

· 基础研究 ·

大鼠神经元型一氧化氮合酶基因慢病毒载体的构建及功能测定

朱贤慧,张 蕾,杜紫薇,徐 楚,孙 楠,周亚萍,张 宇*,周其冈*

南京医科大学药学院,江苏 南京 211166

[摘要] 目的:构建编码大鼠神经元型一氧化氮合酶(neuronal nitric oxide synthase, nNOS)全长基因的慢病毒载体,并检测其表达效率和催化活性功能。方法:采用RT-PCR提取nNOS的cDNA,同时改造真核表达载体pCDH-GFP。鉴定nNOS的cDNA碱基序列正确后,将目的基因克隆入慢病毒载体pCDH-GFP,得重组载体pCDH-GFP/nNOS,采用Lipofectamine 2000将其及慢病毒包装辅助质粒转染293T细胞,超速离心纯化后,感染神经干细胞和海马齿状回神经元进行感染能力鉴定,并检测nNOS蛋白表达和催化功能。结果:成功构建编码nNOS全长cDNA,测序证明重组慢病毒载体pCDH-GFP/nNOS构建成功。包装慢病毒颗粒LV-nNOS-GFP可以感染离体神经干细胞和在体神经元。Western blot检测证明nNOS蛋白成功表达。一氧化氮浓度检测表明表达的nNOS具有催化活性。结论:慢病毒载体LV-nNOS-GFP构建成功,可以表达功能性全长nNOS蛋白。

[关键词] 神经元型一氧化氮合酶;慢病毒;神经干细胞;一氧化氮

[中图分类号] Q78

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)06-841-05

doi:10.7655/NYDXBNS20190610

Construction of lentiviral vector carrying neuronal nitric oxide synthase and detection of the function

Zhu Xianhui, Zhang Lei, Du Ziwei, Xu Chu, Sun Nan, Zhou Yaping, Zhang Yu*, Zhou Qigang*

School of Pharmacy, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to construct the lentiviral vector carrying the cDNA encoding neuronal nitric oxide synthase (nNOS) of rat and to detect its expression and catalytic function. **Methods:** The cDNA of nNOS was extracted by RT-PCR followed by eukaryotic expression vector of CDH-GFP for cloning. After confirming the cDNA of nNOS by sequencing, cDNA of nNOS was cloned into the lentiviral vector pCDH-GFP for constructing recombinant vector pCDH-GFP/nNOS. The plasmid pCDH-GFP/nNOS was then transfected into 293T cells in the presence of helper plasmids by Lipofectamine 2000 mediation for packing lentiviral particles LV-nNOS-GFP. The cultured neuronal stem cells (NSCs) were used to verify whether LV-nNOS-GFP can infect NSCs by co-incubation with LV-nNOS-GFP. Afterwards, LV-nNOS-GFP was injected into the dentate gyrus (DG) of the hippocampus to measure the expression of nNOS and the generation of nitric oxide (NO). **Results:** The full length cDNA of nNOS could be successfully amplified and constructed into the recombinant lentiviral vector pCDH-GFP/nNOS. The packaged LV-nNOS-GFP successfully infected cultured NSCs and neurons in the hippocampal DG. The expressed nNOS was catalytic effective in catalyzing NO generation. **Conclusion:** The lentiviral vector of LV-nNOS-GFP was constructed successfully with functional nNOS expression after infection.

[Key words] neuronal nitric oxide synthase; lentivirus; neuronal stem cells; NO

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(06): 841-845, 861]

神经源性一氧化氮合酶(neuronal nitric oxide

synthase, nNOS)是一氧化氮合酶的一种亚型,主要存在于神经元中^[1]。另外2种亚型是内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)和诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)。eNOS主要在血管内皮细胞中表达,而iNOS主要是在损伤后诱导表达^[2-3]。nNOS是一种催化

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81871065);江苏省自然科学基金(BK20140905)

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

酶,主要催化生成一氧化氮(nitric oxide, NO)。NO是一种气体神经递质或神经调节物质,是在一氧化氮合酶的参与下由L-精氨酸合成产生。NO作为一种信号分子几乎完全由一氧化氮合酶家族通过生物学方法合成,由包括氧气和其他辅酶分子比如NADPH、黄素、四氢生物蝶呤在内的两步反应完成^[4]。大量研究表明大脑中nNOS与脑卒中、抑郁症、恐惧记忆、癫痫等多种疾病有密切关联^[5]。

目前研究nNOS的功能主要基于其化学抑制剂、RNA干扰、基因敲除小鼠等方法,尚没有过表达完整功能性nNOS的病毒工具^[6]。编码nNOS的基因全长达4 389 bp,PCR时极易导致碱基错配,因而克隆技术难以将其正确完整片段准确构建到病毒质粒载体中^[7]。本研究通过高通量筛选方法,测序得到正确编码nNOS全长cDNA,并且成功构建到慢病毒载体中,包装得到高滴度LV-nNOS-GFP。LV-nNOS-GFP病毒能够高效感染神经干细胞(neuronal stem cells, NSCs)和在体神经元,并且过表达nNOS具有催化生成NO的功能。本工作为研究nNOS在相关疾病中的功能提供了一种新的工具。

1 材料和方法

1.1 材料

清洁级C57BL/6小鼠(7~8周,22~25 g)以及出生后1 d的幼年大鼠(南京大学实验动物中心)。293T细胞和神经干细胞(上海细胞库)。DMEM/F12、神经基础培养基、B27(Gibco公司,美国);TRIzol、脂质体转染试剂盒 Lipofectamine 2000(Invitrogen公司,美国);2×PCR MasterMix、DNA Marker(北京天根生化科技有限公司);*Xba* I和*Not* I限制性内切酶、DNA胶回收试剂盒、小鼠抗Flag-Tag单克隆抗体、质粒pHelper1.0(VSVG元件)载体、质粒pHelper2.0(RSV元件)载体、质粒pHelper3.0(MDL元件)(上海生工生物工程有限公司);BeyoFusion™ Plus DNA Polymerase、T4连接酶(上海碧云天生物技术有限公司);pCDH-GFP载体(上海吉凯基因化学技术有限公司);兔抗nNOS多克隆抗体(Thermo Fisher公司,美国);小鼠抗GAPDH单克隆抗体(上海康成公司);羊抗兔IgG抗体、羊抗小鼠IgG抗体(上海联科公司);其他试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 慢病毒载体pCDH-GFP/nNOS的构建

提取幼年大鼠海马的齿状回(dentate gyrus, DG)组织,采用TRIzol法提取总RNA并逆转成cDNA

作为模板。根据GenBank中大鼠nNOS基因序列设计引物,通过两步PCR法在nNOS基因序列的N端引入flag标签。第一步PCR上游引物为:5'-GATGACGACGATGAAGAGAACA-3',下游引物为:5'-ATAGTTTAGCGGCCGCTTAGGAGCTGAAAACC-3',C端引入*Not* I酶切位点,PCR产物长度为4 420 bp,反应条件如下:95℃预变性5 min;94℃30 s,60℃6 min,72℃1 min,循环30次;72℃延伸10 min。第二步PCR采用第一步PCR产物为模板,上游引物为:5'-TGCTCTAGAGCCACCATGGATTACAAGGATGACGACGAT-3',下游引物为:5'-ATAGTTTAGCGGCCGCTTAGGAGCTGAAAACC-3',N端引入*Xba* I酶切位点和flag标签,PCR产物长度为4 453 bp,反应条件如下:95℃预变性5 min;94℃30 s,56℃6 min,72℃1 min,循环30次;72℃延伸10 min。PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳,紫外切胶仪下切胶回收4 453 bp处凝胶块,DNA胶回收试剂盒回收核酸产物。慢病毒载体pCDH与目的基因用*Xba* I、*Not* I限制性核酸内切酶双酶切,1%琼脂糖凝胶电泳,切胶回收目的片段。用T4连接酶将慢病毒载体pCDH与目的基因连接,酶连产物转化至StBl3感受态中,涂氨苄抗性平板,挑取数个菌落,继续摇菌培养,采用菌体PCR方式筛选阳性克隆,送去测序鉴定。测序正确的阳性克隆命名为pCDH-GFP-flag-nNOS/StBl3。

1.2.2 慢病毒载体LV-nNOS-GFP的包装和滴度测定

将慢病毒颗粒的重组病毒质粒(LV-nNOS-GFP质粒)和质粒pHelper1.0(VSVG元件)载体、质粒pHelper2.0(RSV元件)载体、质粒pHelper3.0(MDL元件)载体这3种辅助包装元件载体质粒分别进行摇菌扩增抽提,用阳离子脂质体Lipofectamine 2000共转染293T细胞,转染后8 h更换为完全培养基,培养48 h后,收集富含慢病毒颗粒的细胞上清液,对其浓缩后得到高滴度的慢病毒浓缩液,在293T细胞中采用逐孔稀释法测定并标定病毒滴度。

1.2.3 nNOS表达检测

从共转染的293T细胞中提取蛋白样品。蛋白上样量为20 μg。采用Western blot的方法进行检测,分别检测nNOS分子和flag分子。

1.2.4 慢病毒感染神经干细胞和293T细胞

培养293T细胞和神经干细胞。293T细胞培养至60%,加病毒浓缩液LV-nNOS-GFP感染,4 d后显微镜下观察荧光,并拍照。原代神经干细胞培养接种时以LV-nNOS-GFP感染,培养4 d后观察荧光表达和增殖情况。

1.2.5 立体定位注射

将小鼠麻醉后固定于立体定位手术台,以前囟为参照点,定位海马DG的位置(前后-0.28 mm,左右 ± 0.25 mm,上下-0.29 mm),进针后缓慢注射浓缩病毒,留置5 min后拔针,小鼠缝合后返回原笼饲养。

1.2.6 LV-nNOS-GFP过表达验证

在小鼠的海马DG区注射LV-CON病毒和浓缩包装的LV-nNOS-GFP病毒,7 d后提取小鼠DG区脑组织,一抗兔抗nNOS(1:1 000稀释),二抗羊抗兔IgG(1:2 000稀释),检测LV-nNOS-GFP能否使nNOS过表达。

1.3 统计学方法

应用Stata11.0统计软件,所有数据均用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$),采用 t 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 慢病毒载体pCDH-GFP/nNOS的PCR鉴定和测序

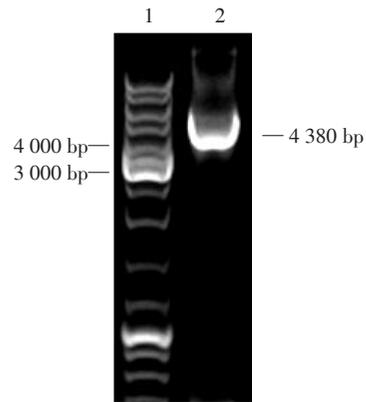
从幼年大鼠DG区组织通过逆转录方式获得全长nNOS片段(图1),再通过PCR方式在nNOS N端插入flag标签和Xba I酶切位点,在C端插入Not I酶切位点(图2),PCR产物经酶切与慢病毒载体pCDH-GFP相连,转化感受态StB13,挑取6个克隆,随机编号为1~6,继续摇菌培养,采用菌体PCR方式鉴定出阳性克隆为2号、3号和6号(图3),测序结果(图4)表明重组质粒中flag-nNOS的DNA序列与GenBank中检索到的序列一致,且读框正确,flag序列亦正确插入到nNOS序列的N端,从而证实了慢病毒载体pCDH-GFP/nNOS的成功构建。

2.2 重组质粒pCDH-GFP/nNOS转染293T细胞后的荧光检测

目的基因nNOS融合GFP共同表达。pCDH-GFP/nNOS和辅助质粒共同转染293T细胞,转染后48 h可见明显的荧光表达,转染效率高,荧光强度高(图5)。

2.3 Western blot检测pCDH-GFP/nNOS的表达

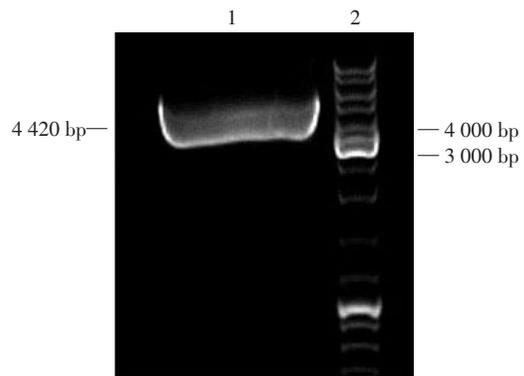
pCDH-GFP/nNOS和辅助质粒共同转染293T细胞,48 h后提取细胞蛋白质运用抗nNOS和抗FLAG一抗进行Western blot检测。由于该载体含有编码flag的序列,所以可以用flag来反映目的蛋白的表达情况。结果显示control组(无转染组)和空载体组无条带,pCDH-GFP/nNOS转染组可以观察到170 kDa附近有特征条带,其大小和目的基因融合蛋白相吻合(图6)。阳性参照(Positive)显示flag位



1:DNA Marker;2:nNOS。

图1 RT-PCR扩增产物的电泳结果

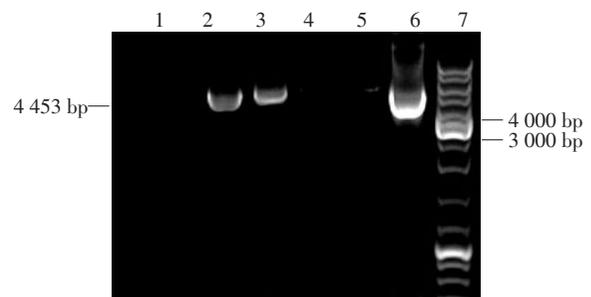
Figure 1 Electrophoretic result of RT-PCR amplification product



1:nNOS;2:DNA Marker。

图2 第一步PCR产物

Figure 2 Product of first PCR



1~6:1~6号克隆PCR结果;7:DNA Marker;2、3、6泳道为阳性克隆。

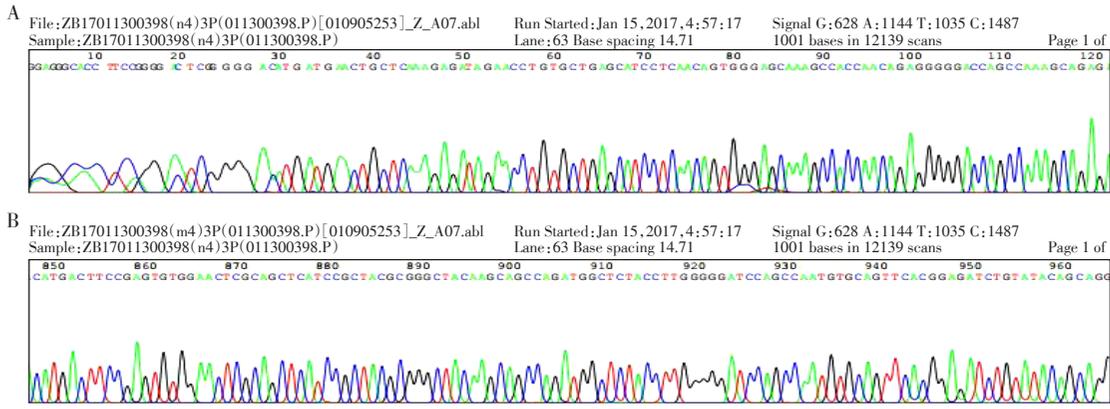
图3 Flag-nNOS的PCR鉴定

Figure 3 PCR analysis of Flag-nNOS

置。总之,该质粒用flag抗体检测到目的条带,虽然有少许杂带,但是过表达目的蛋白显著。

2.4 病毒滴度测定结果

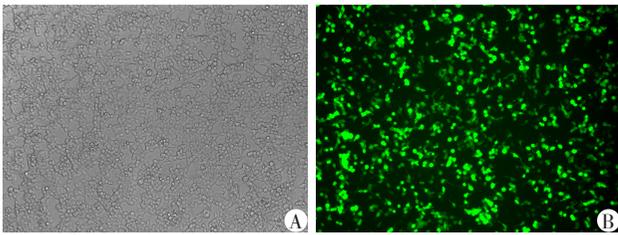
包装慢病毒颗粒,命名为LV-nNOS-GFP。采用逐孔稀释法测定滴度。在荧光显微镜下观察到带有荧光的细胞,得到所包装的慢病毒滴度:LV-nNOS-GFP: 2.8×10^8 pfu/mL。用浓缩的LV-nNOS-GFP感染



A:前半部分测序结果(部分);B:后半部分测序结果(部分)。

图4 LV-nNOS-GFP的测序分析

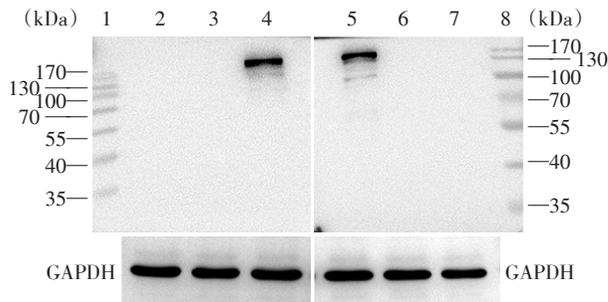
Figure 4 Results of sequencing of LV-nNOS-GFP



A:明视野;B:荧光视野。

图5 荧光检测Flag-nNOS转染293T细胞(×100)

Figure 5 Fluorescence analysis of Flag-nNOS in 293T cells (×100)



1、8: Marker; 2、7: 无转染组 293T; 3、6: 空载体组; 4、5: pCDH-GFP/nNOS转染组。

图6 Western blot检测pCDH-GFP/nNOS表达

Figure 6 Western blot analysis of pCDH-GFP/nNOS expression

293T细胞,验证病毒的感染效率(图7)。

2.5 感染神经干细胞和成年小鼠海马后的荧光检测

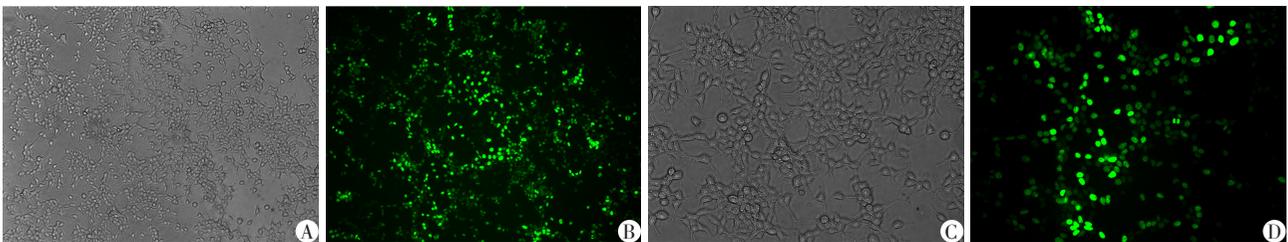
用LV-nNOS-GFP感染具有增殖能力的NSC,3 d后在荧光显微镜下观察,病毒载体感染NSC效果良好。将病毒载体立体定位注射到小鼠海马DG,7 d后灌注切片观察,病毒载体感染小鼠海马DG细胞良好(图8),这些结果表明LV-nNOS-GFP具有较好的应用效果。

2.6 LV-nNOS-GFP感染后nNOS蛋白表达的变化和检测

分别给小鼠海马DG区注射LV-CON病毒和LV-nNOS-GFP病毒,7 d后提取小鼠的DG区组织进行蛋白样本检测,注射LV-nNOS-GFP病毒的小鼠nNOS蛋白表达量明显高于注射LV-CON病毒的小鼠,同时,注射LV-nNOS-GFP病毒的小鼠flag表达正常,LV-nNOS-GFP病毒表达没有丢失(图9)。

2.7 LV-nNOS-GFP感染后NO含量的变化

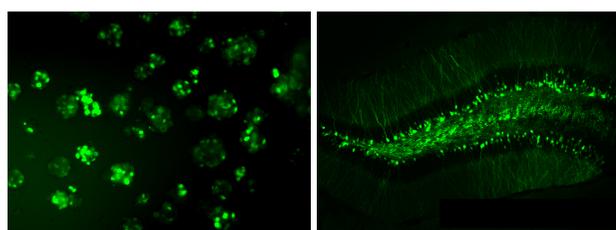
分别给小鼠海马DG区注射LV-CON病毒和LV-nNOS-GFP病毒,2个月后提取小鼠的DG区组织进行NO含量检测,注射LV-nNOS-GFP病毒的小鼠NO含量明显高于注射LV-CON病毒的小鼠(图10)。



A、B: 低倍镜观察(×100);C、D: 高倍镜观察(×200);A、C: 明视野;B、D: 荧光视野。

图7 荧光检测LV-nNOS-GFP感染293T细胞

Figure 7 Fluorescence analysis of LV-nNOS-GFP in 293T cells



A:感染神经干细胞($\times 200$); B:感染小鼠海马DG区细胞($\times 100$)。

图8 荧光检测LV-nNOS-GFP感染神经细胞

Figure 8 Fluorescence analysis of LV-nNOS-GFP in nerve cells

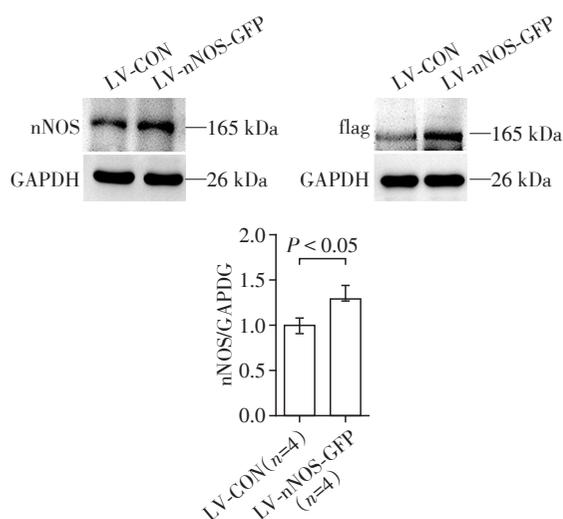


图9 nNOS蛋白表达检测

Figure 9 Detection of protein expression of nNOS

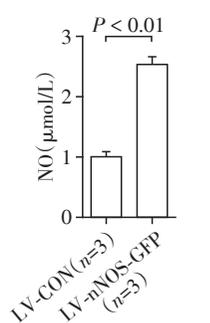


图10 NO含量检测

Figure 10 Detection of concentration of NO

3 讨论

nNOS作为一种十分重要的可以催化生成NO的合酶广泛分布于皮层、纹状体、海马等多个脑区。nNOS参与了多种疾病的发病机制,特别是介导了应激诱导的抑郁病理,可作为研发新型抗抑郁药物的重要靶点^[8];不饱和脂肪酸二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)通过增加nNOS丝氨酸

852位点磷酸化可以有效发挥缓解帕金森综合征的作用^[9];nNOS参与了戊四氮(pentylentetrazol, PTZ)诱导的癫痫模型信号通路的调控,有望成为慢性癫痫患者精神病学并发症靶向干预的潜在治疗靶点^[10]。nNOS作为针对多种疾病治疗的潜在药物靶点,对于缓解病情改善人们的生活质量有着十分重要的意义。

本研究构建的大鼠nNOS慢病毒载体同样适用于小鼠,采用RT-PCR的方法,从大鼠或小鼠的海马区均可提取出与预期长度相符的特异性产物^[11-12]。由于nNOS基因有较高的保守型,基因比对发现大鼠和小鼠的nNOS基因序列具有高度一致性,因此该病毒在小鼠体内也可以表达并且具有催化功能^[13]。

在今后研究当中,海马区域的nNOS与Pilocarpine诱导的癫痫模型密切相关,nNOS在该模型中所发挥的具体作用和机制仍有待研究^[14]。基于我们已得到的部分结论,被诱导癫痫的小鼠其nNOS的表达水平降低,产物NO的量也降低。因此,能否通过过表达nNOS来减轻或者逆转癫痫诱导产生的惊厥抽搐症状有着重要意义,基于此我们构建了可以使得nNOS过表达的病毒LV-nNOS-GFP。在包装该病毒的早期使用了病毒浓缩液进行浓缩,但效果并不稳定,后期改为超速离心法浓缩病毒后效果稳定,且细胞和小鼠的感染效率均较高。

本研究显示,LV-nNOS-GFP病毒确实发挥了使nNOS过表达的作用,该结果提示LV-nNOS-GFP可以作为基因治疗的载体发挥nNOS过表达的治疗作用,因此我们将构建人源的慢病毒载体并研究其在临床中的应用价值。

[参考文献]

- [1] Lai Y, Thomas GD, Yue Y, et al. Dystrophins carrying spectrin-like repeats 16 and 17 anchor nNOS to the sarcolemma and enhance exercise performance in a mouse model of muscular dystrophy[J]. J Clin Invest, 2009, 119(3):624-635
- [2] Zhu Y, Jiang H, Chen Z, et al. The genetic association between iNOS and eNOS polymorphisms and gastric cancer risk: a meta-analysis[J]. Onco Targets Ther, 2018, 11: 2497-2507
- [3] Cunha JPD, Neto FSL, Novais PC, et al. Expression profiles of eNOS, iNOS and microRNA-27b in the corpus cavernosum of rats submitted to chronic alcoholism and Diabetes mellitus[J]. Acta Cirurgica Brasileira, 2017, 32(1):38-45

(下转第861页)

- (8):521-528
- [2] Ming Z, Zeping H, Xiaolei S, et al. MAVS, cGAS, and endogenous retroviruses in T-independent B cell responses [J]. *Science*, 2014, 346(6216): 1486-1492
- [3] Cai X, Chiu YH, Chen ZJMC. The cGAS-cGAMP-STING pathway of cytosolic DNA sensing and signaling [J]. *Mol Cell*, 2014, 54(2): 289-296
- [4] Aguirre S, Fernandez-Sesma AJJoV. Collateral damage during dengue virus infection: making sense of DNA by cGAS [J]. *J Virol*, 2017, 91(14): e01081-1016
- [5] Ruangkiattikul N, Nerlich A, Abdissa K, et al. cGAS-STING-TBK1-IRF3/7 induced interferon- β contributes to the clearing of non tuberculous mycobacterial infection in mice [J]. *Virulence*, 2017, 8(7): 1303-1315
- [6] Juven-Gershon T, Hsu JY, Theisen JW, et al. The RNA polymerase II core promoter- the gateway to transcription [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2008, 20(3): 253-259
- [7] Tong S, Yang G, Wen T, et al. A six-nucleotide insertion-deletion polymorphism in the CASP8 promoter is associated with susceptibility to multiple cancers [J]. *Nat Genet*, 2007, 39(5): 605-613
- [8] 徐妍妍,王艳艳,徐华国,等. 小鼠STING基因启动子的克隆鉴定及功能初步分析[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2016, 36(7): 783-787
- [9] Bakhoun SF, Ngo B, Laughney AM, et al. Chromosomal instability drives metastasis through a cytosolic DNA response [J]. *Nature*, 2018, 553(7689): 467-472
- [10] Harding SM, Benci JL, Irianto J, et al. Mitotic progression following DNA damage enables pattern recognition within micronuclei [J]. *Nature*, 2017, 548(7668): 466-470
- [11] Mackenzie KJ, Carroll P, Martin CA, et al. cGAS surveillance of micronuclei links genome instability to innate immunity [J]. *Nature*, 2017, 548(7668): 461-465
- [12] Lijun S, Jiayi W, Fenghe D, et al. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway [J]. *Science*, 2013, 339(6121): 786-791
- [13] Zhou W, Whiteley AT, Cc DOM, et al. Structure of the human cGAS-DNA complex reveals enhanced control of immune surveillance [J]. *Cell*, 2018, 174(2): 300-311
- [14] Liu H, Zhang H, Wu X, et al. Nuclear cGAS suppresses DNA repair and promotes tumorigenesis [J]. *Nature*, 2018, 563(7729): 131-136
- [收稿日期] 2019-01-13

(上接第845页)

- [4] Li ZS, Young HM, Furness JB. Nitric oxide synthase in neurons of the gastrointestinal tract of an avian species, *Coturnix coturnix* [J]. *J Anat*, 1994, 184(Pt 2): 261-272
- [5] Florio SK, Loh C, Huang SM, et al. Disruption of nNOS-PSD95 protein-protein interaction inhibits acute thermal hyperalgesia and chronic mechanical allodynia in rodents [J]. *Br J Pharmacol*, 2010, 158(2): 494-506
- [6] Zhou QG, Zhou L, Chen C, et al. Hippocampal neuronal nitric oxide synthase mediates the stress-related depressive behaviors of glucocorticoids by down-regulating glucocorticoid receptor [J]. *J Neurosci*, 2011, 31(21): 7579-7590
- [7] Bonthius DJ Jr, Winters Z, Karacay B, et al. Importance of genetics in fetal alcohol effects: Null mutation of the nNOS gene worsens alcohol-induced cerebellar neuronal losses and behavioral deficits [J]. *Neurotoxicology*, 2015, 46: 60-72
- [8] Tillmann S, Pereira VS, Liebenberg N, et al. ZL006, a small molecule inhibitor of PSD-95/nNOS interaction, does not induce antidepressant-like effects in two genetically predisposed rat models of depression and control animals [J]. *PLoS One*, 2017, 12(8): e0182698
- [9] Parlak H, Ozkan A, Dilmac S, et al. Neuronal nitric oxide synthase phosphorylation induced by docosahexaenoic acid protects dopaminergic neurons in an experimental model of Parkinson's disease [J]. *Folia Histochem Cytobiol*, 2018, 56(1): 27-37
- [10] Zhu X, Dong J, Han B, et al. Neuronal nitric oxide synthase contributes to ptz kindling-induced cognitive impairment and depressive-like behavior [J]. *Front Behav Neurosci*, 2017, 11: 203
- [11] 朱明媚, 郭丹莲, 周丽, 等. 小鼠nNOS(AA1-133)基因慢病毒载体的构建及功能初步检测 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2010, 30(7): 895-899
- [12] Bronzetti E, Artico M, Pompili E, et al. Neurotrophins and neurotransmitters in human palatine tonsils: An immunohistochemical and RT-PCR analysis [J]. *Int J Mol Med*, 2006, 18(1): 49-58
- [13] Boone DR, Leek JM, Falduto MT, et al. Effects of AAV-mediated knockdown of nNOS and GPx-1 gene expression in rat hippocampus after traumatic brain injury [J]. *PLoS One*, 2017, 12(10): e0185943
- [14] Wang X, Song X, Wu L, et al. Persistent hyperactivity of hippocampal dentate interneurons after a silent period in the rat pilocarpine model of epilepsy [J]. *Front Cell Neurosci*, 2016, 10: 94
- [收稿日期] 2018-12-07