

嗅觉上皮再生的研究进展

许庆庆¹ 王向东^{1△} 张罗¹

[关键词] 嗅上皮;再生;调节机制;治疗

doi:10.13201/j.issn.2096-7993.2020.04.024

[中图分类号] R765.6 [文献标志码] A

Progress in research on olfactory epithelial regeneration

Summary The olfactory epithelium(OE) is the neuro-epithelial tissue that can be regenerated after damage in the nervous system. However, certain factors, such as neurodegenerative diseases, head trauma, viral infections, etc., can lead to olfactory dysfunction, affecting patients' physical and mental health, quality of life and risk identification, and even increase patient mortality. Therefore, it is important to clarify the mechanism of OE regeneration regulation and to find new treatment methods. This review is based on OE and the composition of olfactory stem cells, physiological and pathological olfactory sensory neurons regeneration regulation and treatment of olfactory disorders.

Key words olfactory epithelium; reproduction; regulatory mechanism; treatment

人的嗅觉在安全性、警示危险性、适当的营养摄取以及日常的社交活动中非常重要。嗅上皮(olfactory epithelium, OE)是神经系统中唯一可再生的特殊神经上皮。但是嗅觉系统的再生能力随着年龄、神经退行性疾病、炎症、慢性鼻窦感染和颅底手术等因素而降低。当嗅觉感觉神经元(olfactory sensory neurons, OSNs)再生失败,便会导致临床嗅觉功能减退或嗅觉障碍,影响个体生活质量,增加个体的死亡率。因此,明确 OE 再生的调节机制,寻找新的治疗方法至关重要。

1 OE 的组成

OE 是嗅觉的外周器官,存在于鼻腔嗅裂区域的黏膜中,即上鼻甲的上后内侧以及中鼻甲上部的小部分对应的鼻中隔区域。包括 OSNs 和非神经元细胞,后者包括基底细胞、微绒毛覆盖的支持细胞、微绒毛细胞和 Bowman 导管腺细胞。

2 嗅觉干细胞的组成

为了维持嗅觉系统的完整性,OSNs 必须保持不断更新能力,而更新过程的维持是通过 OE 的基底干细胞和祖细胞来完成的。谱系追踪研究已经确定了 2 种 OE 干细胞的谱系,即水平基底细胞(horizontal basal cells, HBCs)和球状基底细胞(globose basal cells, GBCs),前者通常保持有丝分裂静止状态,只有损伤后可激活;后者根据需要进行有丝分裂产生新的 OSNs。

在正常的 OE 中,GBCs 包括增殖的基础细胞群,其标志是胸苷类似物的掺入或有丝分裂进展相关蛋白的表达^[1]。它们在形态上没有明显区别,只

能通过表达的转录因子(包括 Sox2、Pax6、Ascl1、Neurog1 和 NeuroD1 等)组合方式的不同而加以区别。OSNs 从 GBCs 中分化成熟的过程为:由表达轴突生长和分化的分子标记物的未成熟状态到表达嗅觉标记蛋白(olfactory marker protein, OMP)和嗅觉器官的成熟 OSNs。p63 基因是 HBCs 在上皮发育过程中所必需的,在发育过程中,Notch 信号可能是介导 HBCs 的反馈信号,可以导致 p63 表达缺失和细胞周期的激活^[2]。

3 OE 再生的影响因子以及信号通路研究

研究发现,血管内皮生长因子可以影响来源于 OE 的人神经干细胞/祖细胞的迁移和局部黏附,但不影响其增殖或存活^[3],而 DNA 甲基化抑制剂可能是促进神经细胞分化的有效工具^[4]。3 型腺苷酸环化酶(type 3 adenylyl cyclase, Adcy3)定位于 OSNs 的纤毛,是嗅觉环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)信号通路的重要组成部分。研究发现^[5],Adcy3 在小鼠出生后 OSNs 的成熟和嗅觉纤毛超微结构维持中起着不可或缺的作用,提示 cAMP 信号通路在嗅觉维持中的重要性。此外,MEK5-ERK5 是一种内源性 cMAP 激酶信号通路,它是调节脑室下区或者嗅球中神经发生的重要内源性信号通路,在一定条件下,内源性 ERK5 的激活足以增强嗅球中神经的再生,从而改善正常或者受损状态的嗅觉功能^[6]。最新研究发现了哺乳动物 OE 神经细胞再生领域的一种新颖的信号通路,这种通路是 Gnao 调控的选择性嗅觉信号通路,独立于磷脂酰肌醇-3 激酶依赖性(phosphatidylinositol 3-kinase-dependent signaling, PI)信号转导通路,并且不影响这些神经元中由同一受体介导的其他典型通路。

4 OSNs 受损以及受损后再生

OSNs 在损伤后的再生情况取决于损伤类型

¹首都医科大学附属北京同仁医院 北京市耳鼻咽喉科研究所(北京,1001730)

[△]审校者

通信作者:王向东, E-mail: entwxid@vip.sina.com

和损伤程度。按损伤类型分为中枢型和外周型。其中中枢损伤又包括 2 种类型,一种是嗅神经横断,另一种是单侧嗅球切除,而使用不同类型的金属刀片进行嗅神经切断可因瘢痕形成程度继而影响随后的嗅神经再生水平^[7]。外周损伤是指暴露于甲基溴(methyl bromide, MeBr), Triton X-100 或甲硫咪唑等化学物质引起的损伤。这种损伤使得部分 HBCs 被激活,可以产生 GBCs 能产生的所有细胞类型,包括 OSNs、Sus 细胞和 D/G 细胞等,但是其实大部分 HBCs 仍然没有被完全激活,因为大部分 OE 本身还含有 GBCs,这表明过多的 GBCs 存在可能会抑制 HBCs 的激活。

白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)和 NO 在 OE 损伤后的再生中起重要作用。研究显示^[8], LIF 通过增加嗅上皮细胞培养中诱导型一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, iNOS)的水平来促进神经祖细胞的增殖。而 NO 是 iNOS 激活后产生的可扩散的细胞间信使,它在 OE 的神经发生中起重要作用。急性炎症损伤后通过 NF- κ B 信号通路启动重要的再生信号,从而激活神经干细胞以重建 OE^[9]。

OSNs 存活与凋亡间的平衡可能是由气味刺激的神经活动和感觉输入来调节的^[10-11],感觉输入在出生后 OSNs 的存活中起关键作用。从单侧鼻窦阻塞的新生小鼠嗅觉剥夺模型中可以发现其 MOE 变薄, OSNs 减少,嗅觉标记蛋白(olfactory marker protein, OMP)阳性细胞数量相应减少。在嗅觉特异性组蛋白变体(olfactory specific histone variants, H2Be)基因敲除模型中, OSNs 的寿命显著延长,而在 H2Be 过表达的小鼠中, OSNs 的寿命显著缩短,可见 H2Be 对 OSNs 的存活起重要作用。因为 H2Be 的下调方式为 cAMP 活性依赖性,也间接强调了 cAMP 信号转导通路在嗅觉维持中的重要性。

随年龄增长,人类 OE 会出现 2 种病理形态,第 1 种形态: OSNs 和 GBCs 从 OE 中消失,但是 Sus 细胞和休眠的 HBCs 仍然存在;第 2 种形态: OE 被化生的呼吸上皮替代。敲除 Notch1 基因后,如果 OE 正常,会一定程度增强 HBCs 自发激活率;如果进行嗅球切除,会导致 HBCs 激活水平的显著增加。而 Notch 配体由 HBCs 和 Sus 细胞表达,这可以解释为何 Sus 细胞死亡和 Notch1 敲除会对 HBCs 有激活作用。此外, Notch 信号还与多种其他组织中 p63 的调节有关^[12-14]。

二氯苯尼被证实会对 OE 背内侧造成严重的损伤,导致全部 GBCs 被破坏, OE 在过程中也会经历呼吸道上皮化生;而其对 OE 腹外侧的损伤要小得多,此处神经元大部分得以保留。但静脉输注人脂肪干细胞可以恢复部分二氯苯尼损伤后 OE 背

内侧神经再生的潜力^[15]。GBCs 在 OE 受到损伤后立即作为多能祖细胞发挥作用。如果 HBCs 要在宿主上皮环境中变得活跃和多能,它们必须经历宿主受损的环境^[16]。不同于来自正常 OE 的 HBCs,经历上皮损伤后的 HBCs 能够在移植后受损的宿主环境中作为多能祖细胞进行强有力的再生和修复。

5 嗅觉障碍的干细胞治疗

随着干细胞技术的发展,干细胞治疗神经系统疾病已得到大量验证,干细胞移植治疗也成为 OE 恢复的一种新的治疗方式。

嗅觉通路由 3 个部分组成:嗅受体神经元、嗅神经和嗅球;嗅束和初级嗅中枢;次级嗅中枢。干细胞治疗主要通过修复嗅受体神经元、嗅球以及两者之间的联系来治疗嗅觉障碍。

干细胞来源包括嗅神经前体细胞和成体干细胞。嗅神经相关的前体细胞包括嗅觉前体细胞和嗅鞘细胞。前者具有再生性质,嗅感觉神经元损伤后,可通过嗅上皮基部球形基底细胞进行再生,基底层内的细胞是干细胞重要来源,具有分化为神经元的能力;后者是嗅觉系统中具备终生再生分裂能力的非神经元细胞,是一种特殊类型的胶质细胞,能够引导外周神经系统与中枢神经系统的连接。成体干细胞分布于全身各个组织器官,在病理状态下或外因诱导下具有增殖和多向分化能力。研究发现,嗅觉功能的恢复与神经生长因子(nerve growth factor, NGF)和脑驱动神经生长因子(brain driven nerve growth factor, BDNF)等嗜神经因子的表达相关。间充质干细胞能够分泌神经营养因子和血管生成细胞因子,并诱导其生成^[17],因此将是治疗嗅觉缺失的有效方式。此外,骨髓间充质干细胞、脂肪干细胞、人脐血 CD133 阳性干细胞以及神经干细胞近年来也做为有效治疗嗅觉障碍的移植细胞。将骨髓间充质干细胞移植入 Triton X-100 诱导 OE 变性的大鼠体内,4 周后可发现 OE 厚度和嗅觉细胞组成结构都恢复正常。将脂肪间充质干细胞移植到嗅神经被切断的大鼠体内后,可促进 OE 的再生。将人脐血 CD133 阳性干细胞移植到 OE 受损的 NOD SCID 小鼠体内后,可发现神经元再生与生长相关蛋白 43 表达的增加。从 GFP 转基因小鼠嗅球中提取神经干细胞,移植到受损的 OE 中,行为测试和组织学研究结果都表明,移植组在埋球实验和 OMP 表达方面都比对照组结果好。

干细胞移植治疗嗅觉障碍的作用机制尚未完全阐明, Lankford 报道, OE 细胞的吞噬能力是改善嗅觉轴突再生的关键因素,因为它们可能会潜在地加速从损伤部位去除碎片,从而改善神经元再生的条件。有研究发现,在嗅上皮损伤(单侧球囊切

除术或甲硫咪唑给药)后,OE细胞的吞噬活性增加,并且已证实它们是细胞碎片的主要吞噬者^[18-19]。最近的一项研究表明,OE细胞分泌转化生长因子- $\beta 1$,它可以通过调节整合素/MFG-E8信号通路来增加其吞噬活性^[20]。

6 药物治疗

他汀类药物或HMG-CoA还原酶抑制剂是传统的降脂药,但同时具有神经保护性。动物实验发现,无论行为测试还是组织学研究,他汀类药物组的治疗效果都优于对照组。丙戊酸(valproic acid, VPA)是一种组蛋白去乙酰化酶抑制剂,动物实验发现,口服VPA治疗甲硫咪唑诱导OE细胞变性模型后,OE厚度、OMP阳性细胞、Ki-67(增殖细胞)和GAP-43的数量都显著增加。

糖皮质激素也发现对上呼吸道感染后嗅觉减退患者的嗅觉功能具有改善作用^[21]。在变应性鼻炎动物模型中,糖皮质激素治疗后,OE中OMP的表达上调。嗅觉丧失患者口服糖皮质激素治疗14d,近一半患者的嗅觉功能测试得以改善^[22]。Kobayashi等的研究表明,糖皮质激素治疗可以改善嗅神经的再生,减少了损伤部位的炎症反应和瘢痕组织形成。

此外,维生素对神经系统是必不可少的,最近研究已表明维生素A在OSNs的再生中发挥作用,发现局部维生素A治疗在感染和创伤后嗅觉障碍患者中非常有效。

7 其他

生长因子治疗是改善嗅觉再生的另一种潜在治疗方法。它们刺激细胞生长、增殖和再生,并且对调节细胞再生的过程很重要^[17]。为研究碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)对幼龄和衰老小鼠嗅觉上皮的影响,用bFGF对动物进行鼻内给药,用增殖细胞核抗原、OMP和GAP-43免疫印迹法检测嗅上皮的变化。结果显示GAP-43阳性神经元的数目显著增加,但是OMP阳性细胞或成熟嗅觉受体神经元的数量没有显著变化。为研究bFGF对小鼠损伤OE的影响,以水凝胶或滴注形式获得bFGF对失嗅小鼠进行滴鼻治疗。结果表明,bFGF水凝胶增加了OE的厚度,表达OMP的成熟ORNs数量增加。所以,嗅觉损伤后每天鼻内注射bFGF可提高OE嗅祖细胞的增殖率,进而促进OSNs的再生。

多项研究证实上呼吸道感染后、外伤性、特发性以及神经性疾病相关嗅觉障碍均可通过嗅觉训练法得以改善^[23-24]。目前认为嗅觉训练可诱导脑部神经重塑、增加嗅球体积,但其改善嗅觉功能的具体机制有待深入研究。嗅觉训练可明显改善嗅觉识别、辨别能力,对嗅觉觉察阈有轻度改善作用。多项研究发现延长嗅觉训练时间,增加嗅剂种

类,提高嗅剂浓度甚至使用随机浓度精油均可提高嗅觉功能的改善率^[25-26]。

8 展望

对于上呼吸道感染后嗅觉障碍、外伤后嗅觉障碍或老年性嗅觉障碍,目前仍缺乏特定的药物治疗。在药物治疗无效的适当情况下,对于存在鼻-鼻窦部位疾病的患者进行鼻内镜鼻窦手术,成为改善客观嗅觉的一种办法。而病毒基因疗法在治疗某些疾病,特别是涉及功能缺失突变的遗传疾病中具有广阔的应用前景。

总之,嗅觉障碍的临床治疗至今仍然是难题,最近在OE再生方面的研究工作已显示出一些突破性进展,但仍存在许多尚不明确的领域,例如,嗅觉干细胞和祖细胞在受到何种程度的损伤时会导致功能的衰退,进而导致OE的稳态失衡,机制是什么?嗅觉干细胞的活化和功能的分子调控机制如何?是否涉及其他的信号通路?已经确定具有明显治疗效果的方法,例如神经生长因子治疗和干细胞移植,但大部分只在动物实验阶段,并没有在临床进行广泛应用。所以,我们仍然任重道远,未能阐明问题的研究以及大规模临床试验的展开是首要任务。

参考文献

- [1] Jang W, Chen X, Flis D, et al. Label-retaining, quiescent globose basal cells are found in the olfactory epithelium[J]. J Comp Neurol, 2014, 522(4): 731-749.
- [2] Herrick DB, Lin B, Peterson J, et al. Notch1 maintains dormancy of olfactory horizontal basal cells, a reserve neural stem cell[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017, 114(28): E5589.
- [3] Ramirez-Rodriguez GB, Perera-Murcia GR, Ortiz-Lopez L, et al. Vascular endothelial growth factor influences migration and focal adhesions, but not proliferation or viability, of human neural stem/progenitor cells derived from olfactory epithelium[J]. Neurochem Int, 2017, 108: 417-425.
- [4] Franco I, Ortiz-Lopez L, Roque-Ramirez B, et al. Pharmacological inhibition of DNA methyltransferase 1 promotes neuronal differentiation from rodent and human nasal olfactory stem/progenitor cell cultures[J]. Int J Dev Neurosci, 2017, 58: 65-73.
- [5] Zhang Z, Yang D, Zhang M, et al. Deletion of Type 3 Adenylyl Cyclase Perturbs the Postnatal Maturation of Olfactory Sensory Neurons and Olfactory Cilium Ultrastructure in Mice[J]. Front Cell Neurosci, 2017, 11(1): 1-5.
- [6] Wang W, Lu S, Li T, et al. Inducible activation of ERK5 MAP kinase enhances adult neurogenesis in the olfactory bulb and improves olfactory function[J]. J Neurosci, 2015, 35(20): 7833-7849.
- [7] Holbrook EH, Iwema CL, Peluso CE, et al. The Regeneration of P2 Olfactory Sensory Neurons Is Selec-

- tively Impaired Following Methyl Bromide Lesion[J]. Chem Senses, 2014, 39(7): 601—616.
- [8] Chehrehasa F, Ekberg JAK, John J. A novel method using intranasal delivery of EdU demonstrates that accessory olfactory ensheathing cells respond to injury by proliferation[J]. Neurosci Lett, 2014, 563(1): 90—95.
- [9] Chen M, Reed RR, Lane AP. Acute inflammation regulates neuroregeneration through the NF- κ B pathway in olfactory epithelium[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017, 114(30): 8089—8094.
- [10] Cadiou H, Aoude I, Tazir B, et al. Postnatal odorant exposure induces peripheral olfactory plasticity at the cellular level[J]. J Neurosci, 2014, 34(14): 4857—4870.
- [11] Kikuta S, Sakamoto T, Nagayama S, et al. Sensory deprivation disrupts homeostatic regeneration of newly generated olfactory sensory neurons after injury in adult mice[J]. J Neurosci, 2015, 35(6): 2657—2673.
- [12] Tadeu AM, Horsley V. Notch signaling represses p63 expression in the developing surface ectoderm[J]. Development, 2013, 140(18): 3777—3786.
- [13] Mori M, Mahoney JE, Stupnikov MR, et al. Notch3-Jagged signaling controls the pool of undifferentiated airway progenitors[J]. Development, 2015, 142(2): 258—267.
- [14] Yoh K, Prywes R. Pathway Regulation of p63, a Director of Epithelial Cell Fate[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2015, 6: 51.
- [15] Franceschini V, Bettini S, Pifferi S, et al. Transplanted human adipose tissue-derived stem cells engraft and induce regeneration in mice olfactory neuroepithelium in response to dichlobenil subadministration[J]. Chem Senses, 2014, 39(7): 617—629.
- [16] Schnittke N, Herrick DB, Lin B, et al. Transcription factor p63 controls the reserve status but not the stemness of horizontal basal cells in the olfactory epithelium[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(36): E5068—5077.
- [17] Hummel T, Whitcroft KL, Andrews P, et al. Position paper on olfactory dysfunction[J]. Rhinol Suppl, 2017, 54(1): 1—30.
- [18] Nazareth L, Tello Velasquez J, Lineburg KE, et al. Differing phagocytic capacities of accessory and main olfactory ensheathing cells and the implication for olfactory glia transplantation therapies[J]. Mol Cell Neurosci, 2015, 65(2): 92—101.
- [19] Nazareth L, Lineburg KE, Chuah MI, et al. Olfactory ensheathing cells are the main phagocytic cells that remove axon debris during early development of the olfactory system[J]. J Comp Neurol, 2015, 523(3): 479—494.
- [20] Li Y, Zou T, Xue L, et al. TGF- β 1 enhances phagocytic removal of neuron debris and neuronal survival by olfactory ensheathing cells via integrin/MFG-E8 signaling pathway[J]. Mol Cell Neurosci, 2017, 85(1): 45—56.
- [21] Ogawa T, Takezawa K, Shimizu S, et al. Valproic acid promotes neural regeneration of olfactory epithelium in adult mice after methimazole-induced damage[J]. Am J Rhinol Allergy, 2014, 28(2): e95—99.
- [22] Wang X, Zhu Y, Ni D, et al. Intranasal application of glucocorticoid alleviates olfactory dysfunction in mice with allergic rhinitis[J]. Exp Ther Med, 2017, 14(5): 3971—3978.
- [23] Pekala K, Chandra RK, Turner JH. Efficacy of olfactory training in patients with olfactory loss: a systematic review and meta-analysis[J]. Int Forum Allergy Rhinol, 2016, 6(3): 299—307.
- [24] Konstantinidis I, Tsakiropoulou E, Bekiaridou P, et al. Use of olfactory training in post-traumatic and postinfectious olfactory dysfunction[J]. Laryngoscope, 2013, 123(12): E85—90.
- [25] Damm M, Pikart LK, Reimann H, et al. Olfactory training is helpful in postinfectious olfactory loss: a randomized, controlled, multicenter study[J]. Laryngoscope, 2014, 124(4): 826—831.
- [26] Altundag A, Cayonu M, Kayabasoglu G, et al. Modified olfactory training in patients with postinfectious olfactory loss[J]. Laryngoscope, 2015, 125(8): 1763—1766.

(收稿日期: 2019-06-02)