

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.08.001
文章编号: 1005-8982 (2018) 08-0001-05

基础研究 · 论著

脊髓缺血再灌注损伤对大鼠 CaMKIV 基因及蛋白表达的影响 *

陈忠婧¹, 仝淞铭², 苏瑞超³, 葛礼豪³, 曹阳³, 于德水³

(1. 锦州医科大学, 辽宁 锦州 121001; 2. 江苏省徐州市肿瘤医院 骨科, 江苏 徐州 221000; 3. 锦州医科大学附属第一医院 骨科, 辽宁 锦州 121001)

摘要: 目的 分析大鼠脊髓缺血再灌注损伤 (SCII) 后钙调蛋白依赖性蛋白激酶 4 (CaMKIV) 基因及蛋白表达的变化。**方法** 雄性 SD 大鼠 84 只, 按随机数字表法分为假手术组、SCII 0 d 组、SCII 1 d 组、SCII 3 d 组、SCII 7 d 组、SCII 14 d 组、SCII 28 d 组, 每组 12 只。假手术组仅暴露肾动脉下腹主动脉, 不阻断。SCII 各组采用 Naslund 法阻断腹主动脉, 复制 SCII 模型。采用免疫组织化学法、Western blot、实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测各组大鼠 CaMKIV 蛋白及基因的表达, BBB 评分评价大鼠后肢运动功能。**结果** 免疫组织化学法结果显示, 假手术组 CaMKIV 蛋白表达很少, SCII 组 CaMKIV 蛋白高表达于神经元的细胞浆和细胞核; 在伤后 3 d, CaMKIV 阳性细胞数最多, 且高于假手术组 ($P < 0.05$)。Western blot 结果提示, CaMKIV 蛋白表达在再灌注 0 d 即高于假手术组 ($P < 0.05$), 于再灌注 3 d 达峰值后逐渐降低; 至 28 d, CaMKIV 蛋白表达量与假手术组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。qRT-PCR 结果表明, CaMKIV 基因表达在再灌注 0 d 开始增加, 与假手术组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 于 3 d 达峰值后降低, 至 28 d 仍高于假手术组 ($P < 0.05$)。BBB 评分显示, SCII 各组大鼠后肢功能随再灌注时间延长有所改善, 但至 28 d 时仍差于假手术组。**结论** SCII 早期可快速诱导 CaMKIV 基因表达上调和蛋白合成, CaMKIV 在 SCII 中可能发挥重要作用。

关键词: 缺血再灌注; CaMKIV; 脊髓损伤

中图分类号: R651.2

文献标识码: A

Effect of ischemia-reperfusion injury on expression of CaMKIV gene and protein in spinal cord of rats*

Zhong-jing Chen¹, Song-ming Tong², Rui-chao Su³, Li-hao Ge³, Yang Cao³, De-shui Yu³

(1. Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China; 2. Department of Orthopedics, Xuzhou Cancer Hospital, Xuzhou, Jiangsu 221000, China; 3. Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China)

Abstract: Objective To observe the change law of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV (CaMKIV) gene and protein in spinal cord ischemia-reperfusion injury (SCII) rats. **Methods** Using random number table, 84 male Sprague-Dawleys rats were randomly and equally divided into sham group, SCII 0 day group, SCII 1 day group, SCII 3 days group, SCII 7 days group, SCII 14 days group, and SCII 28 days group. The rats of the sham group were only subjected to exposure of the abdominal aorta below renal artery but without occlusion; in the SCII groups, the

收稿日期: 2016-09-13

* 基金项目: 国家自然科学基金 (No: 81541043); 辽宁省科技厅自然科学基金 (No: 201602329); 辽宁省高等学校优秀人才支持计划 (No: LR2013091); 辽宁省大学生创新创业训练计划项目 (No: 201510160000024)

[通信作者] 于德水, E-mail: ydsfsy@163.com

SCII model was established by blocking abdominal aorta using Naslund method. Immunohistochemistry, Western blot and qRT-PCR technique were used to detect CaMKIV protein and gene expressions respectively. BBB score was utilized to evaluate movement function of rat hindlimbs. **Results** According to the results of immunohistochemistry, CaMKIV protein was expressed less in the sham group, while was highly expressed in neuronal cytoplasm and nuclei in the SCII groups, and the number of CaMKIV-positive cells was maximal on the 3rd day after injury and obviously larger than that of the sham group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Western blot results suggested that CaMKIV protein expression in the SCII 0 day group was significantly higher than that in the sham group ($P < 0.05$), reached the peak value in the SCII 3 day group and then reduced, on the 28th day after reperfusion the expression of CaMKIV protein had no significant difference from that in the sham group ($P > 0.05$). qRT-PCR showed *CaMKIV* gene expression began to increase from the day of reperfusion, and compared with the sham group the difference was statistically significant ($P < 0.05$), and then reduced from 3 days after reperfusion, but was still higher than that of the sham group till the 28th day after reperfusion ($P < 0.05$). BBB score showed that the hindlimb function of the rats in each SCII group was improved with the prolongation of reperfusion time, but was still worse than that of the sham group till the 28th day. **Conclusions** Early-stage ischemia-reperfusion injury of spinal cord can rapidly induce *CaMKIV* gene expression up-regulation and protein synthesis. *CaMKIV* may play an important role in spinal cord ischemia-reperfusion injury.

Keywords: ischemia-reperfusion; *CaMKIV*; spinal cord injury

脊髓缺血再灌注损伤 (spinal cord ischemia-reperfusion injury, SCII) 是一种严重的中枢神经系统损伤, SCII 后的病理生理过程非常复杂, 主要包括自由基损伤、钙通道开放、脂质过氧化反应、细胞凋亡等, 往往对神经细胞造成非常严重的损伤, 也成为后期恢复的障碍^[1-2]。钙调蛋白依赖性蛋白激酶 4 (Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase IV, CaMKIV) 是细胞钙通道开放后被激活的一种蛋白激酶, 广泛存在于中枢神经系统中, 其在激活细胞内发挥重要作用, 还可通过磷酸化转录因子环磷酸腺苷效应元件结合蛋白 (cAMP-response element binding protein, CREB), 在神经元长时程增强 (Long-term potentiation, LTP) 过程中发挥关键作用^[3-5]。本实验通过复制 SCII 模型, 观察 SCII 后不同时间 CaMKIV 基因和蛋白的表达, 探讨其在 SCII 病理变化中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料

兔抗 CaMKIV (北京博奥森公司), 免疫组织化学法试剂盒和 DBA 购自北京中杉公司, 实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司、大连宝生生物技术有限公司。CaMKIV 引物合成由日本 TaKaRa 公司、大连宝生生物技术有限公司完成。

1.2 实验分组

健康成年 SD 雄性大鼠 84 只, 体重 (250 ± 20) g, 由辽宁医学院动物实验中心提供。动物随机分为 7 组,

分别为假手术组、SCII 0 d 组、SCII 1 d 组、SCII 3 d 组、SCII 7 d 组、SCII 14 d 组、SCII 28 d 组, 每组 12 只。

1.3 SCII 模型的复制

采用 Naslund 腹主动脉阻断方法复制 SCII 模型。10% 水合氯醛 40 mg/kg 腹腔注射麻醉, 麻醉后取仰卧位, 无菌条件下行腹部旁正中切口, 暴露腹主动脉, 于左肾动脉分叉下方约 0.5 cm 处放置动脉夹, 夹闭腹主动脉, 以阻断下方动脉无搏动为标准。阻断 30 min 后取出动脉夹, 腹腔脏器复位, 逐层缝合。假手术组在同样条件下手术, 只暴露腹主动脉。

1.4 方法

1.4.1 取材 随机取出各组大鼠 4 只, 麻醉满意后心脏灌流, 取出 L₂ ~ L₅ 节段脊髓组织, 于 4℃、4% 多聚甲醛中固定, 石蜡包埋, 用于免疫组织化学染色。取每组剩余大鼠 8 只, 麻醉满意后, 迅速取出 L₂ ~ L₅ 节段脊髓, 放入 EP 管中, -80℃ 冻存, 用于 Western blot 和 qRT-PCR 检测。

1.4.2 免疫组织化学法 按 5 μm 厚度切片, 常规脱蜡。按免疫组织化学法试剂盒说明书进行操作, 兔抗 CaMKIV 以 1 : 100 稀释, DBA 显色。由不了解分组的观察者用聚焦光学显微镜, 在高倍镜下 (400 倍) 随机选取不同部位的 6 个视野, 计算阳性细胞数。

1.4.3 Western blot 检测 取长约 5 mm 脊髓节段, 加入蛋白裂解液, 采用紫外分光光度计测定蛋白含量, 取等量蛋白样品, SD-PAGE 电泳分离蛋白, 采用半干法将蛋白条带转移至 PVDF 膜上, 1% BSA 封闭 1 h, CaMKIV 一抗 (1 : 300 稀释) 4℃ 孵育过夜。TBST 漂洗,

兔抗 IgG (1 : 1 000) 室温孵育 1 h, TBST 漂洗, 化学发光试剂发光、显影。以目的条带与内参 β -actin 的吸光度 (optical density, OD) 值表示相对表达水平, 进行半定量分析。

1.4.4 qRT-PCR Trizol 法提取组织 RNA, 在 $10\mu\text{l}$ 反应体系中去掉基因组 DNA 后, 在 $20\mu\text{l}$ 反应体系中进行逆转录, 得到 cDNA。反应条件: 37°C 预反应 15 min, 85°C 反应 5 s。CaMKIV mRNA 正向引物: $5'$ -AGAAATCAGCCTGGTTCTTGAGCT- $3'$, 反向引物: $5'$ -AACTGCCTCCAGGATCTGCTTC- $3'$ 。GAPDH 正向引物: $5'$ -CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT- $3'$, 反向引物: $5'$ -AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC- $3'$ 。将逆转录后得到的 cDNA 样本进行 10 倍梯度稀释, 向 PCR 管中加入 $20\mu\text{l}$ Master Mix 反应液, 以 GAPDH 为对照, 进行 PCR 反应, 每组重复 3 次。利用 ABI7500 qRT-PCR 系统, 对 CaMKIV 基因进行 qRT-PCR 检测。反应结束后, 应用 ABI7500 分析软件, 分析目的基因扩增曲线并绘制相应的标准曲线。以 GAPDH 为参照基因, 检测 SCII 组脊髓中 CaMKIV 基因的表达水平, 以假手术组为校准样本, 比较 SCII 组相对假手术组的表达差异, 并用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行分析。

1.4.5 BBB 评分 采用 BASSO 等^[6]提出的 BBB 评分体系, 处死前对各组大鼠进行神经功能评定, 总分 0 ~ 21 分, 完全功能缺失为 0 分, 完全正常鼠为 21 分, 评价内容主要包括大鼠后肢关节的运动、驱赶位置及稳定性、步态、协调性、爪的置放、足趾间隙及尾的位置等。评分者为 3 位熟悉评分标准的非本课题实验人员, 评分后取平均值。

1.5 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用方差分析, 方差齐则两两比较用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组脊髓组织 CaMKIV 阳性细胞数比较

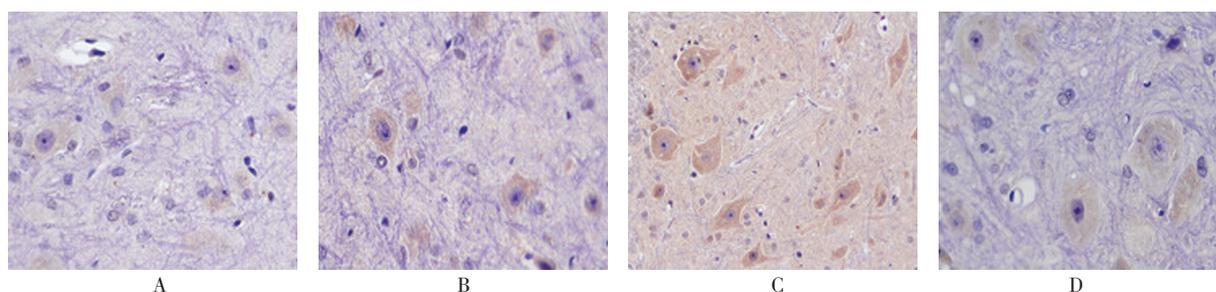
假手术组 CaMKIV 蛋白表达很少; SCII 组 CaMKIV 蛋白高表达于神经元胞浆、胞核及轴突, 其细胞呈卵圆形或三角形, 于脊髓前角和中央带相对较多。在 SCII 0 d, 有少量阳性神经元散在分布于脊髓前角和中央带; SCII 3 d, 脊髓前角、中间带及后角阳性神经元的数目增多且着色更深; 然后随时间延长逐渐减少; 至 28 d, CaMKIV 阳性细胞表达减少, 且着色更浅。除 SCII 28 d 组外, 其余各组脊髓组织 CaMKIV 阳性细胞数比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 100.144$, $P = 0.000$)。进一步两两比较经 LSD- t 检验, SCII 0 d 组 CaMKIV 阳性细胞数高于假手术组 ($P < 0.05$)。随再灌注时间延长, CaMKIV 阳性细胞数开始增加, 3 d 时达高峰后逐渐下降, 至 14 d 时仍高于假手术组 ($P < 0.05$)。见图 1、2。

2.2 各组脊髓组织 CaMKIV 蛋白表达水平比较

除 28 d 组外, 其余各组脊髓组织 CaMKIV 蛋白表达水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 46.598$, $P = 0.000$)。进一步两两比较经 LSD- t 检验, SCII 0 d 组 CaMKIV 蛋白表达量高于假手术组 ($P < 0.05$)。随着再灌注时间延长表达量逐渐增多, 3 d 时达高峰, 其后随着时间延长逐渐下降, 至 14 d 时, SCII 14 d 组 CaMKIV 蛋白表达量仍高于假手术组 ($P < 0.05$), 至 28 d 时, CaMKIV 蛋白表达量与假手术组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 3、4。

2.3 各组脊髓组织 CaMKIV 基因表达水平比较

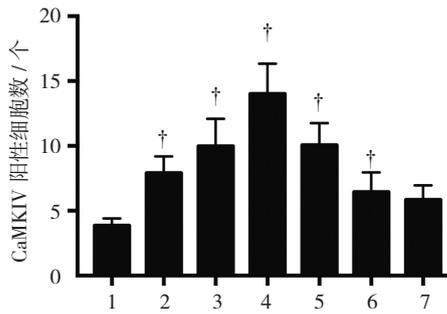
假手术组、SCII 0 d 组、SCII 1 d 组、SCII 3 d 组、SCII 7 d 组、SCII 14 d 组、SCII 28 d 组脊髓组织 CaMKIV 基因相对表达量分别为 (1.000 ± 0.00)、(1.228 ± 0.135)、(1.674 ± 0.209)、(1.863 ± 0.216)、



A: 假手术组 CaMKIV 阳性神经元表达较少; B: SCII 0 d 组脊髓部分神经元胞浆呈棕褐色; C: SCII 3 d 组脊髓 CaMKIV 阳性神经元明显增多, 神经元胞浆、胞核染色加深; D: SCII 28 d 组脊髓 CaMKIV 阳性神经元明显减少

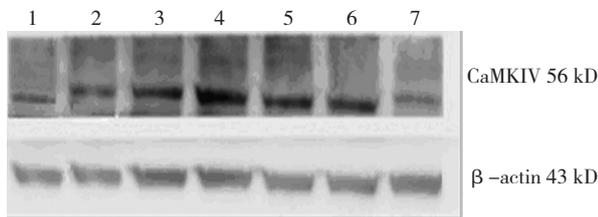
图 1 大鼠脊髓组织 CaMKIV 阳性表达 (免疫组织化学法 $\times 400$)

(1.402 ± 0.093)、(1.258 ± 0.119) 和 (1.135 ± 0.084)，经方差分析，差异有统计学意义 ($F=88.057$, $P=0.000$)。进一步两两比较经 LSD- t 检验，SCII 0 d 组 *CaMKIV* 相对表达量高于假手术组 ($P<0.05$)。随再灌注时间延长，*CaMKIV* 基因表达量开始增加，3 d 时达高峰，然后逐渐下降，28 d 后趋于稳定，且高于假手术组 ($P<0.05$)。见图 5。



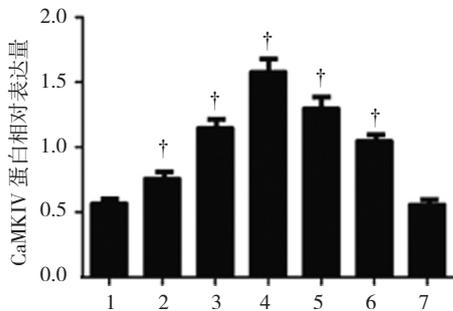
1: 假手术组; 2: SCII 0 d 组; 3: SCII 1 d 组; 4: SCII 3 d 组; 5: SCII 7 d 组; 6: SCII 14 d 组; 7: SCII 28 d 组。†与假手术组比较, $P<0.05$

图 2 各组大鼠脊髓组织 *CaMKIV* 阳性细胞数比较 ($n=12$, $\bar{x} \pm s$)



1: 假手术组; 2: SCII 0 d 组; 3: SCII 1 d 组; 4: SCII 3 d 组; 5: SCII 7 d 组; 6: SCII 14 d 组; 7: SCII 28 d 组

图 3 各组大鼠脊髓组织 *CaMKIV* 蛋白表达

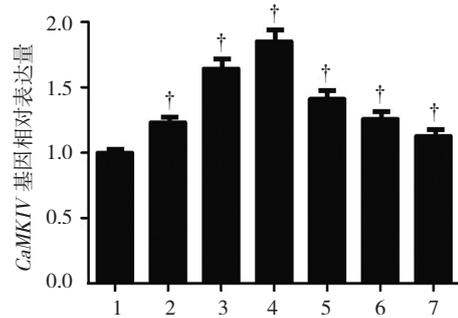


1: 假手术组; 2: SCII 0 d 组; 3: SCII 1 d 组; 4: SCII 3 d 组; 5: SCII 7 d 组; 6: SCII 14 d 组; 7: SCII 28 d 组。†与假手术组比较, $P<0.05$

图 4 各组大鼠脊髓组织 *CaMKIV* 蛋白表达水平比较 ($n=12$, $\bar{x} \pm s$)

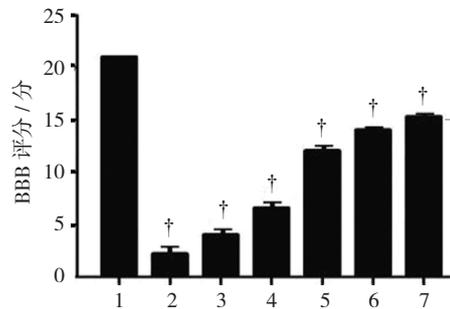
2.4 BBB 评分

假手术组大鼠后肢功能正常，BBB 评分 21 分，各组大鼠后肢功能评分比较，经方差分析，差异有统计学意义 ($F=513.61$, $P=0.000$)。SCII 组术后即出现 BBB 评分下降，随着时间推移，BBB 评分逐渐升高，后肢功能有所恢复，至 28 d 处死时，BBB 评分仍低于假手术组 ($P<0.05$)。见图 6。



1: 假手术组; 2: SCII 0 d 组; 3: SCII 1 d 组; 4: SCII 3 d 组; 5: SCII 7 d 组; 6: SCII 14 d 组; 7: SCII 28 d 组。†与假手术组比较, $P<0.05$

图 5 各组大鼠脊髓组织 *CaMKIV* 基因表达水平比较 ($n=12$, $\bar{x} \pm s$)



1: 假手术组; 2: SCII 0 d 组; 3: SCII 1 d 组; 4: SCII 3 d 组; 5: SCII 7 d 组; 6: SCII 14 d 组; 7: SCII 28 d 组。†与假手术组比较, $P<0.05$

图 6 各组大鼠后肢功能评分 ($n=12$, $\bar{x} \pm s$)

3 讨论

有关 Ca^{2+} 及其作用的报道很多， Ca^{2+} 是细胞内重要的信号转导分子，在细胞内信息的传递过程中发挥重要作用^[7]。钙调蛋白 (Calmodulin, CaM) 作为钙离子结合蛋白，其活性受 Ca^{2+} 浓度的调控。当细胞受到伤害性刺激时，钙离子内流，造成细胞内钙离子超载。当细胞液内 Ca^{2+} 浓度升高到一定值时，CaM 与 Ca^{2+} 结合成 Ca^{2+} -CaM 复合物，引起 CaM 构象变化。该复合物激活 CaMK，使许多靶蛋白的丝氨酸/苏氨酸残基

磷酸化, 改变这些蛋白活性^[8-9]。大量研究表明, 钙离子信号通过 CaM 和 CaMK 家族 (CaMKI、CaMKII、CaMKIV) 正向或负向调节突触的复杂性, CaMKIV 作为多功能 CaMK 家族的成员之一, 可磷酸化主要转录因子 CREB, 从而调节基因转录^[4]。有报道认为, Ca²⁺ 可通过调节 CaMKIV 激活转录因子 CREB, 从而介导树突的生长^[10]。NAGENDRAN 等^[11] 发现, CaMKIV 是通过调节树突的分支和伸长等具体形态特征, 来调节神经元树突的复杂性, 从而调控神经元树突的生长, 在中枢神经系统中发挥作用。

关于 CaMKIV 在 SCII 中的作用, 目前的文献报道较少。因其广泛存在于中枢神经系统。RIBAR 等^[12] 发现, *CaMKIV* 基因敲除的小鼠会出现运动功能损害, 他提出 CaMKIV 在维持小脑的功能中发挥重要作用。在体外实验中, CaMKIV 通过诱导小脑颗粒神经元中钾的丢失来抑制凋亡, 从而起到保护神经的作用^[13]。SCII 后, 钙信号通过细胞体进入细胞核, 导致核活化, CaMKIV 作为 CaMK 通路中的核效应器, 协调转录应答。而 HARRISON 等^[14] 研究发现, CaMKIV 在一些神经元亚种群的细胞质和轴突中也有表达。本实验通过免疫组织化学法对 CaMKIV 蛋白进行初步细胞定位, 结果显示 CaMKIV 蛋白表达于细胞浆及细胞核中, 说明 CaMKIV 参与脊髓损伤后神经元的病理变化, 且作用部位为细胞浆及细胞核。

本实验通过 qRT-PCR 对假手术组及 SCII 组 *CaMKIV* 基因表达的时间变化进行分析, 结果显示 SCII 组 *CaMKIV* 基因表达相对假手术组升高, 提示 SCII 后可快速诱导 *CaMKIV* 基因转录, 并促进蛋白质合成。并通过 Western blot 及免疫组织化学法对 CaMKIV 蛋白表达的时间进行检测, 发现 SCII 可导致脊髓 CaMKIV 蛋白表达发生变化, 呈先短暂升高, 在 3 d 时达高峰后逐渐降低的趋势。结果显示, 在 SCII 后不同时间, 因脊髓损伤程度不同, CaMKIV 蛋白表达也随之发生变化, 说明 CaMKIV 在损伤的脊髓中发挥重要作用。

本实验仅证实, CaMKIV 在 SCII 中的时序性表达, 其参与 SCII 的病理变化, 但具体机制尚不十分清楚。TOYODA 等^[4] 研究表明, 在 CaMKIV 过表达的转基因小鼠中, 大脑前扣带回 LTP 增强, 其通过促进蛋白质的合成来增强 LTP 过程。而 KOKUBO 等^[15] 在小鼠小脑颗粒神经元中发现, CaMKIV 的缺失会导致 BDNF 基因和蛋白表达降低。在中枢神经系统中, CaMKIV 可能通过调节 BDNF 来发挥作用。

参 考 文 献:

- [1] ISHIKAWA T, SUZUKI H, ISHIKAWA K, et al. Spinal cord ischemia / injury[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2014, 20(36): 5738-5743.
- [2] POST M J, SATO K, MURAKAMI M, et al. Adenoviral PR39 improves blood flow and myocardial function in a pig model of chronic myocardial ischemia by enhancing collateral formation[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2006, 290(3): R494-R500.
- [3] GHIRETTI A E, KENNY K, MARR M T, et al. CaMKII-dependent phosphorylation of the GTPase Rem2 is required to restrict dendritic complexity[J]. *J Neurosci*, 2013, 33(15): 6504-6515.
- [4] TOYODA H, ZHAO M G, MERCALDO V, et al. Calcium / calmodulin -dependent kinase IV contributes to translation-dependent early synaptic potentiation in the anterior cingulate cortex of adult mice[J]. *Mol Brain*, 2010, 3: 27.
- [5] BELL K F, BENT R J, MEESE-TAMURI S, et al. Calmodulin kinase IV-dependent CREB activation is required for neuroprotection via NMDA receptor-PSD95 disruption[J]. *J Neurochem*, 2013, 126(2): 274-287.
- [6] BASSO D M, BEATTIE M S, BRESNAHAN J C, et al. MASCIS evaluation of open field locomotor scores: effects of experience and teamwork on reliability. Multicenter animal spinal cord injury study[J]. *J Neurotrauma*, 1996, 13(7): 343-359.
- [7] SONG Z, CHEN Q, DING Q, et al. Function of Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase IV in Ca²⁺-stimulated neuronal signaling and behavior[J]. *Sci China Life Sci*, 2015, 58(1): 6-13.
- [8] 田余祥, 秦宜德. 医学分子生物学 [M]. 北京, 科学出版社, 2013: 230-231.
- [9] NAZ H, ISIAM A, AHMAD F, et al. Calcium / calmodulin-dependent protein kinase IV : a multifunctional enzyme and potential therapeutic target[J]. *Prog Biophys Mol Biol*, 2016, 121(1): 54-65.
- [10] COHEN S M, LI B, TSIEN R W, et al. Evolutionary and functional perspectives on signaling from neuronal surface to nucleus[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 460(1): 88-99.
- [11] NAGENDRAN T, HARDY L R. Calcium / calmodulin-dependent kinase IV mediates distinct features of basal and activity-dependent dendrite complexity[J]. *Neuroscience*, 2011, 199: 548-562.
- [12] RIBAR T J, RODRIGUIZ R M, KHIROUG L, et al. Cerebellar defects in Ca²⁺ / calmodulin kinase IV-deficient mice[J]. *J Neurosci*, 2000, 20(22): 1-5.
- [13] SEE V, BOUTILLIER A L, BITO H, et al. Calcium / calmodulin-dependent protein kinase type IV (CaMKIV) inhibits apoptosis induced by potassium deprivation in cerebellar granule neurons[J]. *FASEB J*, 2001, 15(1): 134-144.
- [14] HARRISON B J, FLIGHT R M, GOMES C, et al. IB4-binding sensory neurons in the adult rat express a novel 3' UTR-extended isoform of CaMK4 that is associated with its localization to axons[J]. *J Com Neurol*, 2014, 522(2): 308-336.
- [15] KOKUBO M, NISHIO M, RIBAR T J, et al. BDNF-mediated cerebellar granule cell development is impaired in mice null for CaMK2 or CaMKIV[J]. *J Neurosci*, 2009, 29(28): 8901-8913.

(童颖丹 编辑)