

· 基础研究 ·

人cGAS基因启动子的克隆鉴定及功能初探

陈海燕¹,徐妍妍²,周国平²,徐华国^{1*}¹南京医科大学第一附属医院检验学部,²儿科,江苏 南京 210029

[摘要] 目的:构建人环鸟苷酸-腺苷酸合成酶(cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate synthase, cGAS)基因启动子,确认其活性,进而对转录调控机制进行初步探究。方法:采用PCR方法扩增人cGAS基因5'上游1 254 bp(-1 178~+76 bp)的片段,酶切后连接到pGL3-basic质粒,以该质粒为模板合成不同长度的启动子质粒。通过双荧光素酶报告基因实验验证不同质粒在Hela细胞中的活性,利用生物信息学方法预测启动子区存在的转录因子结合位点。通过点突变实验验证潜在的转录因子结合位点。结果:人cGAS启动子质粒初步构建成功。转染后,cGAS启动子重组质粒的相对荧光素酶活性增加($P < 0.05$)。人cGAS近端启动子区域(-414~+76 bp)经生物信息学软件分析可能含有Sp1、CREB、USF1、RAP1、C-JUN、OCT-1等转录因子的结合位点。点突变实验证实Sp1、CREB正向调控该启动子区域。结论:人cGAS近端启动子区域(-414~+76 bp)存在较强的启动子活性,该区域含有多个潜在的转录因子结合位点。转录因子Sp1、CREB调控人cGAS启动子区。

[关键词] 环鸟苷酸-腺苷酸合成酶;启动子;转录调控**[中图分类号]** Q78**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2019)06-856-06**doi:** 10.7655/NYDXBNS20190613

Cloning and characterization of human cGAS gene promoter

Chen Haiyan¹, Xu Yanyan², Zhou Guoping², Xu Huaguo^{1*}¹Department of Laboratory Medicine, ²Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to construct the promoter of human cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate synthase(cGAS)gene, and explore its promoter activity and transcriptional regulation mechanism. **Methods:** The 1 254 bp(-1 178~+76 bp) fragment of 5' upstream of human cGAS gene was amplified by PCR and subcloned into pGL3-basic plasmid. By a series of 5' deletion and promoter constructions, the core region of cGAS promoter was founded. Luciferase assays were used to detect the activity of recombinant plasmids in Hela cells. Then, the transcription factor binding sites in promoter region were predicted by bioinformatics. Finally, potential transcription factor binding sites were verified by point mutation experiments. **Results:** The luciferase reporter gene recombinant plasmids of cGAS gene promoter were successfully constructed. In comparison with the pGL3-basic plasmid, the relative luciferase activities of recombinant plasmids of cGAS promoter were much higher($P < 0.05$). What's more, bioinformatics software predicts that the proximal promoter region of human cGAS(-414~+76 bp) may contain binding sites of transcription factors such as Sp1, CREB, USF1, RAP1, C-JUN and OCT-1. Sp1 and CREB positively regulated promoter region, which was confirmed by point mutation experiment. **Conclusion:** It is concluded that the proximal promoter core region of human cGAS has strong promoter activity, which contains many potential transcription factors binding sites. The transcription factor Sp1 and CREB regulates the human cGAS promoter region.

[Key words] cGAS; promoter; transcriptional regulation

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(06):856-861]

[基金项目] 江苏省自然科学基金面上项目(SBK 2018022334);江苏省研究生科研创新项目(KYCX17_1287)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: 18901586216@189.cn

病毒感染威胁人类健康,除了感染机体外,病毒还具有致癌作用。天然免疫是机体抵御外来病毒的第一道防线。多种蛋白参与抗病毒天然免疫,环鸟苷酸-腺苷酸合成酶(cyclic guanosine monophos-

phate-adenosine monophosphate synthase, cGAS)在抗病毒固有免疫反应中起关键性作用,近年来受到越来越多的关注^[1]。cGAS是一种核苷酸转移酶,通过结合胞内DNA,催化第二信使环磷酸鸟苷-腺苷(cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate, cGAMP)的合成,并通过干扰素基因刺激因子(stimulator of interferon genes, STING)激活干扰素调节因子3(interferon regulatory factor 3, IRF3),介导I型干扰素(interferon, IFN)的产生,启动机体的抗病毒天然免疫反应。过度表达cGAS后,IRF3被激活,I型IFN及其依赖基因的表达增强;cGAS被敲低后,IRF3激活途径显著受到抑制,I型IFN及其依赖基因的表达量明显降低。DNA病毒感染cGAS基因敲除小鼠后尚不能产生I型IFN,因此机体不能作出有效应答^[2-5]。

目前对cGAS的研究主要集中在活化下游STING和转录因子IRF3的分子机制及其在不同病原相关分子模式诱导宿主产生固有免疫应答过程的功能方面,而cGAS自身的表达调控机制尚不清楚,尚未见到有关人cGAS启动子的研究报道。故本研究将克隆人cGAS启动子质粒并初步探讨其转录调控机制。

1 材料和方法

1.1 材料

人宫颈癌细胞Hela(HPV 18分型)、人胚肾细胞HEK293T、pGL3-basic质粒、海肾萤光素酶(Renilla)质粒为本实验室前期已拥有。培养基成分DMEM、Opti-MEM、胎牛血清(Gibco公司,美国)。细胞基因组DNA提取试剂盒、小量切胶回收试剂盒、大肠杆菌*E.coli DH5 α* (北京天根公司)。小量质粒抽提试剂盒(Omega公司,美国)。限制性内切酶*Kpn* I和*Bgl* II、T4 DNA连接酶和Ex Taq保真酶(TaKaRa公司,日本),DL5000 Maker、琼脂糖粉(南京擎科公司)。转染试剂LipofectamineTM 2000脂质体(Invitrogen公司,美国)。双荧光素酶检测试剂盒(Promega公司,美国)。点突变试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

用含10%胎牛血清的高糖DMEM培养基培养细胞,每隔2 d按1:3传代1次后置于37℃ 5% CO₂培养箱。实验过程中细胞均处于对数生长期。

1.2.2 基因组DNA的提取

按照基因组DNA提取试剂盒的说明书要求提

取细胞基因组DNA。

1.2.3 生物信息学软件预测

从NCBI数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>)获得人cGAS基因序列(编号:NC_000006.12)。利用UCSC网站(<http://genome.ucsc.edu/>)进行对比,再通过Neural Network Promoter Prediction(http://fruitfly.org/cgi-bin/seq_tools/promoter.pl)对cGAS近端启动子区域进行预测。运用TFSEARCH ver 1.3软件(<http://mbs.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>)预测相关转录因子结合位点。

1.2.4 克隆人cGAS基因启动子区序列

用oligo 7.0软件设计人cGAS基因5'端的引物。引物送南京擎科公司合成,具体序列如下:上游5'-GGGGTACCCAGTGGCTCATGCCTACAAT-3',下游5'-GAAGATCTCTGTTGGAAACCAAGCACA-TACT-3'。抽提Hela细胞的全基因组DNA作为扩增模板。PCR反应的条件:95℃ 3 min;95℃ 30 s,58℃ 1 min,72℃ 1 min,30个循环。扩增cGAS基因启动子区域。将产物送南京擎科公司测序。

1.2.5 人cGAS基因启动子荧光素酶报告基因重组质粒的构建与鉴定

双酶切通过限制性内切酶*Kpn* I和*Bgl* II实现,用T4 DNA连接酶对回收产物和pGL3-basic质粒的酶切片段进行连接。连接产物转化大肠杆菌DH5 α 。加入800 μ L LB培养基,200 r/min摇45 min后,将100 μ L菌液接种至含氨苄青霉素的LB平板上。第2天收板,挑取单克隆至LB液体培养基,16~20 h后抽提质粒。以构建成功的质粒作为模板,通过步移缺失法克隆不同长度的人cGAS启动子片段,引物序列见表1,用同样的方法构建不同缺失片段的人cGAS启动子荧光素酶报告质粒。

1.2.6 转染质粒进行荧光素酶功能分析

Hela、HEK293T细胞计数 1×10^5 个/mL,铺板于

表1 扩增人cGAS启动子片段引物

Table 1 Primers designed to amplify the different cGAS promoter

引物名	序列(5'→3')
pLUC-490 F	GGGGTACCCGCTAGCTAATATTTGTATTT
pLUC-280 F	GGGGTACCCCTGCTCAAACCTCCTGAGCT
pLUC-122 F	GGGGTACCCCTACCTCATCTTCTTAAGACAG
pLUC-73 F	GGGGTACCTTTGTAGCCTCAGGAAAG
cGAS R	GAAGATCTCTGTTGGAAACCAAGCACTACT

下划线部分为酶切位点,上游为限制性内切酶*Kpn* I位点,下游为*Bgl* II限制性内切酶位点。

48孔板中,16~20 h后细胞长至70%~80%。用Lipofectamine™ 2000脂质体将重组人cGAS启动子荧光素酶报告质粒及pGL3-basic、Renilla质粒共转染至细胞内,24 h后收板。弃掉培养基后用1×PBS洗涤1次,加入裂解液100 μL震荡20 min后,离心吸取10 μL上清。采用Dual-Luciferase Reporter Assay System进行荧光素酶活性检测并计算相对荧光素酶活性。

1.2.7 定点突变

设计部分反向互补的引物,对原始质粒进行反向扩增。扩增产物经Dpn I消化后,进行重组转化。重组产物直接进行转化即可完成定点突变。

1.3 统计学方法

采用SPSS23.0软件进行统计分析。实验数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组比较采用t检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

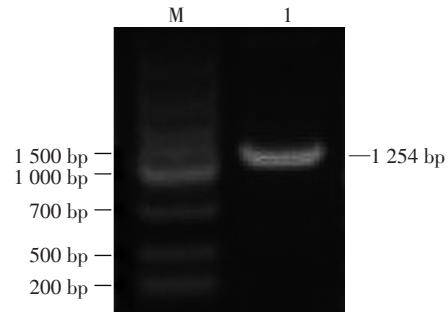
2.1 生物信息学分析

首先在NCBI网站及UCSC网站比对确认cGAS的启动子区域。运用Promoter 2.0 Prediction Serve (<http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/>)预测转录起始位点上游约1 000 bp区域,结果表明该区域具有很强的活性。同时利用Neural Network Promoter Prediction (http://fruitfly.org/cgi-bin/seq_tools/promot-

er.pl)对该序列进行预测,得分为0.82。将-1 178~+76 bp区域作为启动子的候选区域,并将此区域亚克隆到无启动子活性的pGL3-Basic质粒中。

2.2 人cGAS基因启动子荧光素酶报告基因重组质粒的构建

以Hela细胞的全基因组DNA为模板,根据设计的引物,利用PCR技术扩增cGAS 5'端序列,PCR产物进行核酸凝胶电泳,可见1条介于1 000~1 500 bp大小的条带,与目的条带(1 254 bp)大小相同(图1),测序后序列比对结果如图2。将PCR产物酶切、连接、转化后获得的质粒命名为pLUC-1254。转染pLUC-1254或pGL3-basic和Renilla质粒至Hela、HEK293T细胞,启动子质粒活性增强($P < 0.05$),证明质粒构建成功(图3)。



M: DL 5 000 Marker; 1: PCR扩增的cGAS基因启动子片段。

图1 克隆启动子片段

Figure 1 Cloning of cGAS gene promoter



图2 pLUC-1254质粒片段序列比对

Figure 2 Sequence alignment of pLUC-1254 plasmid

2.3 人cGAS基因启动子5'侧翼区缺失突变体的构建

以pLUC-1254质粒为模板,用不同引物构建不同长度的缺失突变体。经双酶切、连接、转化、测序成功后,分别命名为pLUC-490、pLUC-280、pLUC-122、pLUC-73。

2.4 cGAS启动子活性的检测

将构建的重组荧光素酶报告基因启动子质粒分别与对照质粒pGL3-basic、内参质粒Renilla共转染至Hela细胞,24 h后进行荧光素酶活性检测。重组质粒pLUC-490、pLUC-280、pLUC-122、pLUC-73活性分别为 26.79 ± 2.00 、 14.38 ± 0.60 、 4.10 ± 0.60 、 0.65 ± 0.18 ,与对照组(1.00 ± 0.23)相比前3个质粒差异具有统计学意义(图4)。表明这些重组质粒均具有启动子活性,其中pLUC-490活性最强。因此,可以得出结论,cGAS基因启动子核心区域位于-414~+76 bp内。

2.5 人cGAS基因启动子区转录因子结合位点预测

根据实验结果,初步锁定-414~+76 bp为cGAS启动子关键区域。转录因子结合位点的预测通过TFSEARCH ver 1.3软件实现。软件预测结果显示,转录因子Sp1、CREB、USF1、RAP1、C-JUN、OCT-1可能与该序列结合(图5)。

2.6 转录因子突变分析

根据软件预测结果,构建了Sp1、CREB、USF1、RAP1、C-JUN点突变质粒。向质粒中引入定点突变,需设计一对引物将质粒进行反向PCR扩增。各突变质粒扩增引物序列如下(表2)。测序成功后转染HEK293T细胞,各重组启动子质粒活性如图6所示,实验结果表明转录因子Sp1、CREB调控该启动子区域。

3 讨论

本研究成功构建了cGAS野生型启动子的虫荧

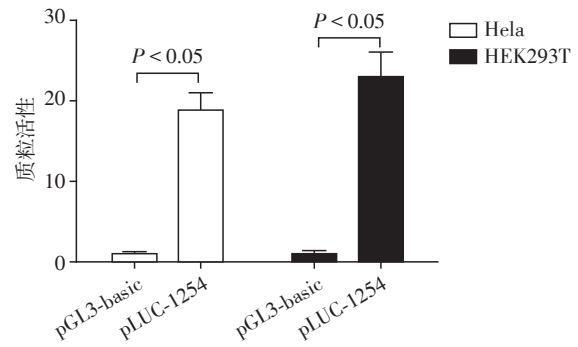
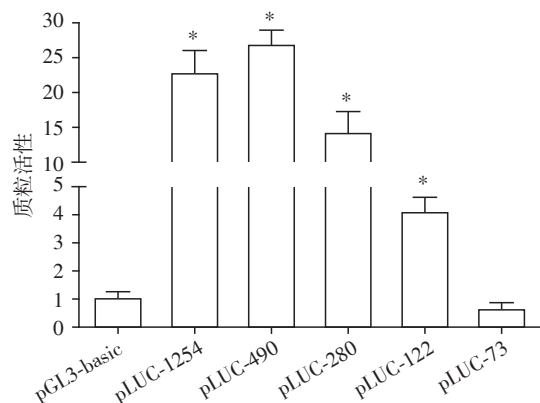


图3 pLUC-1254质粒活性验证
Figure 3 Luciferase assay of pLUC-1254 plasmid



与pGL3-basic相比,* $P < 0.05$ ($n=4$)。
图4 cGAS重组荧光素酶报告质粒在Hela细胞中的相对活性
Figure 4 Relative activity of cGAS recombinant luciferase reporter plasmids in HeLa cells

光素酶报告质粒,并在人Hela细胞、HEK293T细胞中证实了它们均具有较强的启动子活性。且推测近端核心启动子区域(-414~+76 bp)存在转录因子结合位点,提示转录因子Sp1、CREB、USF1、RAP1、C-JUN、OCT-1可能调控该基因。经点突变实验证实Sp1、CREB正向调控cGAS启动子。

```
GTTGGCCAGGCTGGTCTTGAACCTCTGACCTCAGGTGATCCGCCACCTCGGTCTCCC
                CREB    USF1    SP1
AGATTGCTGGGATTACAGGCGTGAGTCACTGTGCCAGGCAACACACACACACACATA
                C-JUN                                OCT-1
TATTTAATTATAAGAAAGACCAGGTCTTGTCTGGGTTGCCAGGCTGGTCTCAAACCTCT
                RAP1
GAGCTCAAGCGACCCGCCTGCCTCGGCCTCTCGGATGCTGAGGTTACAGGCGTGAGCC
                SPI
ACCGCGCCCGCCCTACCTCATCTTCTTAAGACAGGGGCACGGATTGCCTGGAGAGTT
AGAAACTTCGAGACTTTTGTAGCCTCAGGAAAGGCCGCGCCAGCCTCTTCGCGGCAT
                +1
GGCGTGGCTCCAGGACTTCCCAGCCTGGGGTTCCCTTCGGGTCCGAGACTCTTG
```

图5 用TFSEARCH ver 1.3软件预测转录因子结合位点

Figure 5 Prediction of transcription factor binding sites using TFSEARCH ver 1.3 software

表2 点突变质粒引物序列
Table 2 Sequences of oligonucleotides used in site-directed mutagenesis

引物名称	序列(5'→3')
CREB-MUT F	GTTGGCCAGGCTGGTCTTGAACCTCCTCAGGTGATC
CREB-MUT R	GGAGACCGAGGTGGGCGGATCACCTGAGAGGAGTTCA
USF1-MUT F	CTCCTGACCTCAGATCCGCCACCTCGGTCTCCAGATTGC
USF1-MUT R	GGTGGCGGATCTGAGGTCAGGAGTTCAAGACCAGCCTGGC
SP1-MUT F	CCTCAGGTGATCCACCTCGGTCTCCAGATTGCTGGGAT
SP1-MUT R	GACCGAGGTGGATCACCTGAGGTCAGGAGTTCAAGACCAG
C-JUN-MUT F	TACAGGCGTGAGGTGTGCCAGGCAACACACACACACAT
C-JUN-MUT R	TGCCTGGGCACACCTCACGCCTGTAATCCCAGCAATCTGGG
RAP1-MUT F	AGGTCTTGCTGGCCAGGCTGGTCTCAAACCTCCTGAGCTC
RAP1-MUT R	CCAGCCTGGGCCAGCAAGACCTGGTCTTTCTTATAATTA

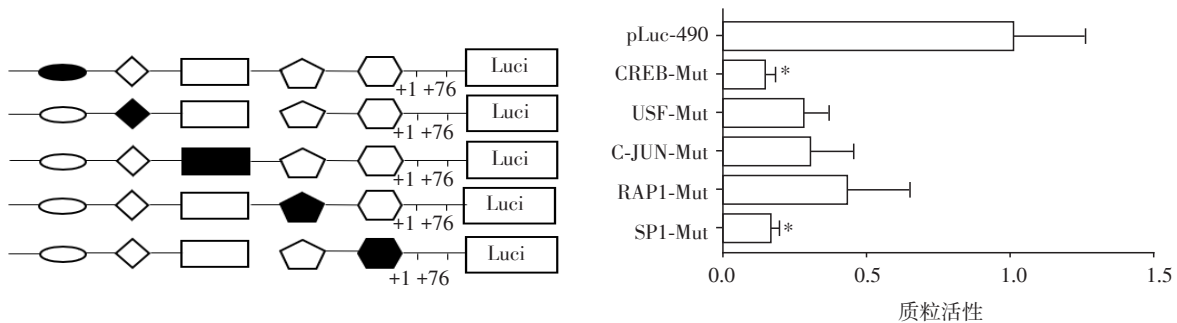


图6 点突变验证转录因子结合位点
Figure 6 Point mutation to verify transcription factor binding sites

cGAS 基因启动子功能和特性的确定对今后进一步深入研究 cGAS 的生物学功能和揭示抗病毒固有免疫信号通路有重要意义。了解所涉及的过程可能有助于阐述先天免疫信号通路和自身炎症性疾病的机制,并为药物干预提供潜在的治疗靶点。启动子在基因表达调控方面起十分关键的作用,包括核心启动子和近端启动子。核心启动子引导 RNA 聚合酶 II 的精确转录起始,它包含 TATA 盒、启动因子 (initiator, Inr)、下游启动子成分 (downstream promoter element, DPE)、转录因子 II B 识别成分 (TF II B recognition element, BRE) 和基序十要素 (motif ten element, MTE), 这些不同组分可形成不同类型的核心启动子^[6]。近端启动子包含了转录因子结合位点。功能转录因子结合位点的发现有助于进一步揭示靶基因上游的信号通路, Tong 等^[7]通过运用含 IRF3 调控元件的 IFN-β 启动子作为报告子, 成功筛选出了位于上游的具有活化 IRF3 功能的重要蛋白分子 STING。功能转录因子结合位点的确定也为阐明转录因子结合位点变异相关疾病的发病机制提供依据^[8]。与蛋白翻译后修饰相比, 转录水

平的调控对基因表达的调控更加精细和持久。

正常情况下, 细胞内 DNA 存在于细胞核和线粒体中。但是, 外源微生物入侵、基因组不稳定或者线粒体胁迫等情况会导致细胞质 DNA 的存在。这些细胞质 DNA 会触发细胞剧烈的免疫应答。研究表明, 调控失常与一系列疾病密切相关, 如自身免疫疾病与癌症^[9-11]。

2012 年底, Lijun 等^[12]首次鉴定到 cGAS, 它能直接检测细胞质 DNA 并激活下游的 I 型干扰素信号。随后 cGAS 的三维结构也被解析了^[13]。一直以来 cGAS 作为一个 DNA 受体, 能够对外界病原微生物以及人体细胞质内自身 DNA 进行识别, 并激活免疫反应, 但对其生理过程研究仅仅局限于在细胞质内, 然而近期有学者首次揭露 cGAS 具有促癌功能^[14], 因此这一发现把 cGAS 的功能研究推向一个崭新的领域。cGAS 将成为抗肿瘤药物开发中一个重要的靶点。

[参考文献]

[1] Hornung V, Hartmann R, Ablasser A, et al. OAS proteins and cGAS: unifying concepts in sensing and responding to cytosolic nucleic acids [J]. Nat Rev Immunol, 2014, 14

- (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