

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00387

水通道蛋白4在小鼠嗅觉系统中的表达及功能

李小松^{1,2}, 唐玲³, 汪克建^{1,2}, 骆世芳^{1,2}, 侯良娟^{1,2}, 孙善全^{1,2}, 冉建华^{1,2*}

1. 重庆医科大学基础医学院解剖学教研室, 重庆 400016
2. 重庆医科大学神经科学研究中心, 重庆 400016
3. 重庆医科大学附属永川医院神经内科, 重庆 402161

[摘要] **目的** 研究水通道蛋白4(aquaporin 4, AQP4)在小鼠嗅觉系统中的表达及功能。**方法** 应用免疫荧光和免疫印迹技术研究野生型和 AQP4 基因敲除小鼠嗅觉系统中 AQP4 的表达差异;采用埋藏食物小球实验、嗅觉迷宫实验两种嗅觉行为学方法以及气体刺激性嗅觉电位记录(electroolfactogram, EOG)检测两组小鼠嗅觉功能的差异。**结果** 免疫荧光和免疫印迹结果均证实了 AQP4 基因敲除小鼠嗅觉系统中没有 AQP4 的表达。免疫荧光结果表明 AQP4 主要分布于嗅黏膜上皮层中支持细胞膜、Bowmann's 腺管上皮细胞膜以及基底细胞膜上,还分布于嗅黏膜固有层中 Bowman's 腺上皮细胞膜、嗅神经束周围的嗅鞘细胞膜,以及嗅球的嗅神经层和小球层。行为学检测结果显示,埋藏食物小球实验和嗅觉迷宫实验中除对照实验外,野生型和 AQP4 基因敲除小鼠在所有测试时间点的差异具有统计学意义($P < 0.05$)。气体刺激性诱发电位结果发现,两组小鼠嗅黏膜在不同气压强度饱和三甲胺(trimethylamine)作用下的嗅觉电位波形相似,波幅均随气压的逐渐增加而增大;而在相同气压作用下, AQP4 基因敲除小鼠嗅觉电位的波幅低于野生型小鼠,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** AQP4 广泛分布于嗅觉系统包括嗅黏膜、嗅神经和嗅球的多个部位,其可能具有保护嗅神经束和促进神经信号传递的作用。

[关键词] 水通道蛋白4;基因敲除;嗅觉;嗅黏膜;嗅神经;嗅球

[中图分类号] R 765.63 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)04-0387-06

Expression and function of aquaporin-4 in olfactory system of mice

LI Xiao-song^{1,2}, TANG Ling³, WANG Ke-jian^{1,2}, LUO Shi-fang^{1,2}, HOU Liang-juan^{1,2}, SUN Shan-quan^{1,2}, RAN Jian-hua^{1,2*}

1. Department of Anatomy, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China
2. Neuroscience Research Center, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China
3. Department of Neurology, Affiliated Yongchuan Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 402161, China

[Abstract] **Objective** To investigate the expression and function of aquaporin-4(AQP4) in the olfactory system of mice. **Methods** The differences of AQP4 expression in olfaction system between wild-type and AQP4-null mice were studied by immunoblotting and immunofluorescence methods. The differences of mouse olfactory functions in the two groups were examined by two olfactory behavioral assays: the buried food pellet test and olfaction maze test, and the odorant-stimulated electroolfactogram (EOG) recording. **Results** The results of immunoblotting and immunofluorescence showed no AQP4 expression in the olfactory system in AQP4-null mice. Immunofluorescence result also indicated that AQP4 was mainly distributed in the membrane of support cells, duct cells of Bowmann's gland, basal cells of olfactory epithelium, membrane of Bowmann's gland epithelial cells, olfactory sheath cells surrounding the olfactory bundles, and the membrane of cells in the olfactory bundle layer and glomerular layer. The results of olfactory behavioral assay were significantly different between the two groups at all time points tested in both the olfaction maze test and the buried food pellet test ($P < 0.05$). It was showed that the EOGs under different pressures of saturated trimethylamine had a similar shape in both groups, and the amplitude of EOGs increased with the increase of pressure. While under the same pressure, the EOG amplitude of AQP4-null mice was significantly lower than that of wild-type mice($P < 0.05$). **Conclusion** AQP4 is widely distributed in the olfactory system of mice, including the olfactory mucosa, olfactory nerve, and olfactory bulb, which can protect the olfactory neural bundle and facilitate neural signal transfer.

[Key words] aquaporin4; gene knockout; olfaction; olfactory mucosa; olfactory nerve; olfactory bulb

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(4):387-392]

[收稿日期] 2010-10-12 **[接受日期]** 2011-02-28

[基金项目] 国家自然科学基金(30470608, 30500171), 重庆市科委项目(CSTC2010BB5098). Supported by National Natural Science Foundation of China(30470608, 30500171) and Project of Chongqing Science and Technology Committee(CSTC2010BB5098).

[作者简介] 李小松, 硕士生. E-mail: lxs_fly@sina.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 023-68175549, E-mail: ranjianhua2003@yahoo.com.cn

水通道蛋白 4(aquaporin-4, AQP4)是中枢神经系统中含量最丰富的水通道蛋白家族成员,主要分布于中枢神经系统中液体转运有关的软脑膜、室管膜细胞基底外侧膜及其深面的胶质细胞膜上,同时还在毛细血管周围的星形胶质细胞终足上呈极性分布^[1-4]。基因敲除小鼠的相关研究证实,AQP4除了参与脑组织水转运和胶质细胞迁移外,还在神经兴奋性的调节,尤其是听觉性脑干反应、视网膜电位的维持、皮质扩散性抑制等神经电生理活动中发挥重要作用^[5-7]。尽管 AQP4 并非直接表达于兴奋性细胞膜上(脑组织中的神经元、视网膜双极细胞、内耳毛细胞等),但其广泛表达于相关的支持细胞膜上(包括脑胶质细胞、视网膜 Müller 细胞、内耳 Claudius 细胞等),通过改变细胞间隙中 K⁺ 的缓冲及容积间接参与神经兴奋性的调节^[8-9]。近年来有研究报道 AQP4 在大鼠嗅觉系统中的支持细胞、基底细胞膜上表达,但对于其具体功能尚缺乏研究^[10-11]。Lu 等^[12]发现,AQP4 敲除可引起小鼠的嗅觉障碍,但该研究仅对 AQP4 在鼻腔中的分布进行了检测,缺乏从外周到中枢的系统性研究。因此,本研究通过免疫荧光和免疫印迹技术、嗅觉行为学检测,气体刺激性嗅觉电位(electroolfactogram, EOG)记录等方法比较野生型和 AQP4 基因敲除小鼠嗅觉系统中 AQP4 的表达模式及嗅觉的差异,探讨 AQP4 在嗅觉系统中的表达情况及功能。

1 材料和方法

1.1 实验动物选择及喂养 8~12 周龄、体重匹配、雌雄不限的野生型和 AQP4 基因敲除小鼠各 9 只(CD1),由 Alan S. Verkman 教授(University of California, San Francisco, UCSF)馈赠。小鼠身体匀称,运动灵活,皮毛光滑,对外界反应敏感,无搔鼻动作及打喷嚏现象,自由饮水及进食,12 h 照明/12 h 黑暗。

1.2 仪器设备和实验试剂 荧光显微镜(Leica, 德国),蛋白电泳仪、蛋白电转仪(Bio-Rad, 美国),MP100 数据收集系统(Biopac Systems, 美国)。rAQP4 抗体(Millipore, 美国),goat-OMP 抗体(Millipore, 美国),Texas 红驴抗兔荧光二抗(Jackson Laboratory, 美国),FITC 驴抗山羊荧光二抗(Millipore, 美国),RIPA 裂解液(Sigma, 美国)。

1.3 小鼠嗅觉系统中 AQP4 的检测

1.3.1 免疫荧光检测 取野生型和 AQP4 基因敲除小鼠各 3 只,麻醉后采用左心室生理盐水冲洗及 4%多聚甲醛灌注固定后断头,将去除头皮和皮下组织后保留鼻骨到前囟的标本置入 4%多聚甲醛后固

定 24 h,随后经 5%(体积比)硝酸脱钙 48~72 h(避光脱钙以防止硝酸见光分解),常规石蜡包埋,取作连续冠状切片,片厚 6 μm。石蜡切片经二甲苯和梯度乙醇脱蜡水化后,采用 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)修复抗原,山羊血清工作液以封闭非特异性结合位点,37℃ 30 min;滴加 rAQP4 抗体(1:500)和 goat-OMP 抗体(1:500),4℃ 过夜;0.01 mol/L PBS 漂洗后,滴加混合的荧光二抗(1:200),37℃ 孵育 1 h;0.01 mol/L PBS 漂洗彻底后,用含 DAPI 的甘油封片,荧光显微镜下观察结果。

1.3.2 免疫印迹检测 野生型和 AQP4 基因敲除小鼠各 3 只麻醉断头后正中矢状切暴露两侧鼻腔,收集上、中鼻甲及鼻中隔上份的黏膜经 PBS 漂洗后,加入裂解液研磨至组织无肉眼可见碎片(冰上操作),吸取组织悬液至 EP 管中,用 200 μl 裂解液冲洗研磨器 2 次,共 600 μl 组织悬液离心 12 000×g,30 min,4℃;取上清并测定蛋白浓度。将备好的样品按每泳道 60 μg 蛋白上样于 10% SDS-PAGE gels (Invitrogen),加入电泳缓冲液,120 mV,2.5 h;按常规电转移步骤将蛋白转至 PVDF 膜;经 5%的脱脂牛奶封闭 1 h 后,用 5% BSA/TBST 缓冲液稀释的 rAQP4 多克隆抗体(稀释度为 1:1 000)和 β-actin 抗体(稀释度为 1:1 000)孵育 2 h;TBST 漂洗后用 5%的脱脂牛奶/TBST 缓冲液稀释的二抗(浓度为 1:10 000)孵育 1 h;TBST 漂洗后 ECL 避光孵育 15 min 后,用保鲜膜完全包裹免疫印迹膜,去除皱褶。用胶带将免疫印迹膜固定在暗盒内,蛋白带面向上,暗房内压 X 线胶片,曝光、显影、冲洗。

1.4 行为学测试

1.4.1 埋藏食物小球实验(buried food pellet test) 参照经典的方法^[13]测试。采用大小一致的新鲜鼠料(0.5 g),以减少外源性食物味道的干扰。测试前 3 d 限制小鼠(野生型和 AQP4 基因敲除小鼠各 9 只)进食,给予鼠料(每只小鼠每天 0.2 g),自由饮水;同时这 3 d 内在固定时间将单只小鼠分别置入测试时采用的鼠笼(45 cm×24 cm×20 cm)中熟悉环境 10 min。随后连续 3 d 在固定时间进行测试。测试前将 0.5 g 的食物小球埋藏在测试笼的鼠料表面以下 5 cm 处并随机更换置放食物小球的位置,记录方法是从小鼠进入测试笼内开始到小鼠用前爪抓住食物小球并啃噬时中止,等小鼠吃完食物后再将其放回原先的鼠笼中。休息 4 h 后,将食物小球随机置放在测试笼鼠料表面不同位置,重复实验作为对照。所有实验以 300 s(5 次测试的平均值)内未找到食物小球定为嗅觉丧失。

1.4.2 嗅觉迷宫实验(olfaction maze test) 参考

Lu等方法^[12]自制了圆形迷宫,其中等分为6个小格,将测试用的新鲜鼠料(0.5 g)随机放置在小鼠不能直接看见的小格后面而仅靠其嗅觉才能找到。测试前3 d同埋藏食物小球实验相似,限制小鼠饮食并连续3 d在固定时间放入迷宫中适应环境,随后连续3 d在固定时间进行正式的测试。实验时,小鼠首先被放置在迷宫的中间,记录小鼠进入迷宫内到用前爪抓住食物小球并啃噬的时间,以300 s(5次测试的平均值)内未找到食物小球定为存在嗅觉功能障碍。等小鼠吃完食物后再将其放回笼中,并取出食物残渣和小鼠的排泄物,用70%的乙醇和水清洁迷宫防止对后面测试的干扰。阳性对照是将食物小球放置于小格之外,小鼠能够直接看见的位置。

1.5 嗅觉电位测试 将完成行为学测试的小鼠(野生型和AQP4基因敲除小鼠各3只)用3.5%水合氯醛(350 mg/kg)腹腔麻醉,断头去除头皮和皮下组织后正中矢状切暴露两侧鼻腔,放于自制的密闭容器中固定。密闭容器一侧有两个进口,第一个进口连接持续送入湿化空气的开关,第二个进口连接含有饱和三甲胺并有电控开关控制流量的玻璃罐,其另一侧的出口连接真空抽吸的接口。采用表面涂有特氟隆(Teflon)绝缘层的银针电极置入预先拉制的填充有1%琼脂糖的玻璃电极中并插到中、上鼻甲的黏膜内作为记录电极,接地电极放置于小脑中。相应参数设置如下:通过电控开关给予不同气体压力强度的饱和三甲胺,每次加压持续时间约0.2 ms,采用MP100数据收集系统收集数据。给予不同气体压力的空气作为阴性对照。

1.6 统计学处理 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SAS 11.0软件进行重复测量数据的单因素方差分析和配对 t 检验进行比较,检验水平(α)为0.05。

2 结果

2.1 免疫荧光检测结果 野生型和AQP4基因敲除小鼠鼻腔嗅黏膜和嗅球中红色荧光标记rAQP4和绿色荧光标记goat-OMP的表达结果见图1和图2。图1中AQP4基因敲除小鼠整个嗅黏膜中没有红色荧光分布(图1E和1F),而在嗅黏膜上皮层中可见重叠排列且细胞质呈绿色荧光的嗅神经元表达,其向鼻腔内伸出绿色细条状的树突末端膨大为嗅泡,后者发出的嗅丝在嗅黏膜表面相互连接呈线状或者点状绿色荧光分布;在嗅黏膜固有层中亦可见聚集成团、大小不一发绿色荧光的嗅神经束(图1D和1F)。野生型小鼠嗅黏膜上皮层中OMP阳性

呈绿色荧光的嗅神经元表达特征与AQP4基因敲除小鼠相似(图1A和1C);广泛分布于整个上皮层的红色荧光在不同部位的表达强度不同(图1B和1C),其中位于上皮层和固有层交界处的基底细胞膜以及起自固有层贯穿上皮层达到嗅黏膜表面的Bowman's腺管上皮细胞膜表达强烈,而在固有层中部不规则分布于嗅神经元周围以及在固有层顶部对称刷状分布的支持细胞膜上表达为中等强度。嗅黏膜固有层中AQP4表达强烈,部分表达较强的红色荧光分布在结缔组织中腺腔样结构的周围,即Bowman's腺上皮细胞膜上;部分表达较强的红色荧光呈不规则三角形和梭形紧紧包绕在直径大小不一的绿色嗅神经束周围(图2A)。在嗅神经穿过筛骨水平板进入嗅球的过程中可见绿色的嗅神经纤维中夹杂着线形或丝状的红色荧光(图2B)。对嗅球的观察发现(图2C),野生型和AQP4基因敲除小鼠中进入嗅球的OMP阳性呈绿色荧光的嗅神经聚集成最外侧的嗅神经层,随后进入小球内换元后中止;AQP4基因敲除小鼠在整个嗅球中未见红色荧光分布,而野生型小鼠的红色荧光少数呈丝状夹杂于嗅神经层中,多数在小球中强烈表达于发绿色荧光嗅神经的周围,另外还有少量红色荧光分布于嗅球中间数层的毛细血管周围。

2.2 免疫印迹检测结果 野生型小鼠嗅黏膜组织中可检测到相对分子质量34 000的阳性条带,而AQP4基因敲除小鼠嗅黏膜组织液未见相应条带(图3)。

2.3 行为学测试结果 由图4中埋藏食物小球实验结果可见,野生型小鼠在连续3 d的测试中寻找食物的平均时间分别为32、28和26 s,而AQP4基因敲除小鼠3 d寻找到食物的平均时间则为61、48和45 s;对照实验中野生型和AQP4基因敲除小鼠寻找到食物的平均时间分别为19 s和23 s。所有测试中野生型和AQP4基因敲除小鼠寻找食物的平均时间差异有统计学意义($P < 0.05$),而对照实验间的差异无统计学意义。由图4中嗅觉迷宫实验结果可见,野生型小鼠3 d寻找到食物的平均时间分别为43、33和28 s,而AQP4基因敲除小鼠3 d寻找到食物的平均时间则为72、58和37 s;阳性对照中野生型和AQP4基因敲除小鼠寻找到食物的平均时间分别为20和24 s。其中,所有测试中野生型和AQP4基因敲除小鼠寻找食物的平均时间差异有统计学意义($P < 0.05$),而对照实验中差异无统计学意义。

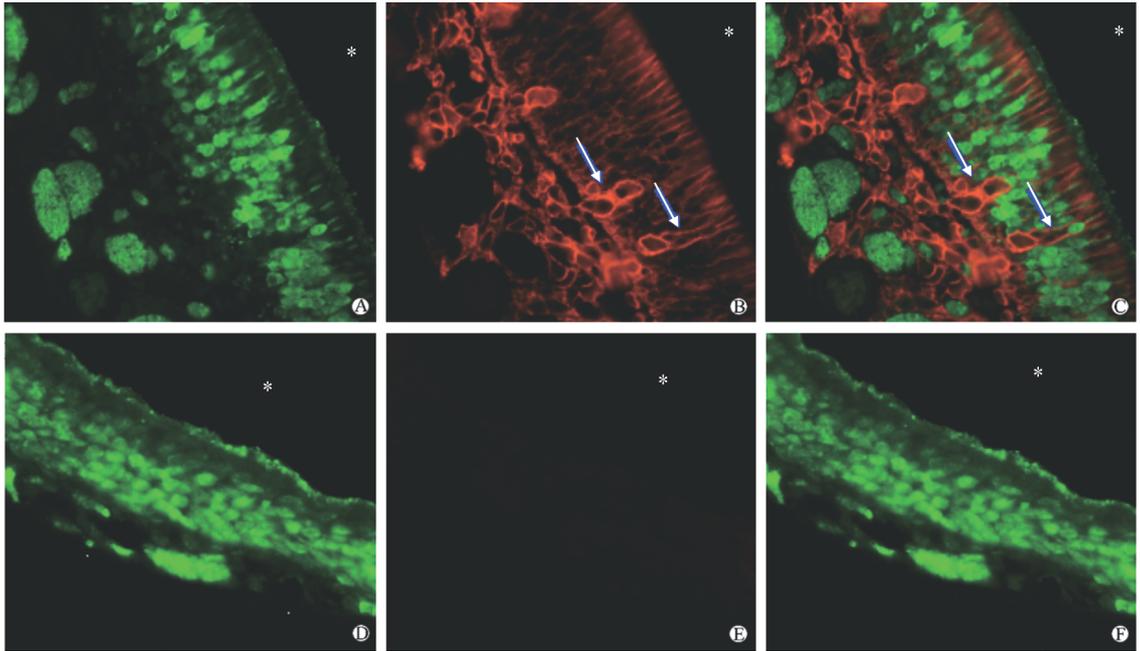


图 1 AQP4 在小鼠嗅黏膜中的表达

Fig 1 AQP4 expression in olfactory mucosa of mice

A-C: Olfactory epithelium of wild-type mouse; D-E: Olfactory epithelium of AQP4-null mouse. A, D: OMP (ORN marker, green) immunofluorescence; B, E: AQP4 (red) immunofluorescence; C, F: Double-labeling of OMP and AQP4. Arrows indicate the duct cells of the Bowman's gland; * the nasal cavity. Original magnification: $\times 400$

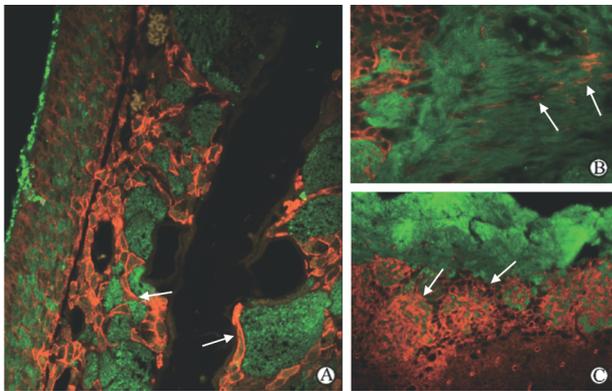


图 2 AQP4 在野生型小鼠嗅黏膜、嗅神经束和嗅球中的表达

Fig 2 AQP4 expression in olfactory mucosa, olfactory nerve fiber bundles and olfactory bulb of wild-type mouse

Goat-OMP is green, rAQP4 was red. A: AQP4 expression in the olfactory mucosa; B: AQP4 expression in the olfactory nerve fiber bundles; C: AQP4 in the olfactory bulb. Arrows indicate the positive staining of AQP4. Original magnification: $\times 400$

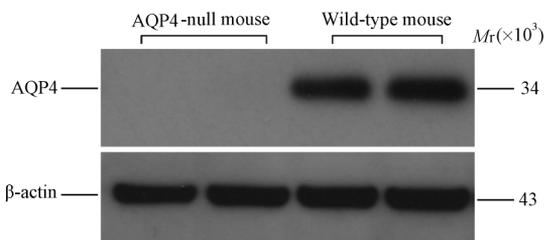


图 3 AQP4 在野生型小鼠和 AQP4 敲除小鼠中的表达

Fig 3 AQP4 expression in wild-type mouse and AQP4-null mouse as determined by Western blotting analysis

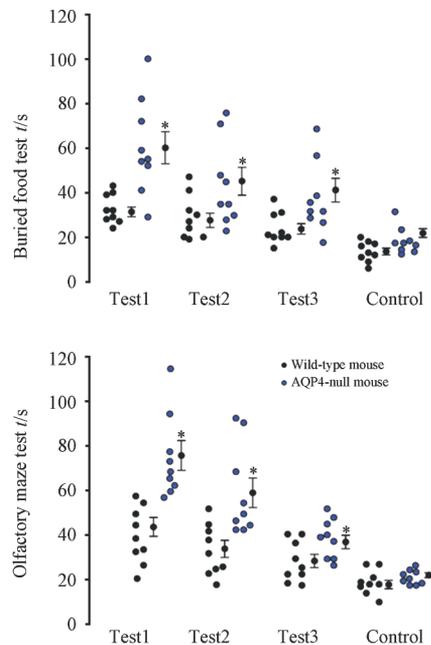


图 4 野生型和 AQP4 敲除小鼠嗅觉行为学测试结果

Fig 4 Olfactory test results in wild-type and AQP4-null mice

* $P < 0.05$ between wild-type and AQP4-null mouse

2.4 嗅觉电位测试结果 野生型和 AQP4 基因敲除小鼠的嗅黏膜在给予不同气体压力强度的饱和三甲胺作用后,均可记录到先负后正的嗅觉电位;在不同气压作用下,野生型小鼠和 AQP4 基因敲除小鼠嗅觉电位的波幅形态相似,并均随气压的逐渐增加

而增大;而在相同气压作用下,野生型小鼠嗅觉电位的波幅较 AQP4 基因敲除小鼠明显增大。在同等条件下给予不同压力的空气作用作为对照,均未能记录到嗅觉电位。具体结果见图 5。

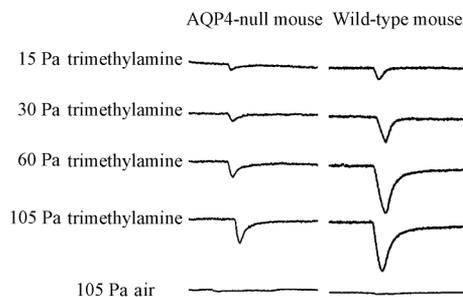


图 5 野生型小鼠和 AQP4 基因敲除小鼠刺激性嗅觉电位 (EOG) 检测结果

Fig 5 Electroolfactogram (EOG) results of wild-type and AQP4-null mice

3 讨论

鼻腔嗅上皮层内局部水、电解质微环境的稳定对于嗅质的及时清除、嗅神经元功能活性的维持至关重要^[11]。AQP4 具有特异性转运水分子的功能,在神经系统多种胶质样支持细胞膜上分布,参与神经兴奋性的调节,而 AQP4 在嗅觉系统中的表达模式以及其对嗅觉信号形成和传递的影响还缺乏系统研究。因此,本研究采用免疫印迹和免疫荧光方法检测 AQP4 在嗅觉系统中的表达特征,以及埋藏食物小球和嗅觉迷宫实验等嗅觉行为学实验和嗅觉电位 (EOG) 评价野生型和 AQP4 基因敲除小鼠的嗅觉功能差异,探讨 AQP4 在嗅觉系统中表达的功能意义。

免疫印迹结果显示,野生型小鼠嗅黏膜组织液中可检测到相对分子质量为 34 000 的 AQP4 表达,而 AQP4 基因敲除小鼠嗅黏膜组织液中未能检测到相应条带,提示实验动物的可靠性。野生型小鼠嗅觉系统的免疫荧光结果表明,AQP4 广泛分布于包括嗅黏膜、嗅神经束和嗅球在内的多个部位。其中,AQP4 在嗅黏膜上皮层中的基底细胞、Bowman's 腺管上皮细胞和支持细胞膜上以及嗅黏膜固有层中 Bowman's 腺上皮细胞膜的分布特征与以往的报道相一致^[10-12],提示 AQP4 可能具有维持嗅神经元兴奋性、参与嗅上皮更新和修复的生理作用。除此以外,本研究首次发现在嗅黏膜固有层中嗅神经束周围有大量不规则三角形和梭形结构上 AQP4 表达强

烈,在嗅神经束穿过筛骨水平板时可见线状或丝状的 AQP4 阳性表达,以及嗅球的嗅神经层中呈线状或丝状的 AQP4 阳性表达,小球中 AQP4 呈强烈的团块状表达于嗅神经轴突末端的周围,在嗅球中间数层中毛细血管周围亦可见 AQP4 散在的表达。嗅鞘细胞是起自嗅黏膜包绕在嗅神经周围引导其进入小球中进行初次换元的胶质样细胞,AQP4 的表达提示其可能在嗅神经的再生和嗅觉信号的传递过程中发挥作用^[14-15]。值得注意的是,AQP4 在小球中的强烈表达提示其可能表达于突触周围的星形胶质细胞膜上,作为谷氨酸感受器调节局部毛细血管的灌注,影响神经元的功能活动,从而影响嗅觉信号的传递^[16]。

形态学研究发现 AQP4 广泛分布于嗅觉系统中嗅黏膜、嗅神经束和嗅球的多种细胞膜上,而 AQP4 的分布是否与嗅觉信号的形成和传递有关是值得关注的问题,因此本研究进行了嗅觉行为学的检测。为了避免行为学实验主观性强的缺点,本研究除在实验中保证双盲的前提下,还对野生型和 AQP4 基因敲除小鼠采用两种经典的行为学方法进行验证。埋藏食物小球和嗅觉迷宫实验结果显示,在测试过程中,野生型和 AQP4 基因敲除小鼠寻找食物的时间均随测试天数的增加而逐渐下降,并且两组之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$);而对照实验之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$),这与 Lu 等^[12]的结果相一致。由于本项实验在测试前对各组小鼠均进行了环境适应的训练,因此两种实验中各组小鼠均表现出寻找食物时间减少的趋势可能与小鼠的学习记忆等高级皮质功能有关;而两种实验连续 3 d 的测试结果均与对照实验存在明显差异,同时在同一测试时间点上野生型和 AQP4 基因敲除小鼠寻找食物时间也存在明显差异,这反映了 AQP4 蛋白表达对于嗅觉功能的影响。所有实验结果均未出现大于 300 s 以上的结果,提示未发现动物有嗅觉功能的完全丧失。而两种实验结果均发现 AQP4 基因敲除小鼠在所有测试过程中寻找食物的时间均较野生型小鼠延长,一方面证实本研究采用实验方法的稳定性和可靠性,同时提示 AQP4 基因敲除小鼠具有一定程度的嗅觉障碍,而并非是嗅觉功能的完全丧失。

嗅觉电位 (EOG) 是一种在基础和临床研究中广泛用于嗅觉评价的客观方法,主要包括电刺激性和气体刺激性^[17]。气体刺激性嗅觉诱发电位主要是反映嗅黏膜中部分成熟嗅神经元产生的电流。本研究

中野生型小鼠和 AQP4 基因敲除小鼠在不同压力的空气作用后均未能记录到嗅觉电位,排除了气流等因素的干扰,提示本实验系统的可靠性;不同气体压力强度的饱和三甲胺作用在两组间的变化趋势一致,嗅觉电位的波幅形态相似,均随气压的逐渐增加而增大;而在相同气压作用下,野生型小鼠嗅觉电位的波幅比 AQP4 基因敲除小鼠明显增大,这一结果与嗅觉行为学测试中检测到的 AQP4 基因敲除小鼠嗅觉敏感性下降相一致,可部分解释两组间小鼠行为学上的差异;但由于 AQP4 在整个嗅觉信号通路中分布广泛,而气体刺激性嗅觉诱发电位只能反映嗅黏膜中成熟神经元的功能,不能反映嗅觉信号向嗅球乃至更高级中枢等后续传递过程的完整性,因此还不能完全排除 AQP4 在其他部位表达对于嗅觉信号形成和传递过程的影响,尤其是 AQP4 在嗅鞘细胞和嗅球中表达的功能意义及其分子机制还需要进一步的实验加以研究。

[参考文献]

- [1] Zhao M, Valamanesh F, Celerier I, Savoldelli M, Jonet L, Jeanny J C, et al. The neuroretina is a novel mineralocorticoid target: aldosterone up-regulates ion and water channels in Müller glial cells[J]. *FASEB J*, 2010, 24: 3405-3415.
- [2] Rossi A, Pisani F, Nicchia G P, Svelto M, Frigeri A. Evidences for a leaky scanning mechanism for the synthesis of the shorter M23 protein isoform of aquaporin-4: implication in orthogonal array formation and neuromyelitis optica antibody interaction [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285: 4562-4569.
- [3] Yukutake Y, Hirano Y, Suematsu M, Yasui M. Rapid and reversible inhibition of aquaporin-4 by zinc [J]. *Biochemistry*, 2009, 48: 12059-12061.
- [4] Crane J M, Bennett J L, Verkman A S. Live cell analysis of aquaporin-4 m1/m23 interactions and regulated orthogonal array assembly in glial cells [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284: 35850-35860.
- [5] Auguste K I, Jin S, Uchida K, Yan D, Manley G T, Papadopoulos M C, et al. Greatly impaired migration of implanted aquaporin-4-deficient astroglial cells in mouse brain toward a site of injury [J]. *FASEB J*, 2007, 21: 108-116.
- [6] Da T, Verkman A S. Aquaporin-4 gene disruption in mice protects against impaired retinal function and cell death after ischemia [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, 45: 4477-4483.
- [7] Padmawar P, Yao X, Bloch O, Manley G T, Verkman A S. K⁺ waves in brain cortex visualized using a long-wavelength K⁺-sensing fluorescent indicator [J]. *Nat Methods*, 2005, 2: 825-827.
- [8] Nagelhus E A, Mathiisen T M, Ottersen O P. Aquaporin-4 in the central nervous system: cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4. 1. [J]. *Neuroscience*, 2004, 129: 905-913.
- [9] Zador Z, Magzoub M, Jin S, Manley G T, Papadopoulos M C, Verkman A S. Microfiberoptic fluorescence photobleaching reveals size-dependent macromolecule diffusion in extracellular space deep in brain [J]. *FASEB J*, 2008, 22: 870-879.
- [10] Ablimit A, Aoki T, Matsuzaki T, Suzuki T, Hagiwara H, Takami S, et al. Immunolocalization of water channel aquaporins in the vomeronasal organ of the rat: expression of AQP4 in neuronal sensory cells [J]. *Chem Senses*, 2008, 33: 481-488.
- [11] Ablimit A, Matsuzaki T, Tajika Y, Aoki T, Hagiwara H, Takata K. Immunolocalization of water channel aquaporins in the nasal olfactory mucosa [J]. *Arch Histol Cytol*, 2006, 69: 1-12.
- [12] Lu D C, Zhang H, Zador Z, Verkman A S. Impaired olfaction in mice lacking aquaporin-4 water channels [J]. *FASEB J*, 2008, 22: 3216-3223.
- [13] Nathan B P, Yost J, Litherland M T, Struble R G, Switzer P V. Olfactory function in apoE knockout mice [J]. *Behav Brain Res*, 2004, 150(1-2): 1-7.
- [14] Doncel-Pérez E, Caballero-Chacón S, Nieto-Sampedro M. Neurosphere cell differentiation to aldynoglia promoted by olfactory ensheathing cell conditioned medium [J]. *Glia*, 2009, 57: 1393-1409.
- [15] Franssen E H, De Bree F M, Essing A H, Ramon-Cueto A, Verhaagen J. Comparative gene expression profiling of olfactory ensheathing glia and Schwann cells indicates distinct tissue repair characteristics of olfactory ensheathing glia [J]. *Glia*, 2008, 56: 1285-1298.
- [16] Shepherd G M, Charpak S. The olfactory glomerulus: a model for neuro-glio-vascular biology [J]. *Neuron*, 2008, 58: 827-829.
- [17] London A J, Kimmelman J, Emborg M E. Research ethics. Beyond access vs. protection in trials of innovative therapies [J]. *Science*, 2010, 328: 829-830.

[本文编辑] 孙岩