

# TritonX-100 诱导嗅觉障碍后小鼠嗅上皮结构和嗅觉功能的改变及两者的相关性

曾宪平, 陈合新\*, 付清玲, 徐睿, 文卫平, 史剑波, 许庚  
(中山大学附属第一医院耳鼻咽喉科医院, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】用 TritonX-100(TX)诱导一种嗅觉障碍模型,观察不同时间点嗅上皮的组织学改变和小鼠嗅觉功能的变化,并对两者进行相关性分析。【方法】用 0.7%的 TX 对 8~10 周的 BALB/C 小鼠灌鼻以诱导小鼠嗅觉障碍,分别于灌鼻后第 3、7、21、49、56 天行觅食实验,以觅食时间的长短评估小鼠嗅觉功能的改变;用免疫组织化学染色(IHC)的方法,检测小鼠嗅上皮(OE)中成熟嗅神经元(ORN)数量、嗅上皮厚度、嗅上皮细胞总数的变化;并对小鼠觅食时间的改变和嗅上皮中成熟嗅神经元数量的变化行相关性分析。【结果】TX 诱导小鼠嗅觉障碍后,第 3~7 天时,小鼠嗅上皮中成熟 ORN 的数量急剧下降,嗅上皮的厚度变薄,细胞总数明显减少,小鼠觅食时间显著延长。第 21 天时,嗅上皮中成熟 ORN 开始增多,嗅上皮厚度开始恢复,嗅上皮中有大量新生细胞形成,以嗅觉标记蛋白(OMP)阴性细胞为主。此时小鼠嗅觉功能部分恢复,但觅食时间仍长于对照组。第 49~56 天时,小鼠嗅上皮中 ORN 数量、嗅上皮厚度、细胞总数及觅食时间恢复至正常水平。小鼠觅食时间与其嗅上皮中成熟 ORN 数量具有明显的相关性( $r = -0.757, P < 0.001$ )。【结论】联合运用行为学及组织化学的方法,可有效地评估小鼠嗅觉功能;用 TX 可成功诱导小鼠嗅觉障碍模型,该模型简便、稳定、可靠,具有可恢复的特点。

**关键词:** 嗅觉障碍;嗅觉标记蛋白(OMP);疾病模型;嗅觉功能;tritonX-100

**中图分类号:** R76      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1672-3554(2013)03-0371-07

## Changes of Olfactory Epithelium and Olfactory Function in Mouse treated with Intranasal Irrigating by TritonX-100 and Their Relationship

ZENG Xian-ping, CHEN He-xin\*, FU Qing-ling, XU Rui, WEN Wei-ping, SHI Jian-bo, XU Geng  
(Department of Otorhinolaryngology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:**【Objective】 To investigate a mice model of dysosmia induced with TritonX-100 and observe both the histological changes of olfactory epithelium and functional abnormalities of mouse olfactory organ. The above relationship between the structure and function is evaluated in the study.【Methods】 The dysosmia model was established using the mice of 8 to 10-week-old induced through intranasal irrigation with 0.7% Triton X-100(TX). The “buried food pellet” test was conducted separately at 3, 7, 21, 49, and 56 days post irrigation to evaluate the mouse olfactory functional abnormalities, combined with the means of olfactory marker protein (OMP) immunohistochemical analysis of olfactory epithelia(OE) for identification of the changes in mature olfactory receptor neurons (ORN), total cells and thickness of OE. And the relationship between “buried food pellet” test outcome and the mature ORN population of OE was detected.【Results】 3 to 7 days after intranasal irrigation with TritonX-100, the mature ORN in olfactory epithelium, OE thickness and total OE cells were distinctly reduced. And the average time for finding food was obviously extended. At 21 days post-irrigation, the mature ORN in olfactory epithelium began to increase, and meanwhile the OE thickness recovered. A large number of newly regenerated cells were observed, most of which are OMP(-) cells. The olfactory function partly recovered, but the average time spent to find food is still longer than the control group. At 49 to 56 days post-irrigation, the mature ORN cells, average thickness, total OE cells restored and the “buried food pellet” test outcome recovered to normal. The food-finding time of mice was significantly correlated with the number of mature ORN in OE ( $r = -0.757, P < 0.001$ ).【Conclusions】 Behaviour test,

收稿日期:2012-12-25

基金项目:广东省科技计划项目(2009B030801202)

作者简介:曾宪平,硕士生,E-mail: zengxianping13@163.com; \* 通信作者,陈合新,主任医师,E-mail: chenhexin9999@126.com

combined with morphology and histochemistry analysis used in this experiment can be useful in assessing odor detecting capability. The dysosmia model was induced successfully by intranasal irrigation with 0.7% Triton X-100 (TX), which was convenient, stable, reliable and restorable.

**Key words:** dysosmia; olfactory marker protein(OMP); olfactory function; tritonX-100

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2013, 34(3): 371-377]

嗅觉在人类生命活动中起着非常重要的作用,嗅觉障碍不仅是某些神经疾病的前兆<sup>[1]</sup>,还将严重影响患者的生活质量。近年国内外对嗅觉的研究日趋增多,尤其是对于嗅觉障碍的研究<sup>[2]</sup>,可靠而稳定的嗅觉障碍动物模型的建立对该领域的研究起到至关重要的作用。用于诱导嗅觉障碍的物质大体可以归结为两大类:即局部药物和全身性药物。其中,局部性药物有硫酸锌(zinc sulfate)<sup>[3]</sup>、二氧化硫(sulfur dioxide)<sup>[4]</sup>、甲基溴(methyl bromide)<sup>[5]</sup>、Triton X-100<sup>[6]</sup>;全身性药物包括甲硫咪唑(methimazole)<sup>[7]</sup>、甲基吲哚(3-methylindole)<sup>[8]</sup>等。种类繁多,各有利弊。硫酸锌造模后小鼠死亡率较高;二氧化硫和甲基溴为气态性嗅毒物,常需要一个密闭空间吸入性给药,操作稍繁琐;甲硫咪唑和甲基吲哚则可破坏嗅上皮基底膜,导致模型永久性失嗅。而 Triton X-100 是一种液体性嗅毒物,通过鼻腔灌注诱导嗅觉障碍,造模后小鼠死亡率小,不毁损嗅上皮基底膜,造模小鼠经过一段时间的恢复可重新获得嗅觉。因此我们选择 Triton X-100 进行嗅觉障碍模型的研究,并结合行为学及组织化学的方法,共同评估 TritonX-100 造模后小鼠嗅上皮和嗅觉行为学的改变及两者的关系,以期寻找一种简便易行的嗅觉障碍模型。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验动物:8~10周的BALB/C小鼠24只(中山大学北校区动物实验中心提供)。仪器设备:光学显微镜系统(Olympus,日本),解剖显微镜(Zeiss,德国),冰冻切片機(Leica,德国)。主要试剂:兔抗鼠嗅觉标记蛋白OMP多克隆抗体为abcam公司提供,辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗及DAB显色系统由中杉金桥提供。0.1 mol/L磷酸盐缓冲液(PBS)及40 g/L多聚甲醛溶液购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司。OCT包埋剂购自中杉金桥。

### 1.2 诱导嗅觉障碍

将8~10周的BALB/C小鼠24只随机分成6组:Ctrl、T3、T7、T21、T49、T56组,每组各4只小鼠。小鼠的数量确定来源于文献<sup>[3-7]</sup>。实验组(T3-T56组)用生理盐水按体积比稀释Triton X-100(北京鼎国)为0.7%后滴入实验组小鼠双侧鼻腔,轻轻摇晃小鼠头部使液体充分流入鼻腔,每侧鼻孔100  $\mu$ L,每天3次,共滴2 d。滴鼻应缓慢进行,100  $\mu$ L液体控制在40~60 s滴完,以免引起吸入性肺炎导致动物死亡。对照组(Ctrl组)用生理盐水(SL)代替体积分数0.7%的TritonX-100溶液。分别于造模后的第3、7、21、49、56天行觅食实验及取材,以备行免疫组织化学染色(IHC)。

### 1.3 觅食实验

传统的觅食实验(“buried food pellet”test)依文献<sup>[8]</sup>所述步骤进行,对试验者及记录者隐瞒小鼠的分组情况。实验前先限制小鼠进食3 d(鼠料0.2 g/24 h),不限制其饮水,于限食后第4天行觅食实验。限食期间每天让小鼠入觅食实验所用盒子内(40 cm  $\times$  24 cm  $\times$  20 cm)活动10 min,以熟悉实验环境。限食后第4天,试验者取一只小鼠置于一试验用塑料盒内,在盒子底部均匀设置一些小孔洞,孔深1~1.5 cm,分别于盒子中央及偏离中央约7 cm处的孔内置入0.5 g饲料颗粒,上铺垫料掩埋。第一次实验时食物颗粒埋于盒子中央下的小洞内,第2次实验时将食物向前移动7 cm,以小鼠前爪成功抱起食物时结束记时,分别记录两次试验中小鼠成功觅食所需时间(图1)。每次实验完后均要更换新的垫料。作为对照,将0.5 g饲料颗粒置于盒内相同位置但不掩埋,确定饲料在小鼠的视觉范围内。每次实验后均允许小鼠将饲料吃完。

### 1.4 免疫组化

在造模后的第3、7、21、49、56天行觅食实验后进行。在各时点将小鼠断头处死,迅速于冰上取出整个鼻腔,多聚甲醛溶液4  $^{\circ}$ C固定24 h后,置于pH 7.2 100 g/L的EDTA溶液中脱钙2周,每天更

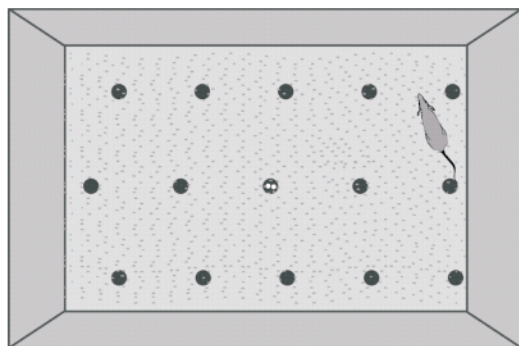


图1 “觅食实验”示意图

Fig.1 The schematic illustration of “buried food pellet” test

换脱钙液。依次移入 20 g/L 和 300 g/L 的蔗糖中过夜至沉底脱水,行水平冰冻切片,片厚 8  $\mu\text{m}$ 。每个时间点每只小鼠从鼻孔端由嗅上皮出现的区域至嗅球部连续切片。每隔 240  $\mu\text{m}$  距离为一个取片部位,每个时点每只小鼠取不同部位的 5 张切片,与兔抗大鼠嗅觉标记蛋白 (olfactory marker protein, OMP) 一抗 (1:100) 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育 24 h,用 PBS 替代一抗作阴性对照。二抗为生物素标记的山羊抗兔 IgG,三抗为链霉素抗生素蛋白-过氧化物酶溶液,用 DAB 溶液显色,常规脱水透明,中性树脂胶封片。镜下观察阳性细胞胞质呈棕褐色。选取每例标本中不同层面的 4 张切片,每张切片随机选取 5 个不同的视野 ( $\times 200$  倍镜下),采用 Image-Pro Plus 6.0 计数高倍镜下平均每个视野 OMP 阳性细胞数及嗅上皮细胞总数,同时测量嗅上皮厚度。

### 1.6 统计学分析

数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,用软件 SPSS13.0 对数据进行单因素方差分析 (ANOVA) 及 Bonferroni 法进行组间的两两比较。用 Spearman 秩相关分析法检测 OE 中成熟 ORN 细胞数和觅食时间之间的关联性。

## 2 结果

### 2.1 TX 及 SL 灌鼻后小鼠死亡率

在控制液体滴鼻速度的情况下,实验小鼠的死亡率非常小。在 TX 组,20 只小鼠中只有 1 只小鼠于灌鼻后第 2 天死亡,其余小鼠均顺利完成实验,死亡率为 5%;在 SL 组,无小鼠死亡。考虑 TX 组死亡小鼠可能为 TX 误吸入肺后致吸入性肺炎

致死,取死亡小鼠肺组织行 HE 染色示小鼠肺泡腔内大量炎性细胞浸润,以巨噬细胞和中性粒细胞为主,肺泡壁毛细血管扩张充血,具体数据不作本研究重点。

### 2.2 OMP 的在嗅上皮的表达及分布

OMP 特异性表达于成熟 ORN,是成熟的 ORN 标记性蛋白。在正常小鼠的鼻中隔、鼻顶部、各鼻甲部的 OE 及黏膜下轴突束均呈 OMP (+) (黄褐色;图 2A)。位于嗅上皮中层的 ORN 胞体、位于黏膜下的 ORN 轴突束及位于黏膜表面的 ORN 树突均呈 OMP (+)。其中,成熟的 ORN 胞体位于 OE 的中 3/4 层,为 5 ~ 8 层深褐色的圆形细胞。而位于嗅上皮基底部的基细胞 (BC) 及位于嗅黏膜表层的支持细胞 (SC) 呈 OMP (-)。BC 呈椭圆形附着于嗅上皮基底膜上,SC 为圆形单层细胞,位于 OE 的最表层 (图 2B)。

### 2.3 TritonX-100 灌鼻后嗅上皮的改变

2.3.1 OE 中成熟 ORN 数量 因 OMP 只表达于成熟 ORN 上,故每高倍镜视野下平均 OMP (+) 细胞数即成熟 ORN 数量。对照组 OE 平均每高倍镜视野 OMP (+) 细胞数为 (324  $\pm$  9) 个,位于 OE 中 3/4 ~ 4/5 层;造模后第 3、7、21、49、56 天,OMP (+) 细胞数分别为 (34  $\pm$  2) 个, (41  $\pm$  2) 个, (93  $\pm$  4) 个, (254  $\pm$  14) 个, (290  $\pm$  12) 个。由数据可知,造模后 OE 中成熟 ORN 数量急剧下降,至第 21 日始逐渐恢复,第 49 日至第 56 日时恢复至正常水平。对 OMP (+) 细胞数行 ANOVA 分析示  $F = 223.972$ ,  $P < 0.001$ , Bonferroni 法两两比较示第 3、7、21 日组 OMP (+) 细胞数小于对照组及造模后第 49、56 日组,  $P < 0.001$  差异有统计学意义 (图 3, 4)。

2.3.2 OE 厚度和细胞层次 OE 厚度由软件 Image-Pro Plus 6.0 测量,指由 OE 黏膜表面至基底膜的厚度 (图 2A),其值由平均值  $\pm$  标准差表示。造模后小鼠 OE 中细胞脱落,OE 厚度变薄,细胞层次明显减少,但基底膜仍保持完整。对照组 OE 平均厚度为 (35.48  $\pm$  0.79)  $\mu\text{m}$ ,由 7 层 ~ 9 层细胞构成;造模后第 3、7、21、49、56 天,OE 厚度分别为 (6.92  $\pm$  0.19)  $\mu\text{m}$ , (12.40  $\pm$  0.65)  $\mu\text{m}$ , (18.82  $\pm$  0.69)  $\mu\text{m}$ , (25.37  $\pm$  0.34)  $\mu\text{m}$ , (33.48  $\pm$  0.63)  $\mu\text{m}$ 。第 3 天和第 7 天,OE 细胞层数亦降至 2 ~ 4 层;及第 21 天时,OE 增至 4 ~ 7 层;第 49 天至第 56 天,OE 细胞层次恢复至正常水平。对 OE 厚度行 ANOVA 分析示  $F = 379.48$ ,  $P < 0.001$ , Bonferroni 法两两比较示

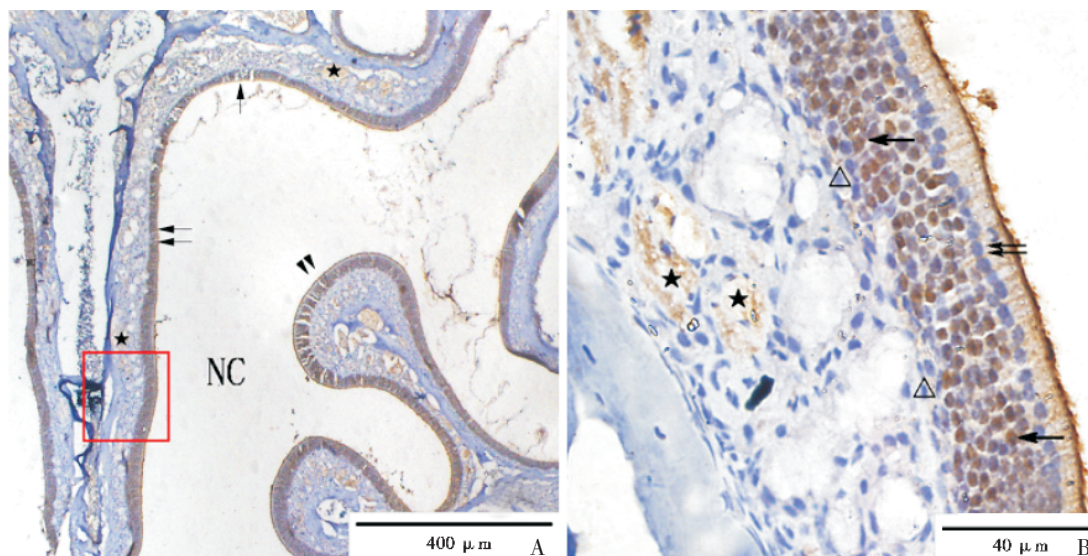


图 2 嗅上皮 OMP 免疫组化染色。

**Fig.2 Olfactory marker protein (OMP) immunohistochemistry of olfactory epithelia (OE)**

A: olfactory epithelia at the nasal septum, nasal roof, turbinates and submucosa axons are OMP(+). Double arrows (↑↑) show the nasal septum, single arrow (↑) show the nasal roof, double arrow-heads (▲▲) show the turbinate, five-pointed stars (★) show submucosa axons bundles, NC shows the nasal cavity; IHC × 20. B: Mature olfactory receptor neurons (ORN) lie in the medial epithelium and the submucosa axons are OMP(+), the supporting cells lie in the topside of OE and the basal cells lie in the basilar part of OE are OMP(-). Double arrows (↑↑) show the supporting cells (SC), single arrow (↑) show the olfactory receptor neurons, triangles (Δ) show the basal cells (BC), five-pointed stars (★) show submucosa axons bundles, IHC, × 200.

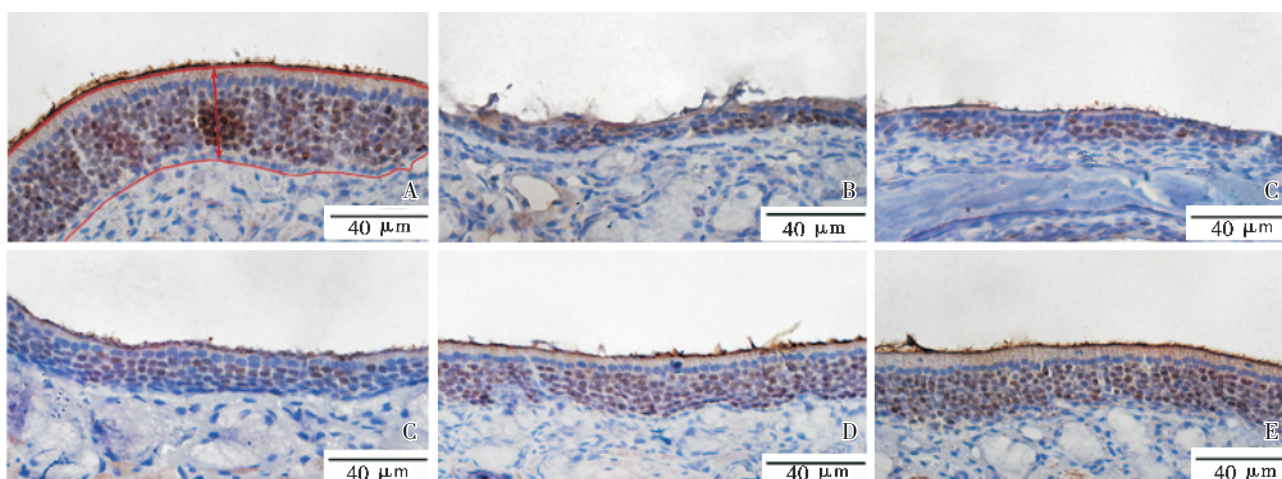


图 3 造模后嗅上皮 OMP 免疫组化染色

**Fig.3 Olfactory marker protein (OMP) immunohistochemistry at lesioned olfactory epithelia (OE)**

A: Control group, IHC, × 200; B: 3 days post-irrigation, IHC, × 200; C: 7 days post-irrigation, IHC, × 200; D: 21 days post-irrigation, IHC, × 200; E: 49 days post-irrigation, IHC, × 200; F: 56 days post-irrigation, IHC, × 200.

第 3 ~ 7 日 OE 厚度与对照组及造模后第 21、49、56 日相比均有显著差异,  $P < 0.001$  差异有统计学意义(图 3, 5)。

2.3.3 OE 中细胞总数减少 嗅上皮中细胞总数

计数方法类似 OMP(+) 细胞计数, 以细胞核个数表示总细胞数。对照组 OE 平均每高倍镜视野总细胞数为  $472 \pm 7$ , 由 7 ~ 9 层细胞构成, 主要为 OMP(+) 细胞; 造模后第 3、7、21、49、56 天, OE 总

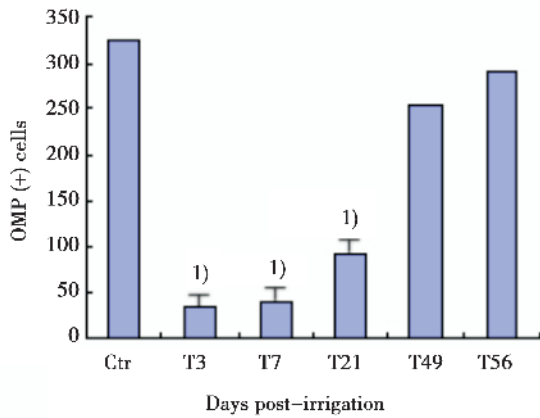


图 4 嗅上皮 OMP(+)细胞数的变化

Fig.4 The OMP(+) cells in OE after intranasal irrigation

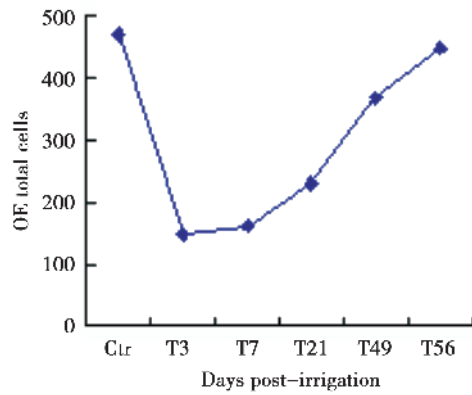


图 6 嗅上皮细胞总数的改变

Fig.6 The total cells in OE after intranasal irrigation

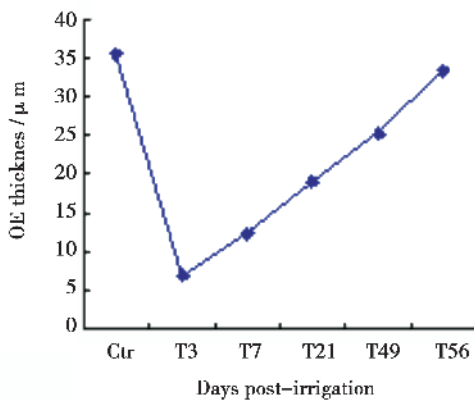


图 5 嗅上皮厚度的改变

Fig.5 The OE thickness after intranasal irrigation

细胞数分别为  $149 \pm 4, 160 \pm 6, 229 \pm 11, 368 \pm 4, 446 \pm 6$ 。造模后 OE 中总细胞数急剧下降,以 OMP(+)细胞减少为主;至第 21 日始逐渐恢复,此时主要以 OMP(-)细胞恢复为主;至第 49 日及第 56 日时恢复至正常水平,此时主要以 OMP(+)细胞增加为主。对 OE 总细胞数行 ANOVA 分析示  $F = 473.403, P < 0.001$ , Bonferroni 法两两比较示第 3、7、21 日组细胞总数小于对照组及造模后第 49、56 日组,  $P < 0.001$  差异有统计学意义(图 3, 6)。

### 2.4 TX 灌鼻后小鼠觅食行为的改变

对照组小鼠在试验中觅食行为目的性强,能在一固定的小范围内搜寻食物,平均成功觅食所用时间为  $(66 \pm 14)s$ 。造模后小鼠仍有觅食行为,但搜寻范围明显增大,目的性欠佳,造模后第 3、

7、21、49 天平均成功觅食用时间(s)分别为  $496 \pm 37, 534 \pm 68, 268 \pm 24, 137 \pm 37, 70 \pm 12$ , 行 ANOVA 分析示  $F = 32.04, P < 0.001$ , 对觅食时间行 Bonferroni 法两两比较示第 3、7、21 天觅食时间均长于对照组及造模后第 49、56 日组,  $P < 0.001$  差异有统计学意义(图 7)。

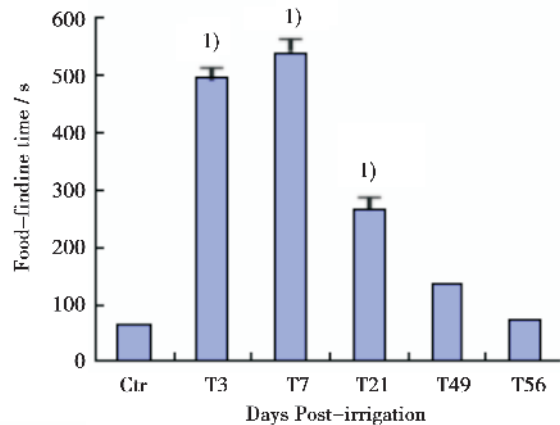


图 7 小鼠嗅觉功能的改变

Fig.7 The olfactory function in intranasal irrigated mice

1) compared with control group,  $P < 0.001$ . Ctr: Control group; T3, T7, T21, T49, T56: 3, 7, 21, 49, 56 days post-irrigation

### 2.5 OE 中成熟 ORN 数量与觅食时间的相关性

对 OMP(+)细胞数及觅食时间分别编秩后行关联性分析,得 Spearman 秩相关系数  $r = -0.757, P < 0.001$ ,表明嗅上皮中成熟 ORN 数量与小鼠觅食时间之间呈明显的负相关性(秩次散点图略)。

### 3 讨 论

脊椎动物 OE 中含有三种主要的功能细胞:支持细胞(supporting cells, SC)、嗅神经元(olfactory receptor neurons, ORN)、基底细胞(basal cells, BC)。其中,SC 的胞体位于 OE 最顶层,ORN 位于 OE 中层,而 BC 位于 OE 基底部,靠近基底膜,为 OE 内的干细胞,可定向分化为 ORN 及 SC<sup>[9-10]</sup>。在哺乳动物,ORN 的平均寿命只有 30~90 d,凋亡的 ORN 不停地被新生的 ORN 所取代<sup>[10]</sup>。新生的 ORN 来源于 OE 基底部的 BC,其分化形成成熟的 ORN 的过程如下:圆形的 BC 由嗅上皮基底部向嗅上皮顶部迁移,同时其神经树突(dendrite)逐渐向 OE 鼻腔面生长,于 OE 黏膜表面形成树突小结(dendritic knob);其神经轴突(axon)穿过基底膜进入黏膜下层,向嗅球方向生长,在嗅球(olfactory bulb)的嗅小球层(glomeruli)与僧帽细胞的树突形成突触连接,至此 BC 完成了向成熟 ORN 的分化<sup>[11]</sup>。每个 ORN 的树突小结(dendritic knob)上均有树根纤毛突出至鼻腔表面黏液层,当该纤毛捕获到吸入鼻腔的溴质后,即产生动作电位,新生的动作电位顺着 ORN 的树突传至胞体后,再沿 ORN 的轴突传入嗅球及嗅觉中枢,从而让生物体感知到特定的气味<sup>[12]</sup>。可见,ORN 是嗅觉信号传导中的第一级神经元,因位于嗅上皮常与外界环境接触,ORN 的损伤常是嗅觉障碍的主要原因。因此,嗅觉障碍的造模物质主要是针对嗅上皮 ORN 的。

我们的研究显示,0.7%的 TritonX-100 可充分毁损嗅上皮中的嗅神经元 ORN,从而诱导小鼠嗅觉障碍模型,该模型不毁损嗅上皮基底膜,保障了模型组小鼠嗅觉的可恢复性,这有别于其他物质所造模型。造模后小鼠经过一段时间的恢复可重新获得嗅觉。

OMP 在新生小鼠 OE 中即有阳性表达,出生后第 30 天(P30)OE 完全发育成熟,OMP(+)细胞数及 OE 厚度趋向恒定,及至出生后第 50 周时(P350),小鼠进入衰老期,OE 中 OMP(+)细胞数开始减少,OE 厚度开始下降<sup>[13-15]</sup>。本研究所用小鼠为 8~10 周龄大小(P56~P70),实验周期为 56 天,小鼠实验所在的时间段为 P56~P126,已经进入 OE 恒定期(>P30),且尚未进入 OE 衰退期(<P350),故笔者认为实验动物各组间是有可比

性的。

影响 OE 厚度的因素主要包括影响嗅神经元再生的因素(神经生长因子 NGF<sup>[16]</sup>、内皮素<sup>[17]</sup>、载脂蛋白 E 即 ApoE<sup>[18]</sup>、肿瘤坏死因子<sup>[19]</sup>等)、嗅毒性物质对 OE 的破坏<sup>[4-7]</sup>、小鼠鼠龄<sup>[20]</sup>。小鼠在 P30 之后至进入衰老期前,其 OE 厚度基本恒定,所以小鼠鼠龄不对实验造成影响。嗅毒性物质在实验环境中微乎其微,对实验基本无影响。影响神经元再生的因素在各组小鼠中亦无差别。故笔者认组间数据仍具有可比性。

我们发现,Triton X-100 处理后,小鼠嗅上皮 OMP 阳性细胞数(即成熟的 ORN)较对照组明显降低( $F = 223.972, P < 0.001$ ),嗅上皮细胞总数及厚度减少,但基底膜保持完整。造模后第 3~7 天,OMP 阳性细胞呈单层甚至缺如(图 3B,3C),每高倍镜视野平均 OMP 阳性细胞比对照组减少 290~320 个,OE 细胞总数明显减少( $F = 437.40, P < 0.01$ ),以 OMO(+)细胞减少为主。至造模后第 21 天始,模型组小鼠 OE 开始恢复,OE 厚度及细胞总数开始增加(图 3D)。此时 OE 平均厚度为  $(18.82 \pm 0.69) \mu\text{m}$ ,平均 OMP(+)细胞计数为  $92.92 \pm 4.02$ ,每高倍镜下 OE 平均细胞总数为  $229.17 \pm 10.96$  个,OE 细胞总数的增加主要以 OMP(-)细胞增加为主,据文献报道,此时新增的 OMP(-)细胞主要为幼稚的 ORN<sup>[21]</sup>,具体结果尚需进一步实验验证。此时的嗅上皮尚未恢复到造模前水平。至第 49~56 天,OE 厚度、细胞层数、OMP(+)细胞数、OE 细胞总数均恢复至正常水平,表明 TritonX-100 不仅可诱导小鼠嗅觉障碍,且该模型小鼠嗅觉具有可恢复的特性。

为进一步确认模型的可行性,我们再次从行为学角度对模型进行进一步考察。因实验目的不同常有不同的评估动物嗅觉行为的方法,觅食实验("buried food pellet" test)是人们最常用的方法,以小鼠成功觅食所用的平均时间来评估小鼠嗅觉障碍的程度<sup>[8]</sup>。在我们的实验中,模型组小鼠嗅上皮结构的改变常伴随其觅食行为的变化。在造模后第 3 天及第 7 天,小鼠嗅上皮最薄,OMP(+)细胞数及细胞总数最少,其成功觅食所用时间也最长(496.17~534.50 s)。第 49 天及第 56 天,嗅上皮结构恢复后,其觅食时间也恢复至正常水平(69.83~136.67 s)。对 OE 中成熟 ORN 数量及觅食时间分别编秩后行关联性分析,得 Spearman 秩

相关系数  $r = -0.757, P < 0.001$ , 表明嗅上皮中成熟 ORN 数量与小鼠觅食时间之间呈明显的负相关性。可见,模型组小鼠嗅上皮结构与觅食所用时间具有很好的协同性,表明 TritonX-100 造模后,确实可导致小鼠嗅觉障碍,且该模型小鼠嗅觉可于 49 ~ 56 d 后恢复正常。

综上所述,联合运用行为学及组织化学的方法,可有效地评估小鼠嗅觉功能;运用 TritonX-100 可成功诱导小鼠嗅觉障碍模型,该模型简便、稳定、可靠,具有可恢复的特点。

#### 参考文献:

- [1] Rolet A, Magnin E, Millot J L, et al. Olfactory dysfunction in multiple sclerosis: evidence of a decrease in different aspects of olfactory function [J]. *Eur Neurol*, 2012, 69(3): 166-170.
- [2] Palouzier-Paulignan B, Lacroix M C, Aime P, et al. Olfaction under metabolic influences[J]. *Chem Senses*, 2012, 37(9): 769-797.
- [3] Kawagishi K, Yokouchi K, Fukushima N, et al. Determination of functionally essential neuronal population of the olfactory epithelium for nipple search and subsequent suckling behavior in newborn rats [J]. *Brain Res*, 2009, 1276: 50-57.
- [4] Min YG, Kim JW, Hong SC, et al. Pathogenetic mechanism of olfactory cell injury after exposure to sulfur dioxide in mice[J]. *Laryngoscope*, 2003, 113(12): 2157-2162.
- [5] Jang W, Kim KP, Schwob JE. Nonintegrin laminin receptor precursor protein is expressed on olfactory stem and progenitor cells [J]. *J Comp Neurol*, 2007, 502(3): 367-381.
- [6] Paskin TR, Iqbal TR, Byrd-Jacobs CA. Olfactory bulb recovery following reversible deafferentation with repeated detergent application in the adult zebrafish[J]. *Neuroscience*, 2011, 196(9): 276-284.
- [7] Sakamoto T, Kondo K, Kashio A, et al. Methimazole-induced cell death in rat olfactory receptor neurons occurs via apoptosis triggered through mitochondrial cytochrome c-mediated caspase-3 activation pathway [J]. *J Neurosci Res*, 2007, 85(3): 548-557.
- [8] Lu DC, Zhang H, Zador Z, et al. Impaired olfaction in mice lacking aquaporin-4 water channels[J]. *FASEB J*, 2008, 22(9): 3216-3223.
- [9] Ferrando S, Gallus L, Gambardella C, et al. Cell proliferation and apoptosis in the olfactory epithelium of the shark *Scyliorhinus canicula*[J]. *J Chem Neuroanat*, 2010, 40(4): 293-300.
- [10] Mackay-Sim A, Kittel PW. On the life span of olfactory receptor neurons [J]. *Eur J Neurosci*, 1991, 3(3): 209-215.
- [11] Carter LA, Macdonald JL, Roskams AJ. Olfactory horizontal basal cells demonstrate a conserved multipotent progenitor phenotype[J]. *J Neurosci*, 2004, 24(25): 5670-5683.
- [12] Firestein S. How the olfactory system makes sense of scents[J]. *Nature*, 2001, 413(6852): 211-218.
- [13] Chuah MI, Tennent R, Teague R. Developmental anatomy of the primary olfactory pathway in the opossum *Monodelphis domestica* [J]. *Histol Histopathol*, 1997, 12(3): 799-806.
- [14] Murdoch B, Roskams AJ. Olfactory epithelium progenitors: insights from transgenic mice and in vitro biology[J]. *J Mol Histol*, 2007, 38(6): 581-599.
- [15] Nakayasu C, Kanemura F, Hirano Y, et al. Sensitivity of the olfactory sense declines with the aging in senescence-accelerated mouse (SAM-P1) [J]. *Physiol Behav*, 2000, 70(1-2): 135-139.
- [16] Miwa T, Moriizumi T, Horikawa I, et al. Role of nerve growth factor in the olfactory system [J]. *Microsc Res Tech*, 2002, 58(3): 197-203.
- [17] Laziz I, Larbi A, Grebert D, et al. Endothelin as a neuroprotective factor in the olfactory epithelium [J]. *Neuroscience*, 2011, 172(9): 20-29.
- [18] Nathan BP, Nisar R, Short J, et al. Delayed olfactory nerve regeneration in ApoE-deficient mice [J]. *Brain Res*, 2005, 1041(1): 87-94.
- [19] Turner JH, Liang KL, May L, et al. Tumor necrosis factor alpha inhibits olfactory regeneration in a transgenic model of chronic rhinosinusitis-associated olfactory loss[J]. *Am J Rhinol Allergy*, 2010, 24(5): 336-340.
- [20] Hinds JW, Mcnelly NA. Aging in the rat olfactory system: correlation of changes in the olfactory epithelium and olfactory bulb[J]. *J Comp Neurol*, 1981, 203(3): 441-453.
- [21] Vukovic J, Marmorstein LY, McLaughlin PJ, et al. Lack of fibulin-3 alters regenerative tissue responses in the primary olfactory pathway [J]. *Matrix Biol*, 2009, 28(7): 406-415.

(编辑 刘清海)