

[14] 张晓梅, 高宇洁, 杨玲, 等. 谷氨酸棒杆菌中氨基酸分泌转运蛋白及其代谢改造研究进展[J]. 生物工程学报, 2020, 36(11): 2250-2259.

[15] 陈晓瑜, 陈峰, 张晨虹. 一株节食小鼠肠道优势鼠乳杆菌加速 DSS 致慢性结肠炎恢复[J]. 基因组学与应用生物学, 2021, 40(2): 855-866.

## Bdnf 基因过表达慢病毒载体的构建及表达\*

钟锦, 史晋朝, 张倩, 孟金凤, 张倩倩, 李建国<sup>△</sup>

(山西医科大学生理学系, 细胞生理学教育部重点实验室, 太原 030001)

**【摘要】目的:** 探讨脑源性神经营养因子(BDNF)基因过表达慢病毒载体的构建和包装,检测其在大鼠海马原代神经元中的表达。**方法:** 利用聚合酶链式反应(PCR)技术扩增 *Bdnf* 基因的 exons4 和 CDS 序列,将其克隆到 pcDNA3.1-mCherry 载体上,构建 pcDNA3.1-exons4-*Bdnf*-mCherry 慢病毒表达载体。重组质粒经 *KpnI* 和 *EcoRI* 双酶切鉴定和测序验证。使用三质粒包装系统将重组质粒 pcDNA3.1-exons4-*Bdnf*-mCherry 和慢病毒辅助包装质粒 pMDLg/pRRE、pRSV-Rev 和 pCMV-VSV-G 共转染 293T 细胞,制备并浓缩慢病毒颗粒,感染大鼠原代海马神经元,荧光显微镜和实时荧光定量 PCR 检测目的基因在原代海马神经元中的表达。**结果:** 成功构建 pcDNA3.1-exons4-*Bdnf*-mCherry 慢病毒过表达载体,转染后的 293T 细胞表达红色荧光,并在培养大鼠海马原代神经元中表达增加( $P<0.05$ )。**结论:** 成功构建含有特定转录本的 *Bdnf* 基因过表达慢病毒载体,为进一步深入研究 *Bdnf* 的作用提供技术基础。

**【关键词】** 脑源性神经营养因子; 慢病毒; 293T 细胞; 原代海马神经元; 基因表达; 细胞培养

**【KEY WORDS】** brain-derived neurotrophic factor; lentivirus; 293T cells; primary hippocampal neurons; gene expression; cell cultures

**【中图分类号】** Q189

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1000-6834(2024)01-013-004

**【DOI】** 10.12047/j.cjap.6280.2022.074

脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)是神经营养因子家族的成员,广泛表达于大脑的各个区域<sup>[1]</sup>。BDNF 影响神经元的增殖、分化、存活和死亡<sup>[1-3]</sup>。BDNF 由包括神经元在内的多种细胞分泌,可通过血脑屏障<sup>[4]</sup>。研究表明,大脑中的 BDNF 蛋白与精神障碍的发展有关<sup>[5]</sup>。*Bdnf* 基因具有多个外显子,每个外显子都有一个特定的启动子,以形成不同的转录本<sup>[6]</sup>。这些转录本被分选到神经元不同部位发挥作用<sup>[7]</sup>。对应激产生抵抗的大鼠海马中观察到 *Bdnf* 外显子 IV 表达的升高<sup>[8]</sup>。电休克疗法可以增加小鼠皮层中 *Bdnf* 外显子 I 和 IV 的表达,从而恢复由慢性应激引起的树突棘萎缩<sup>[9]</sup>。鉴于 *Bdnf* 的多个转录本及其特定功能,海马神经元不同的树突部位可与神经系统内不同神经元形成突触联系。抑郁症患者和抑郁模型动物海马脑区神经元树突萎缩、突触减少<sup>[10]</sup>。因此,明确不同 *Bdnf* 转录本在神经元内如何定位到特异的树突和突触部位,会为抗抑郁症研究提供新思路。为此,我们构建带红色荧光的过表达慢病毒载体 pcDNA3.1-exons4-*Bdnf*-mCherry,转染培养原代海马神经元后观察红色荧光在神经元中的定位,从而让特定 *Bdnf* 转录本在神经元内定位可视化。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

pcDNA3.1-mCherry 质粒由美国麻省 Whitehead 生物医学研究所惠赠,包装质粒 pMDLg/pRRE、pRSV-Rev 由洛桑联邦理工学院 Didier Tron 教授惠赠,包装质粒 pCMV-VSV-G 购自上海碧云天生物技术有限公司,所有 RT-PCR 试剂、PCR 试剂、T4 连接酶、DNA Ladder 购自 Takara 公司,引物的合成和基因测序均由上海生工生物工程股份有限公司完成,质粒抽提及胶回收试剂盒购自北京天根科技有限公司,转染试剂盒 Lipofectin3000 采用美国 Invitrogen 生物公司,*KpnI*、*EcoRI* 限制性内切酶购自美国 NEB 公司,Ampicillin 购自美国 Sigma 公司,Neurobasal、DMEM、Opti-MEM、胎牛血清、B27、胰酶 Trypsin-EDTA Solution 和青链霉素均购自 Gibco 公司,293T 细胞和大肠杆菌 DH5 $\alpha$  由本实验室保存。

### 1.2 引物的设计合成

依据 NCBI 数据库中大鼠 *Bdnf* 基因序列设计 PCR 引物,上下游引物分别加上 *KpnI* 和 *EcoRI* 限制性内切酶酶切位点,上游引物 5'-GTGGTACCAGCCACCATGTAAAGCGG-TAGCCGGCTGG 下游引物 5'-GGAATTCTCTCCCTTTTA-ATGGTCAGTGTACATAC。

### 1.3 原代海马神经元培养

新生 1~3 d SD 大鼠,75%酒精浸泡消毒后断头,取出脑组织置于含预冷 PBS 的培养皿中,在解剖显微镜下分离出海马,并去除脑膜和脉络丛,移入另一装有预冷 PBS 的培养皿

\*【基金项目】山西省基础研究计划面上项目(20210302123305)

【收稿日期】2022-02-25【修回日期】2022-09-28

<sup>△</sup>【通讯作者】Tel: 13935128325; E-mail: lijg@sxmu.edu.cn

中,收集全部海马碎片,置于含 0.25% 胰蛋白酶溶液的离心管中,将离心管放入 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中消化 15 min。收集全部海马碎片置于 10 ml 预暖 DMEM 培养基的离心管中,用 DMEM 洗 2~3 遍,以终止消化反应,加少量培养基于离心管中反复吹打 10~15 次,重悬细胞,根据细胞计数结果,调整细胞终浓度为  $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$  cells/ml,将细胞接种至经多聚赖氨酸铺板过夜处理的培养皿中,待 16 h 细胞贴壁后,更换为完全培养基,培养 36 h 后加入阿糖胞苷以抑制胶质细胞的分裂生长。

#### 1.4 重组表达载体 pcDNA3.1-exons4-Bdnf-mCherr 构建及鉴定

以大鼠海马组织 cDNA 为模板,通过上下游引物进行 PCR 扩增反应,反应条件为 95°C 5 min,98°C 10 s,60°C 1 min,72°C 1 min,共 30 个循环,最后再 72°C 延伸 10 min,PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,回收与目的基因大小的片段,进行测序。用限制性核酸内切酶 *KpnI* 和 *EcoRI* 酶切慢病毒载体 pcDNA3.1-mCherry 和测序正确的目的片段,酶切产物回收经 T4DNA 连接酶 17°C 连接过夜,重组质粒转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞,在 Ampicillin 平板上挑取阳性克隆,进行测序。

#### 1.5 含目的基因慢病毒的包装、制备及鉴定

将 293T 细胞接种于 6 孔板中 ( $1.2 \times 10^6$  cells/well),在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h,待细胞密度达到 95%~99% 可用于慢病毒包装。根据 Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent 使用说明,取两个 1.5 ml 离心管标记为 A 管和 B 管,在 A 管中加入 250  $\mu$ l Opti-MEM I 减血清培养基和 7  $\mu$ l Lipofectamine 3000 Transfection Reagent,在 B 管中加入 250  $\mu$ l Opti-MEM I 减血清培养基、6  $\mu$ l P3000 Enhancer Reagent、0.75  $\mu$ g 重组质粒和 2.25  $\mu$ g 辅助包装质粒混合物,将 A 管和 B 管的溶液混合后在室温下孵育 10~20 min。弃去 6 孔板内的多余培养基,使每孔培养基终体积为 1 ml,加入 AB 管混合溶液,在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 6 h,更换新鲜慢病毒包装培养基(94.8% 的 Opti-MEM,5% 的胎牛血清,0.2% 丙酮酸钠)培养 24 h 后,收集病毒上清于 15 cm 离心管中,放于 4°C,每孔重新加入 2 cm 新鲜慢病毒包装培养基继续培养 54 h,再次收集病毒上清,与第一次收集的病毒上清混合,在室温下 2 000 r/min 离心 10 min,使用 45  $\mu$ m 过滤器收集慢病毒上清进行病毒的纯化和分装。按倍比稀释法对病毒原液进行稀释后感染 293T 细胞。培养 72 h 后观察 293T 细胞 mCherry 的表达情况。提取 293T 细胞基因组 DNA,用特异引物进行 PCR 扩增,扩增产物为 *Bdnf* 基因的 exons4 和 CDS 序列部分,从电泳结果可见获得了一个长度为 1 111 bp 的 PCR 产物条带,其大小与预期理论值相符,证实慢病毒可以介导目的基因整合到感染细胞的染色体 DNA 中。

#### 1.6 海马原代神经元的感染及目的蛋白表达的鉴定

收集慢病毒上清液后感染培养至第 9 日的原代海马神经元,细胞分 3 组:海马神经元组,不含目的基因空载体慢病毒+海马神经元组;含 *Bdnf* 基因慢病毒+海马神经元组。培养 48 h 后,更换培养基,72 h 后用 Trizol 提取神经元中的总

RNA,紫外分光光度仪测定 RNA 的量,反转录成 cDNA 后,RT-PCR 检测 pcDNA3.1-mCherry 组和 pcDNA3.1-exons 4-*Bdnf*-mCherry 组中 *Bdnf* mRNA 的相对表达量。PCR 反应条件 98°C 10 s,60°C 5 s,72°C 1 min(35 个循环)。

#### 1.7 统计学处理

实验数据均采用平均值  $\pm$  标准误 ( $\bar{x} \pm s_x$ ) 来表示,采用 SPSS 25.0 统计学软件进行数据分析。两组之间比较采用非配对 *t* 检验。所有统计图均用 GraphPad Prism 8.0 软件绘制。

## 2 结果

### 2.1 重组表达载体 pcDNA3.1-exons 4-*Bdnf*-mCherr 构建及鉴定

以大鼠海马组织 cDNA 为模板,PCR 扩增产物在 1 000~1 500 bp 之间得到一条特异条带,与目的基因 1 111 bp 大小相等(图 1)。酶切后与 pcDNA3.1-mCherry (6 462 bp) 连接并转入大肠杆菌,挑选单克隆后提取质粒并测序,重组载体 pcDNA3.1-exons 4-*Bdnf*-mCherry 经过限制性核酸内切酶 *KpnI* 和 *EcoRI* 双酶切验证正确(图 2),DNA 测序结果经比对完全正确(图 3)。

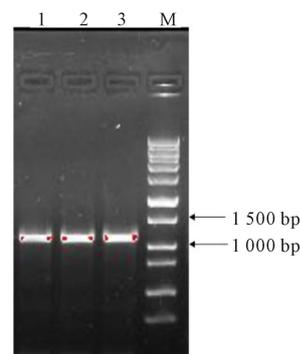


Fig. 1 PCR amplification products identification of target genes M: DNA marker; 1-3: exons4-*Bdnf* PCR product (1 111 bp)

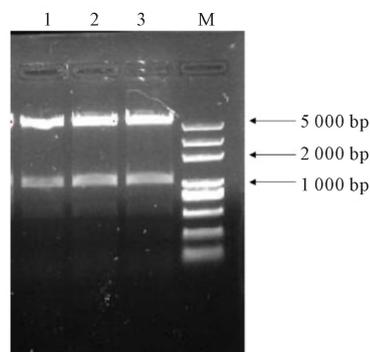


Fig. 2 Identification of recombinant clone vector pcDNA3.1-exons 4-*Bdnf*-mcherry digestion using restriction enzyme *KpnI* and *EcoRI* M: DNA Marker; 1-3: Product of digestion using restriction enzyme *KpnI* and *EcoRI*

```

Smith-Waterman(local)alignment
Upper line: DNAMAN6
Lower line: DNAMAN13
DNAMAN5:ENMAN13 1dneefly= 100.00% (774/774) GAP=0.00% (0/774)
637 ATGTTTCAGCAGGTGAGAAAGTGTGATGACCATCCCTTTTCTACTATGGTTATTTTCATAC
1 ATGTTTCAGCAGGTGAGAAAGTGTGATGACCATCCCTTTTCTACTATGGTTATTTTCATAC
697 TTCGGTTTCATGAGAGCTGCGCCCATGSAAGAGCAAAAGTCCACGGCAAGGCAACTTG
61 TTCGGTTTCATGAGAGCTGCGCCCATGSAAGAGCAAAAGTCCACGGCAAGGCAACTTG
757 GCTTACCAGCTGTGCGGACCCATGSAAGTCTGAGAGAGTGAATGAGCCAGGCGAGGT
121 GCTTACCAGCTGTGCGGACCCATGSAAGTCTGAGAGAGTGAATGAGCCAGGCGAGGT
817 TCGAGAGGTTGACGACGAGCTCCCTGGCTGACACTTTTGGACAGTGTATGAAAGAGCTG
181 TCGAGAGGTTGACGACGAGCTCCCTGGCTGACACTTTTGGACAGTGTATGAAAGAGCTG
677 CTGGATGAGGACCAAGAGGTTGCGCCACCAAGAAACCCATAAGGACCGGACTTGTAC
241 CTGGATGAGGACCAAGAGGTTGCGCCACCAAGAAACCCATAAGGACCGGACTTGTAC
937 ACTTCCCGGGTGTGCTCAGCAGTCAAGTCCCTTTGGAGCCTCCTCTGCTCTTTCTGCTG
301 ACTTCCCGGGTGTGCTCAGCAGTCAAGTCCCTTTGGAGCCTCCTCTGCTCTTTCTGCTG
997 GAGGAATACAAAATTACCTGGATGCGCCCAACATGCTCTATGAGGTTGCGGCGCACTCC
361 GAGGAATACAAAATTACCTGGATGCGCCCAACATGCTCTATGAGGTTGCGGCGCACTCC
1057 GACCCCGCCCGCCCTGGGAGCTGAGCGTGTGTGACAGTATTAGCGAGTGGGTCAACGCG
421 GACCCCGCCCGCCCTGGGAGCTGAGCGTGTGTGACAGTATTAGCGAGTGGGTCAACGCG

```

Fig. 3 Recombinant plasmids identified by sequencing

2.2 含目的基因逆转录病毒的包装、制备及鉴定

pcDNA3.1-exons 4-Bdnf-mCherry、pMDLg/pRRE、pRSV-Rev 和 pCMV-VSV-G 四质粒共转染 293T 细胞后 48 h, 荧光显微镜观察结果显示, 几乎所有的 293T 细胞均发出较高亮度红色荧光(图 4), 说明慢病毒载体感染效率高, 慢病毒包装成功。病毒上清超速离心后感染 293T 细胞, 培养 48 h 后提取细胞基因组 DNA, 采用特异引物进行 PCR 扩增, 扩增产物为 Bdnf 基因的 exons4 和 CDS 的序列部分, 1% 凝胶电泳显示, 空载体感染组未出现条带, pcDNA3.1-exons 4-Bdnf-mCherry 载体感染组在 1 000 bp 左右出现一条特异条带, 与理论值 1 111 bp 相符, 可以证实 Bdnf 基因的 exons4 和 CDS 的序列部分已经整合到 293T 细胞的染色体上(图 5)。

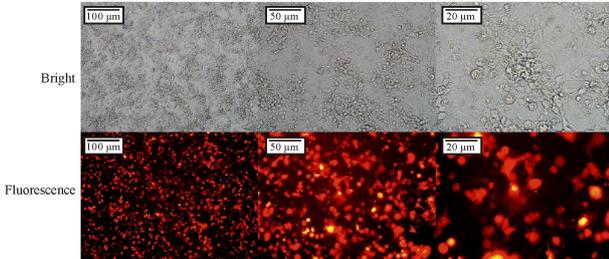


Fig. 4 Expression of mCherry in 293T cells after being infected by lentiviruses

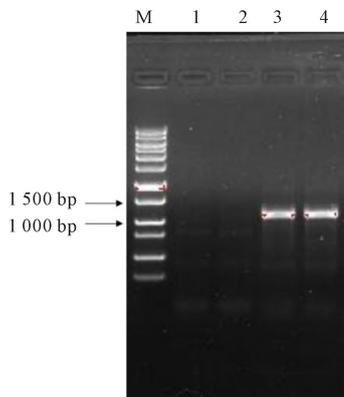


Fig. 5 Analysis of PCR products of exons 4-Bdnf gene amplified 293T cells transfected by retroviruses M: DNA Marker; 1 and 2: PCR products as the template of 293T cells; 3 and 4: PCR products as the template of transfected 293T cells

2.3 转染后目的基因在原代神经元表达的检测

慢病毒感染原代海马神经元, 72 h 后可见神经元中存在大量红色荧光, 感染率达到 80% 以上(图 6)。pcDNA3.1-mCherry 及 pcDNA3.1-exons 4-Bdnf-mCherry 感染原代海马神经元 72 h 后, qPCR 检测 Control 组、pcDNA3.1-mCherry 组和 pcDNA3.1-exons 4-Bdnf-mCherry 组中 Bdnf 基因的 mRNA 水平检测, 结果表明, pcDNA3.1-mCherry 组中 Bdnf 的表达与 Control 组无显著差异 ( $P > 0.05$ )。pcDNA3.1-exons 4-Bdnf-mCherry 组细胞中 Bdnf 的表达显著上调 ( $P < 0.01$ ), 表达量与 Control 组相比也显著提高 ( $P < 0.01$ )。表明原代海马神经元感染 pcDNA3.1-exons 4-Bdnf-mCherry 慢病毒后 Bdnf 的 mRNA 水平是有过表达效果的。

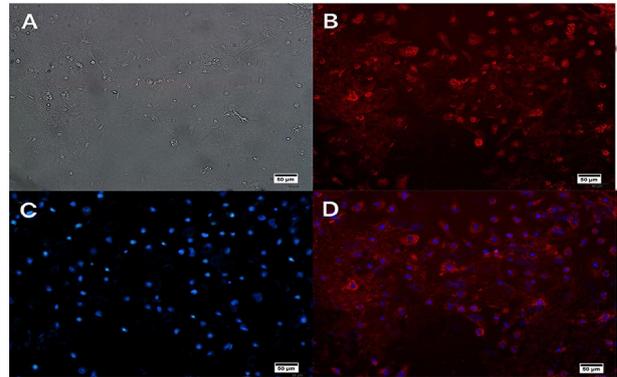


Fig. 6 Expression of GFP of neurons after being infected by lentiviruses

A: Bright; B: Fluorescence; C: DAPI; D: Merge

3 讨论

BDNF 的生物学作用最初是在神经系统发育过程中被发现的, 现已发现 BDNF 在神经系统中有多种作用, 包括调节突触连接、突触结构、神经递质释放和突触可塑性等。BDNF 分泌到突触中, 从而激活原肌球蛋白受体激酶 B (TrkB) 和下游信号通路, 有助于与突触可塑性和认知功能至关重要的基因转录。研究发现, BDNF 的生物合成和分泌可以发生在神经元的不同位置, BDNF 不仅与 TrkB 受体的选择性群体相互作用发挥下游效应, 而且与定位在神经元不同位置的其他 BDNF 受体和辅助受体(截短的 TrkB、p75、SorCS2 和 Slitrk5) 的阵列结合发挥作用, 从而允许单一生长因子的多水平调节<sup>[11-13]</sup>。

BDNF, 包括其多个转录本, 已在许多研究中证明与精神障碍有关。例如, 应激可诱导大鼠异常行为, 伴随着 Bdnf 外显子 IV 转录水平降低, 从而降低海马 BDNF 表达<sup>[14, 15]</sup>。应激还可以通过其他大脑区域影响特定 Bdnf 转录本的表达。例如, 患有产前抑郁的雄性大鼠(而非雌性大鼠)在内侧前额叶(mPFC) 中的 Bdnf 外显子 IV 的转录水平降低<sup>[16]</sup>。应激源可以影响不同 Bdnf 基因多个转录本的水平。例如, 产前约束应激降低成年大鼠额叶皮层和海马中 Bdnf 转录本(III、IV、VI 和 IX) 的表达<sup>[17]</sup>。慢性束缚应激导致大鼠海马 Bdnf 外显子 IV 表达减少<sup>[18]</sup>。此外, 在大鼠中, 单一的固定应激可以下调 Bdnf 外显子 I 和 IV<sup>[19]</sup>。Nestler 及其同事发现, 社

交失败的压力可以诱发抑郁症样行为,并减少小鼠海马中的 *Bdnf III* 和 *IV* [20]。抗抑郁药的长期治疗可以逆转 BDNF 的减少。例如,雌性大鼠,而不是雄性大鼠,在经历母婴分离 (MS)后,mPFC 中 *Bdnf IV* 的表达水平下降[21]。

然而,由于 BDNF 的基础水平较低,加之 BDNF 是由具有时空特性的 11 种不同转录本翻译,所以,内源性 BDNF 在动物脑内的具体定位难以研究。本研究构建只含有一种转录本的大鼠 *Bdnf* 基因的慢病毒载体 pcDNA3.1-exons 4-*Bdnf*-mCherr,成功转染神经元并翻译带有神经元定位功能的荧光 BDNF。为研究神经元中 *Bdnf* 基因不同转录本的定位和翻译的时空特性及机制提供稳定的细胞转染载体。

综上,本实验成功构建含有特定转录本的 *Bdnf* 基因过表达慢病毒载体,为深入研究 BDNF 的作用提供技术基础。

### 【参考文献】

- [1] Chao MV. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2003, 4(4): 299-309.
- [2] Vilar M, Mira H. Regulation of neurogenesis by neurotrophins during adulthood: Expected and unexpected roles [J]. *Front Neurosci*, 2016, 10: 26.
- [3] Numakawa T, Odaka H, Adachi N. Actions of brain-derived neurotrophin factor in the neurogenesis and neuronal function, and its involvement in the pathophysiology of brain diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(11): 3950.
- [4] Pan W, Banks WA, Fasold MB, et al. Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier [J]. *Neuropharmacology*, 1998, 37(12): 1553-1561.
- [5] Martinowich K, Manji H, Lu B. New insights into BDNF function in depression and anxiety [J]. *Nat Neurosci*, 2007, 10(9): 1089-1093.
- [6] Aid T, Kazantseva A, Piirsoo M, et al. Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited [J]. *J Neurosci Res*, 2007, 85(3): 525-535.
- [7] Hing B, Sathyaputri L, Potash JB. A comprehensive review of genetic and epigenetic mechanisms that regulate BDNF expression and function with relevance to major depressive disorder [J]. *Am J Med Genet B*, 2018, 177(2): 143-167.
- [8] Benatti C, Radighieri G, Alboni S, et al. Modulation of neuroplasticity-related targets following stress-induced acute escape deficit [J]. *Behav Brain Res*, 2019, 364: 140-148.
- [9] Maynard KR, Hobbs JW, Rajpurohit SK, et al. Electroconvulsive seizures influence dendritic spine morphology and BDNF expression in a neuroendocrine model of depression [J]. *Brain Stimul*, 2018, 11(4): 856-859.
- [10] Roddy DW, Farrell C, Doolin K, et al. The Hippocampus in depression: More than the sum of its parts? Advanced hippocampal substructure segmentation in depression [J]. *Biol Psychiat*, 2019, 85(6): 487-497.
- [11] Dorsey SG, Renn CL, Carim-Todd L, et al. *In vivo* restoration of physiological levels of truncated TrkB. T1 receptor rescues neuronal cell death in a trisomic mouse model [J]. *Neuron*, 2006, 51(1): 21-28.
- [12] Woo NH, Teng HK, Siao CJ, et al. Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression [J]. *Nat Neurosci*, 2005, 8(8): 1069-1077.
- [13] Song M, Giza J, Proenca CC, et al. Slitrk5 mediates BDNF-dependent TrkB receptor trafficking and signaling [J]. *Dev Cell*, 2015, 33(6): 690-702.
- [14] Niknazar S, Nahavandi A, Peyvandi AA, et al. Effect of maternal stress prior to conception on hippocampal BDNF signaling in rat offspring [J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(8): 6436-6445.
- [15] Roth TL, Zoladz PR, Sweatt JD, et al. Epigenetic modification of hippocampal *Bdnf* DNA in adult rats in an animal model of post-traumatic stress disorder [J]. *J Psychiatr Res*, 2011, 45(7): 919-926.
- [16] Blaze J, Asok A, Borrelli K, et al. Intrauterine exposure to maternal stress alters *Bdnf IV* DNA methylation and telomere length in the brain of adult rat offspring [J]. *Int J Dev Neurosci*, 2017, 62: 56-62.
- [17] Dong E, Dzitoyeva SG, Matrisciano F, et al. Brain-derived neurotrophic factor epigenetic modifications associated with schizophrenia-like phenotype induced by prenatal stress in mice [J]. *Biol Psychiat*, 2015, 77(6): 589-596.
- [18] Seo MK, Kim YH, McIntyre RS, et al. Effects of antipsychotic drugs on the epigenetic modification of brain-derived neurotrophic factor gene expression in the hippocampi of chronic restraint stress rats [J]. *Neural Plast*, 2018, 2018: 2682037.
- [19] Fuchikami M, Morinobu S, Kurata A, et al. Single immobilization stress differentially alters the expression profile of transcripts of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene and histone acetylation at its promoters in the rat hippocampus [J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2009, 12(1): 73-82.
- [20] Tsankova NM, Berton O, Renthal W, et al. Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action [J]. *Nat Neurosci*, 2006, 9(4): 519-525.
- [21] Blaze J, Asok A, Roth TL. Long-term effects of early-life caregiving experiences on brain-derived neurotrophic factor histone acetylation in the adult rat mPFC [J]. *Stress*, 2015, 18(6): 607-615.