具有相互作用。结果:SNL 可导致大鼠机械疼痛阈值降低( $P < 0.01$ ),脊髓组织 p-CaMK II 的表达增加( $P < 0.05$ ),p-nNOS 的表达下降( $P < 0.05$ ),髓鞘内注射 KN93 可反转神经结扎所致的上述趋势;nNOS 与其接头蛋白 CAPON 在大鼠体内存在相互作用,nNOS 的磷酸化能降低其与 CAPON 的相互作用强度。结论:nNOS 的磷酸化参与了 SNL 诱导的神经病理性疼痛的维持,p-CaMK II 通过对 nNOS 的磷酸化,降低 nNOS 与其接头蛋白 CAPON 在体内的相互作用强度,针对 nNOS 的磷酸化信号途径的治疗可为神经病理性疼痛的治疗提供新的视野。

**[关键词]** nNOS; CAPON; 磷酸化; 神经病理性疼痛

**[中图分类号]** R614.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2016)03-302-05

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20160310

## The mechanism of nNOS phosphorylation in spinal cord of neuropathic pain in rat

He Qingbiao<sup>1</sup>, Min Yuyi<sup>2</sup>, Zhang Shaojie<sup>1</sup>, Mo Li<sup>1</sup>, Wang Yuming<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Department of Anesthesia, Guangdong Provincial Corps Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Guangzhou 510507; <sup>2</sup>Department of Pediatrics, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effect of phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) on regulation the neuropathic pain in spinal nerve ligation (SNL) model rats, and research the mechanism of nNOS phosphorylation in neuropathic pain. **Methods:** A total of 60 male SPF SD rats were randomly divided into 4 groups: the control group, only expose spinal nerve, not ligation; the experimental group, SNL model, KN93 (calcium/calmodulin dependent kinase II inhibitor) intrathecal injection; the negative control group, SNL model, DMSO intrathecal injection; the model group, SNL model, didn't receive any medicine. We determined mechanical pain threshold 1 day before operation, postoperative 1-5 days and 1-4 hours after sheath dosing. Western blot was performed to detect the expression level of calcium/calmodulin dependent kinase II (p-CaMK II), nNOS and p-nNOS in lumbar spinal cord tissue. CoIP and immunofluorescence experiments was performed to test whether there was an interaction between nNOS and CAPON. **Results:** SNL led to mechanical pain threshold of rats reduced ( $P < 0.01$ ), the expression of spinal cord tissue p-CaMK II increased ( $P < 0.05$ ), and the expression of p-nNOS decreased ( $P < 0.05$ ). KN93 intrathecal injection reversed the trend above. There was an interaction between nNOS and CAPON, and the phosphorylation of nNOS reduced the strength of interaction between nNOS and CAPON. **Conclusion:** The phosphorylation of nNOS is involved in neuropathic pain induced by SNL, and p-CaMK II make nNOS phosphorylation, reduced the strength of interaction between nNOS and CAPON. The nNOS signaling pathways can provide a new field of vision for neuropathy pain treatment.

**[Key words]** nNOS; CAPON; phosphorylation; neuropathic pain

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(03): 302-306]

神经病理性疼痛是神经系统损伤或系统功能障碍引起的慢性疼痛疾病, 是临床治疗的一大难题, 严重影响了人们的生活质量, 它由神经系统的损伤或神经系统炎症引起, 以痛阈过敏、异常痛觉和自发疼痛为特征<sup>[1]</sup>。目前, 其发病机制仍然不清, 但发病率逐步上升, 处理起来异常棘手。较多研究表明: 外周神经和中枢敏化在神经病理性疼痛的发生和维持中, 发挥了重要作用。外周神经和中枢神经敏化, 都与初级及次级感觉神经元和胶质细胞中与疼痛相关的因子及受体基因的转录与翻译水平的变化密切相关<sup>[2-3]</sup>。一氧化氮(nitric oxide, NO)是神经元细胞中新发现的一类神经递质, 它由一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)催化而形成。在神经系统工作过程中, 神经元型一氧化氮合酶(neuronal nitric oxide synthase, nNOS)是一氧化氮合成的关键作用酶。外周神经的损伤可致使脊髓背角神经元中的 nNOS 过量表达, 同时伴随有痛觉过敏甚至是痛觉失常<sup>[4]</sup>。大量研究表明, nNOS 可调节多种生理及病理过程, 诸如神经病理性疼痛及炎性疼痛。在外周神经系统与中枢神经系统中, nNOS 发挥了非常重要的作用。全身或只在鞘内注射非特异性 NOS 抑制剂或选择性 nNOS 抑制剂, 能使脊神经结扎(spinal nerve ligation, SNL)模型中的机械疼痛反应显著减轻; 而 nNOS 基因敲除 SD 大鼠却不能显示出神经损伤所导致的机械疼痛, 这些都说明 nNOS 参与了神经病理性疼痛<sup>[5-7]</sup>, 但机制还不清楚。为此本研究以 SD 大鼠构建 SNL 模型, 通过相关实验, 检测 nNOS 参与神经病理性疼痛的分子机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只, 体重 150~200 g。分笼饲养, 自由饮食, 隔日更换脚底垫料。室温 20~25℃, 湿度 50%~80%, 白天与黑夜各 12 h 循环照明。按照随机分组的原则, 每组 15 只, 分为 4 组。假手术组: 只暴露脊神经, 不结扎; 实验组: 制作 L<sub>5</sub> SNL 模型, 鞘内注射 KN93; 阴性对照组: 制作 SNL 模型, 鞘内注射 DMSO; 模型组: 制作 SNL 模型, 不给药。

磷酸化钙依赖性蛋白激酶 II (phosphorylated calcium/calmodulin dependent kinase II, p-CaMK II) 抑制剂 KN93 (Sigma 公司, 美国), 临用前溶于含 10% DMSO 的 0.9% 氯化钠溶液中; p-CaMK II、nNOS、p-nNOS、nNOS 接头蛋白 CAPON 一抗 (Abcam 公司, 美国); BCA 蛋白浓度检测试剂盒 (广州赛蕊斯生物

科技有限公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 建立 SNL 结扎模型

参照文献[7]的方式, 以 10 mg/kg 氯胺酮+100 mg/kg 甲苯噻嗪于腹腔注射麻醉 SD 大鼠, 皮肤消毒后, L<sub>5</sub>~S<sub>2</sub> 背部中间落刀, 分开脊柱两旁肌肉组织, 显露并剪断 L<sub>6</sub> 脊椎横突, 仔细分开并暴露脊椎横突下的 L<sub>4</sub>、L<sub>5</sub>、L<sub>6</sub> 脊神经, 在近脊中央处用 5-0 的尼龙线结扎 L<sub>5</sub> 脊神经, 在结扎远端处切断, 按顺序缝合切口即可。Sham 组只显露脊神经但不作结扎。

#### 1.2.2 鞘内给药

参照文献[8]的方式, 鞘内直接注射, 将 30G 的针头接在 10 μL 规格的微量注射器上, 经 L<sub>5</sub> 椎间隙穿刺注射, 注射体积为 5 μL, 注射后用 10 μL 0.9% 氯化钠溶液冲管, 避免药物残留在管内。在 SNL 手术后 5 d, 阴性对照组与实验组在疼痛阈值测定前 30 min 时, 鞘内分别注射含 10% DMSO 的生理盐水或 KN93 50 nmol 各 5 μL。回抽无脑脊液或注药过程未出现甩尾动作即为穿刺成功标志。

#### 1.2.3 痛阈的测定

各组大鼠于术前和术后 1~5 d, 参考文献[9]的方法测左足机械疼痛阈值, 将 SD 大鼠放置于金属笼内 30 min 后, 使用不同压力的 vonFrey 丝 (Stoelting 公司, 美国) 垂直刺激大鼠足掌面, 力度以 von-Frey 丝轻微弯曲为准, 持续 5 s 或直至出现缩足反应。如果出现缩足反应现象, 则记为阳性。采用 up-and-down 的方法计算 50% 缩足反应的疼痛阈值。

#### 1.2.4 Western blot 检测 SNL 结扎对 p-CaMKII、nNOS 与 p-nNOS 表达的影响

痛阈测定完成后, 断头处处死大鼠, 迅速取出腰段脊髓冻存于 -80℃ 备用。参考文献[10]用 Western blot 法检测实验各组大鼠脊髓组织 p-CaMK II、nNOS、p-nNOS 的表达。采用 Quantity One v4.4.0 软件对 p-CaMK II、nNOS、p-nNOS 所对应条带进行光密度分析。

#### 1.2.5 免疫共沉淀鉴定 nNOS 与 CAPON 之间的相互关系

参考文献[11]的方法, 采用 BCA 蛋白浓度检测试剂盒, 精确测量阴性对照组及实验组大鼠脊髓组织总蛋白浓度, 取等量阴性对照组与实验组总蛋白, 将蛋白预先结合固化在 agarose 的 beads 上, 先利用 nNOS 或 p-nNOS 抗体与 agarose-beads 共孵育, 当 nNOS 抗体或 p-nNOS 抗体从 agarose-beads 上洗脱下来后, 后期利用抗 CAPON 作为一抗进行

Western blot 检测。

### 1.2.6 免疫荧光验证 nNOS 与 CAPON 之间的相互关系

参照文献[11]检测大鼠脊髓组织内 nNOS 与其接头蛋白 CAPON 的相互作用,检测 nNOS 的二抗使用 PE 标记,检测 CAPON 的二抗使用 FITC 标记。

### 1.3 统计学方法

用 SPSS 19.0 软件进行数据处理分析,所有计量资料采用均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )进行表示,采用单因素方差分析进行组间比较, $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 疼痛阈值检测

各组 SD 大鼠痛阈的基础值差异无统计学意义;SNL 术后 1~5 d,相对于 Sham 组,实验组、模型组以及阴性对照组的机械痛阈明显降低( $P < 0.01$ );经给药处理后,模型组以及阴性对照组相对于给药前,差异不显著( $P > 0.05$ );但实验组的机械痛阈相对于给药前显著升高( $P < 0.01$ )。这表明 SNL 可导致 SD 大鼠机械疼痛阈值降低,KN93 能显著提高大鼠疼痛阈值(表 1)。

表 1 各组大鼠机械痛阈值的变化

| 组别           | 造模前后机械痛阈值  |            |            |            | 给药后机械痛阈值    |             |             |
|--------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|
|              | 术前 1 d     | 术后 1 d     | 术后 3 d     | 术后 5 d     | 1 h         | 2 h         | 4 h         |
| 模型组(n=11)    | 13.7 ± 0.6 | 7.5 ± 0.8* | 4.8 ± 0.4* | 2.5 ± 0.5* | 2.4 ± 0.1   | 2.5 ± 0.1   | 2.3 ± 0.2   |
| 阴性对照组(n=11)  | 13.2 ± 0.4 | 6.7 ± 0.5* | 4.5 ± 0.3* | 2.7 ± 0.5* | 2.5 ± 0.1   | 2.8 ± 0.2   | 3.0 ± 0.1   |
| 实验组(n=8)     | 13.4 ± 0.6 | 7.0 ± 0.4* | 3.7 ± 0.3* | 2.4 ± 0.5* | 55.4 ± 3.3# | 48.9 ± 2.3# | 47.0 ± 2.0# |
| Sham 组(n=15) | 12.7 ± 0.7 | 12.2 ± 0.4 | 12.1 ± 0.5 | 12.6 ± 0.7 | 12.7 ± 0.5  | 12.6 ± 0.5  | 12.7 ± 0.6  |

与 Sham 组相比,\* $P < 0.05$ ;给药后与术后 5 d 相比,# $P < 0.05$ 。

### 2.2 Western blot 检测 p-CaMK II、nNOS 与 p-nNOS 的表达

与 Sham 组比较,SNL 术后 5 d,模型组和阴性对照组大鼠腰段脊髓组织 p-CaMK II 的表达增加( $P < 0.05$ ),而 p-nNOS 的表达下降( $P < 0.05$ );实验组 p-CaMK II 表达与 Sham 组之间的差异无统计学意义。与模型组比较,实验组 p-CaMK II 的表达降低( $P < 0.05$ ),p-nNOS 的表达增加( $P < 0.05$ ),阴性对照组 p-CaMK II、p-nNOS 表达与模型组差异无统计学意义(图 1)。

### 2.3 免疫共沉淀检测 nNOS 与接头蛋白 CAPON 的相互作用

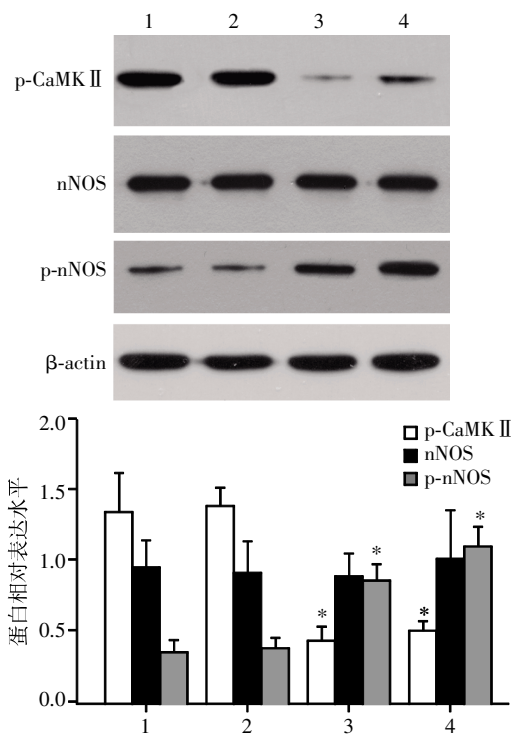
免疫共沉淀实验表明,脊髓组织中,不论是 nNOS 还是 p-nNOS,都与其接头蛋白 CAPON 在体内存在相互作用,但 nNOS 发生磷酸化后,与 CAPON 的相互作用强度明显减弱(图 2)。

### 2.4 免疫荧光验证 nNOS 与接头蛋白 CAPON 的相互作用

免疫荧光双重染色结合激光共聚焦显微镜观察实验表明,nNOS 磷酸化后,与 CAPON 的相互作用强度明显减弱(图 3)。

## 3 讨论

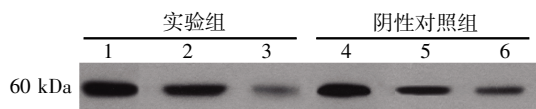
本研究选择适当的神经病理性疼痛动物模型



1:模型组;2:阴性对照组;3:实验组;4:Sham 组。与阴性对照组比较,\* $P < 0.05$ 。

图 1 p-CaMK II、nNOS 与 p-nNOS 的蛋白表达水平  
Figure 1 The protein expression of p-CaMK II, nNOS and p-nNOS

作为实验对象,阐述了 nNOS 磷酸化在病理性疼痛中的重要作用,即可通过调节 nNOS 磷酸化来

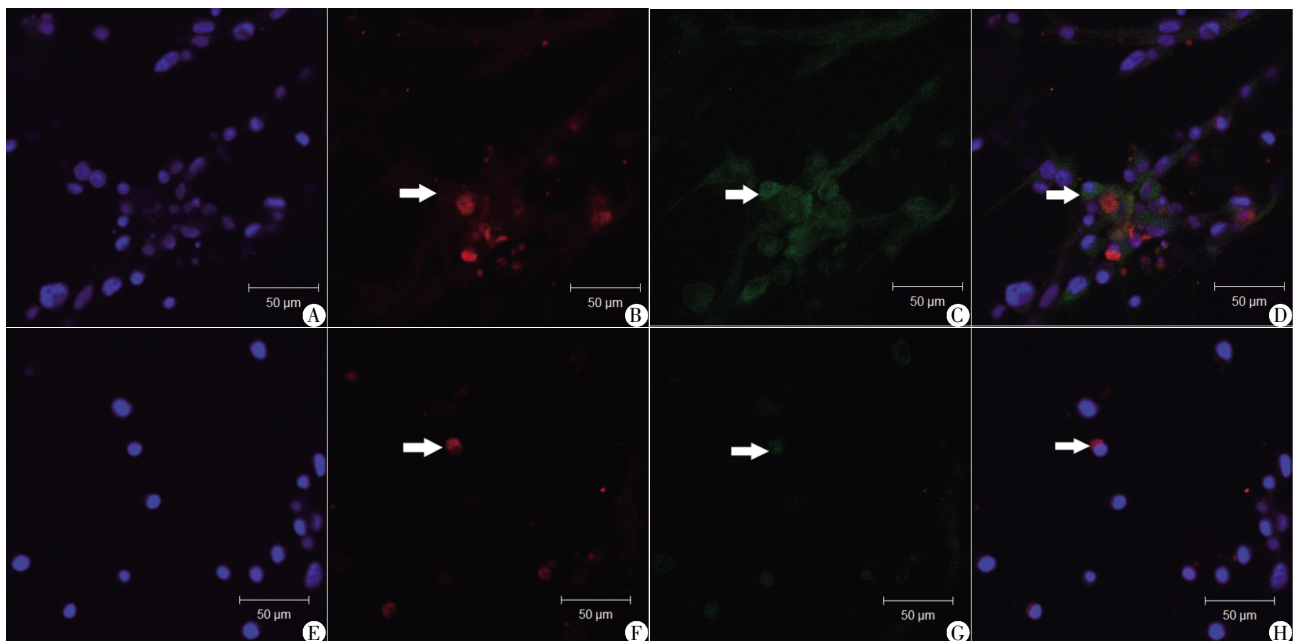


1: CAPON 抗体检测实验组正常提取蛋白样品; 2: CAPON 抗体检测实验组 anti-nNOS 免疫共沉淀蛋白样品; 3: CAPON 抗体检测实验组 anti-p-nNOS 免疫共沉淀蛋白样品; 4: CAPON 抗体检测阴性对照组正常提取蛋白样品; 5: CAPON 抗体检测阴性对照组 anti-nNOS 免疫共沉淀蛋白样品; 6: CAPON 抗体检测阴性对照组 anti-p-nNOS 免疫共沉淀蛋白样品。

图 2 脊髓组织蛋白免疫共沉淀条带

Figure 2 The result of rat spinal cord after CoIP

达到调节生理和病理过程, 根据脊髓中 nNOS 及 p-nNOS 两种一氧化氮合酶的表达及活性变化, 结合免疫共沉淀与免疫荧光实验结果, 初步研究了 nNOS 磷酸化对大鼠神经病理性疼痛的作用及可能机制, 通过一系列实验发现, CaMK II 通过磷酸化 nNOS, 降低了 nNOS 与其接头蛋白 CAPON 在体内的相互作用, 导致大鼠机械疼痛阈值的提高, 这表明 nNOS 在神经病理性疼痛中的多样性与复杂性。



A、E: DAPI 染色; B、F: PE 染色; C、G: FITC 染色; D、H: PE 与 FITC 染色叠加。箭头所指位置为 nNOS 与 CAPON 共表达位置。

图 3 脊髓组织免疫荧光双重染色结合激光共聚焦显微镜观察 nNOS 与 CAPON( $\times 400$ )

Figure 3 The protein of nNOS and CAPON in rat spinal cord detected with confocal laser scanning microscope( $\times 400$ )

神经病理性疼痛是一个异常复杂的过程, 大量相关研究表明其是由外周神经和中枢神经敏感化介导的<sup>[12-13]</sup>。神经损伤可导致多种致痛因子对外释放, 这类致痛因子除了能直接对外周伤害性感受器起到兴奋作用外, 还能通过局部微环境的改变, 间接地提高疼痛感受器的兴奋性, 从而降低兴奋阈值, 导致伤害性感受器的去极化, 产生传入冲动<sup>[14]</sup>。在出现神经病理性疼痛的人群中, 其脊髓组织内 p-CaMK II 明显增多<sup>[15]</sup>。

早期有研究发现, p-CaMK II 的特异性抑制剂 KN93, 能翻转由 SNL 诱导的慢性神经病理性疼痛趋势<sup>[16]</sup>, 但 KN93 逆转 SNL 诱导的慢性神经病理性疼痛机制尚不明确; 也有研究表明, nNOS 是通过与其接头蛋白 CAPON 的相互作用, 从而介导疼痛阈值下降<sup>[17]</sup>, 但是否因为 nNOS 的磷酸化而导致其与 CAPON 的相互作用强度减弱, 从而介导疼痛阈值

下降尚不得而知。本研究利用 Western blot 实验, 进一步证实了 KN93 的镇痛效应与其抑制大鼠脊髓组织 p-CaMK II 表达的作用相关, 即在疼痛情况下 CaMK II 被磷酸化生成了 p-CaMK II, 因而被激活, CaMK II 被激活后, 又能磷酸化其他未磷酸化的 CaMK II 分子, 启动级联反应放大了其作为激酶的活性。研究表明, 在低剂量抑制剂 KN93 的情况下, 仍然存在一定量的 CaMK II 激酶被激活, 正因为 p-CaMK II 具有自身磷酸化的机制, 因而这种效应被逐级放大, 因此虽然有使用抑制剂 KN93, 但因这种机制的存在而达不到预想的镇痛效果<sup>[18]</sup>; 这有可能是本研究免疫共沉淀实验中, 当以抗 nNOS 为目标抗体, 通过 Western blot 检测 CAPON 时, 尚能检测到 CAPON 的原因。本研究进一步证明了 p-CaMK II 的抑制剂 KN93 可以逆转已经发生的神经病理性疼痛, nNOS 被磷酸化后, 与其接头蛋白 CAPON 的相互作

用强度降低,从而导致疼痛阈值下降。总之,nNOS 的磷酸化对神经病理性疼痛的发病具有调节作用。

## [参考文献]

- [1] Van Hecke O, Austin SK, Khan RA, et al. Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies[J]. *Pain*, 2014, 155(4): 654-662
- [2] Schlereth T, Heiland A, Breimhorst M, et al. Association between pain, central sensitization and anxiety in post-therapeutic neuralgia[J]. *Eur J Pain*, 2015, 19(2): 193-201
- [3] Ringkamp M, Raja SN. A sore spot: central or peripheral generation of chronic neuropathic spontaneous pain? [J]. *Pain*, 2014, 155(7): 1189-1191
- [4] Mukherjee P, Cinelli MA, Kang S, et al. Development of nitric oxide synthase inhibitors for neurodegeneration and neuropathic pain[J]. *Chem Soc Rev*, 2014, 43(19): 6814-6838
- [5] Toni M, De Angelis F, Di Patti MC, et al. Nitric oxide synthase in the central nervous system and peripheral organs of stramonita haemastoma: protein distribution and gene expression in response to thermal stress[J]. *Mar Drugs*, 2015, 13(11): 6636-6664
- [6] Martucci C, Trovato AE, Costa B, et al. The purinergic antagonist PPADS reduces pain related behaviours and interleukin-1 beta, interleukin-6, iNOS and nNOS overproduction in central and peripheral nervous system after peripheral neuropathy in mice[J]. *Pain*, 2008, 137(1): 81-95
- [7] 鹿连明, 秦梅玲, 王萍, 等. 利用免疫共沉淀技术研究 RSV CP, SP 和 NSvc4 蛋白的互作[J]. *农业生物技术学报*, 2008, 16(5): 891-897
- [8] 王芬, 谢滔, 江姿潞, 等. 鞘内注射重组大鼠脂质运载蛋白-2 对大鼠吗啡镇痛效能的影响[J]. *临床麻醉学杂志*, 2015, 09(9): 896-900
- [9] 朱鸣镝, 钱丽玲, 朱俐, 等. IP-10 和 JNK 介导 CFA 诱导的大鼠足底炎性疼痛[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2009, 12(12): 1698-1702
- [10] 路菊, 孙玮, 陈德英. 免疫荧光双重染色的激光共聚焦显微镜样品制备及观察[J]. *免疫学杂志*, 2007, 03(3): 344-345, 350
- [11] 陈锦鹏, 王志伟, 陆玉华, 等. 细胞免疫荧光检测人胰腺癌干细胞 Oct4、Nanog 基因的表达[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2013, 11(11): 1524-1528
- [12] Smart KM, Blake C, Staines A, et al. Self-reported pain severity, quality of life, disability, anxiety and depression in patients classified with 'nociceptive', 'peripheral neuropathic' and 'central sensitisation' pain. The discriminant validity of mechanisms-based classifications of low back ( $\pm$ leg) pain[J]. *Man Ther*, 2012, 17(2): 119-125
- [13] Nickel FT, Seifert F, Lanz S, et al. Mechanisms of neuropathic pain [J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2012, 22(2): 81-91
- [14] Jaggi AS, Singh N. Role of different brain areas in peripheral nerve injury-induced neuropathic pain[J]. *Brain Res*, 2011, 1381: 187-201
- [15] Chen Y, Luo F, Yang C, et al. Acute inhibition of  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II reverses experimental neuropathic pain in mice[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009, 330(2): 650-659
- [16] Chen M, Cheng C, Yan M, et al. Involvement of CAPON and nitric oxide synthases in rat muscle regeneration after peripheral nerve injury[J]. *J Mol Neurosci*, 2008, 34(1): 89-100

[收稿日期] 2015-10-22

(上接第 297 页)

- ing insights in therapeutic shRNA processing and siRNA target cleavage precision[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2014, 3(5): e145
- [17] Valencia-Serna J, Gul-Uludag H, Mahdipoor PA, et al. Investigating siRNA delivery to chronic myeloid leukemia K562 cells with lipophilic polymers for therapeutic BCR-ABL down-regulation [J]. *J Control Release*, 2013, 172(2): 495-503
- [18] Koldehoff M. Targeting bcr-abl transcripts with siRNAs in an imatinib-resistant chronic myeloid leukemia patient: challenges and future directions[J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1218(32): 277-292
- [19] Mian A, Rafiei A, Oancea C, et al. The functional interplay between the t(9;22)-associated fusion proteins BCR/ABL and ABL/BCR in Philadelphia chromosome positive acute lymphatic leukemia [J]. *PLoS Genet*, 2014, 124(21): e1005144
- [20] Engelhardt M, Kumar R, Albanell J, et al. Telomerase regulation, cell cycle, and telomere stability in primitive hematopoietic cells[J]. *Blood*, 1997, 90(1): 182-193
- [21] Kuo YH, Bhatia R. Pushing the limits: defeating leukemia stem cells by depleting telomerase[J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(6): 673-675
- [22] Salilew-Wondim D, Hoelker M, Rings FA, et al. Depletion of BIRC6 leads to retarded bovine early embryonic development and blastocyst formation *in vitro* [J]. *Reprod Fertil Dev*, 2010, 22(3): 564-579

[收稿日期] 2015-11-18