

嗅上皮基底细胞在嗅觉再生修复中 作用及其机制研究进展

舒平平¹ 周俊雷¹ 梁奕¹ 包笑妹² 黄智慧^{2*}

(¹温州医科大学第一临床医学院, 温州 325035; ²温州医科大学基础医学院神经科学研究所, 温州 325035)

摘要 嗅上皮神经元与外界环境直接接触, 易受各种损伤而死亡, 但嗅上皮具有终生再生的能力, 能减缓嗅觉功能的退化。这种强大的再生能力主要依赖于嗅上皮的干细胞, 即球形基底细胞(globose basal cells, GBCs)和水平基底细胞(horizontal basal cells, HBCs)。该文主要归纳整理了近年来关于这两种细胞的研究, 介绍它们在嗅上皮正常更新和损伤修复过程中的作用及机制, 为嗅觉功能减退的治疗研究提供理论依据, 也有利于进一步发掘它们在中枢神经系统修复治疗中的潜力。

关键词 嗅上皮; 神经发生; 干细胞; 水平基底细胞; 球形基底细胞

The Roles and Mechanisms of Olfactory Epithelial Basal Cells in the Olfactory Regeneration and Repair

Shu Pingping¹, Zhou Junlei¹, Liang Yi¹, Bao Xiaomei², Huang Zhihui^{2*}

(¹First Clinical Medical College, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China;

²Institute of Neuroscience, Department of Basic Medicine, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China)

Abstract The olfactory sensory neurons (OSNs) in the olfactory epithelium are exposed directly to the external environment, making them susceptible to damage, even to death, but the olfactory epithelium can regenerate itself for a lifetime to slow down the degeneration of olfactory system. The ability of regeneration of olfactory system mainly depends on the olfactory epithelial stem cells, globose basal cells (GBCs) and horizontal basal cells (HBCs). This review focuses on the recent studies on these two cells about their roles and mechanisms in normal olfactory epithelial regeneration and response to injury repair, to provide insights into the treatment of olfactory dysfunctions and explore the potential of their application in the treatment of central nervous system.

Keywords olfactory epithelium; neurogenesis; stem cells; horizontal basal cells; globose basal cells

嗅觉是哺乳动物的重要感觉系统。正常的嗅觉能帮助机体寻找食物和水, 能够对火、泄露的燃气及变质的食物等发出的特殊气味产生警觉, 甚至能影响人类的行为和情感体验^[1-2]。哺乳动物的嗅觉系统包括三个部分: 鼻腔和嗅上皮(olfactory

epithelium, OE)、初级嗅觉器嗅球(olfactory bulb, OB)以及包括梨状皮质在内的高级嗅觉结构^[3]。嗅上皮神经元直接暴露于外界环境, 易因物理、化学、生物等各种因素引起损伤, 导致嗅觉功能减退。一般而言, 哺乳动物的神经系统在损伤后难以恢复, 死

收稿日期: 2018-04-05 接受日期: 2018-09-12

国家自然科学基金(批准号: 31671071)、浙江省自然科学基金(批准号: LR18C090001)和温州医科大学本专科学科研立项(批准号: wyx2017101118)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0577-86699117, E-mail: hzhzju021@163.com

Received: April 5, 2018 Accepted: September 12, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31671071), the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Grant No.LR18C090001) and the Undergraduate Student Scientific Research Project of Wenzhou Medical University (Grant No.wyx2017101118)

*Corresponding author. Tel: +86-577-86699117, E-mail: hzhzju021@163.com

网络出版时间: 2018-11-27 17:02:35 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20181127.1702.010.html>

亡的神经元无法再生,也无法恢复原有的精细且特异地支配靶器官的功能。但嗅上皮是个特例,它具有强大的终生再生能力,损伤后嗅神经在解剖和功能上都能恢复^[4]。这种强大的再生能力依赖于嗅上皮干细胞。嗅上皮干细胞能自我更新和定向分化,产生嗅上皮内几乎所有的细胞类型。

除了嗅神经元之外,哺乳动物嗅上皮中还有许多非神经类型的细胞,可分为四大类。第一类是微绒毛覆盖的支持细胞(sustentacular cells, Sus cells),特异性表达生物转化酶和细胞角蛋白8和18^[5-6];第二类是微绒毛细胞(microvillus cells, MV cells),其数量较少,散在于上皮表面,呈梨形,表面有呈束状的微绒毛突向鼻腔,基底有一轴索状突起突入固有层,该细胞的功能目前还不清楚,推测可能为一类神经感觉细胞^[7];第三类是鲍曼氏腺(Bowman's duct-gland units),它是一种巨型多细胞体,由导管/腺细胞(duct/gland cells, D/G cells)构成;第四类是基底细胞群,可以分为两大类:水平基底细胞(horizontal basal cells, HBCs)和球形基底细胞(globose basal cells, GBCs)^[8]。水平基底细胞位于基底部,在电镜下呈扁平椭圆形^[9],多数情况下处于静止状态。球形基底细胞则是由形态相似但具有不同分子表型和分化能力的细胞构成的异质细胞群。虽然水平基底细胞和球形基底细胞都被看作是嗅上皮中的干细胞,但它们在嗅上皮发生和再生过程中扮演着截然不同的角色。

在哺乳动物中,嗅神经元的寿命为30~90天。新生神经元由基底细胞分化而来,补充衰老死亡的神经元,从而维持嗅上皮细胞的内稳态^[10-12]。分化成熟过程如下:球形基底细胞从嗅上皮基底向顶部迁移,神经树突逐渐向嗅上皮鼻腔面生长,在黏膜表面形成树突小结;同时神经轴突穿过基底膜进入黏膜下层,向嗅球方向生长,在嗅球的嗅小球层与僧帽细胞的树突形成突触连接,进一步分化为成熟嗅神经元。水平基底细胞在正常嗅上皮中保持静止状态,一般只在嗅上皮受到一定程度损伤情况下被激活。这种再生过程的调控机制精确而复杂,目前并不明朗。嗅神经元再生的调控机制对于研究中枢神经系统的损伤修复机制具有重要意义。本文就最近关于两种基底细胞在嗅上皮自我更新和损伤修复过程中的作用及机制的研究进行系统阐述。

1 球形基底细胞(GBCs)

1.1 球形基底细胞的干细胞潜能

球形基底细胞是嗅上皮特有的一类细胞。它们成簇聚集在水平基底细胞的表层,细胞与细胞之间有很大空隙。胸腺嘧啶类似物和有丝分裂相关蛋白标记显示,球形基底细胞是正常嗅上皮中主要的增殖群体^[13-14]。使用荧光激活细胞分类术(fluorescence activated cell sorting, FACS)分离纯化球形基底细胞进行体外培养,发现其能产生嗅上皮中几乎所有细胞类型,包括神经元、支持细胞、导管/腺细胞和球形基底细胞乃至水平基底细胞^[15-16]。球形基底细胞能自我增殖,也能由水平基底细胞分化产生。他莫昔芬依赖的p63条件性敲除实验表明,源自水平基底细胞的球形基底细胞也具有多向分化潜能和自我更新能力,并能持续超过6个月产生嗅神经元^[17-18]。球形基底细胞不仅负责嗅上皮神经元的自我更新,也是轻微损伤以及选择性损伤嗅神经元后嗅上皮再生的主要细胞^[19]。

1.2 球形基底细胞的转录因子谱

球形基底细胞在嗅上皮发生和再生的不同阶段表达不同转录因子,具有不同的分化潜能,表达的转录因子主要有Sox2、Pax6、Ascl1、Neurog1和NeuroD1等^[20-22],具体见表1。转录因子谱的差异在发育早期就已被确立,并在成熟之后持续存在。Sox2是公认的干细胞转录因子,在水平基底细胞和球形基底细胞中都有表达,对干细胞从激活到分化为神经元前体状态必不可少^[23]。在神经发生过程中,Sox2能促进神经元前体细胞增殖,增加其数量;而Pax6加速神经元的生成,促进其分化^[24]。在正常嗅上皮中,表达Sox2和Pax6但不表达神经源性的螺旋-环螺旋结构转录因子(Ascl、Neurog1和NeuroD1)的球形基底细胞可分为两种:干细胞GBCSTEM(stem cell-like GBC)和多能干细胞GBCMPP(multipotent GBC)^[25-26]。GBCSTEM的胸苷标记结果表明:它不进行有丝分裂,是一种持续标记细胞(label-retaining cells, LRC),能表达p27;GBCMPP由GBCSTEM生成^[14],表达Ki67,是一类增殖群体。Ascl1的表达促进球形基底细胞中的短暂扩充细胞向神经元分化,而Ascl3的表达促进其向鲍曼氏腺细胞分化^[27],Hes1的表达则促进球形基底细胞向支持细胞分化。嗅神经元前体细胞(immediate neuronal precursor GBC, GBCINP)特异表达Neurog1和NeuroD1^[24,28]。最后,

表1 球形基底细胞和水平基底细胞的分子标记物

细胞种类	分子标记	物种	参考文献	
Cell type	Marker	Species	References	
GBCs	NCAM	Mouse	[30]	
		Rat	[16]	
	GBC-1	Rat	[14]	
	GBC-2	Mouse	[15]	
	GBC-3	Rat	[31]	
	Sox2	Mouse	[24]	
	Pax6	Mouse	[24]	
	Ascl1	Rat	[22]	
	Neurog1	Mouse	[32]	
	NeuroD1	Rat	[22]	
	Lgr5	Mouse	[33]	
	Nestin	Rat	[31]	
	HBCs	Keratin 5	Mouse	[34-35]
		Keratin 14	Mouse	[34]
p63		Mouse	[17]	
ICAM1		Mouse	[37]	
Olig2		Rat	[38]	
PDGFR α		Rat	[37]	
NG2		Rat	[37]	

未成熟神经元(GAP-43阳性)在5~7天内发育成为表达嗅觉标记蛋白(olfactory marker protein, OMP)的成熟嗅神经元^[29]。而这种从干细胞到直接前体细胞的分化过程可被嗅上皮的直接损伤和嗅神经元的耗竭逆转。在正常或甲基溴(MeBr)损伤的嗅上皮中,无论是原有的还是从正常嗅上皮中移植而来的球形基底细胞(Neurog1阳性)都只能向神经元分化;而在嗅球切除术以及甲巯咪唑损伤后的嗅上皮中,原有的和从正常上皮移植的Neurog1阳性球形基底细胞均可表达Sox2和Pax6,表现出多向分化潜能:产生的细胞虽仍以神经元为主,但也有支持细胞等其他类型。同样地,Ascl1阳性细胞在损伤后恢复表达Sox2和Pax6,而且具有更强的多向分化潜能。Sox2是这种去分化过程的启动转录因子^[28]。因此,在嗅上皮中,这种从干细胞到直接前体细胞的分化过程并非严格单向的。

1.3 Lgr5可特异标记球形基底细胞的干细胞群

球形基底细胞有多种标记物(表1)。迄今为止,球形基底细胞中干细胞群的特异性标记物尚未确定。像Pax6、Sox2和Ascl1等分子并非特异表达于球形基底细胞。最近发现的成人干细胞的标记物Lgr5(leucine-rich repeat-containing G-protein coupled

receptor 5)或许是一个较合适标记物。它在新生和成年小鼠的球形基底细胞中专一表达。而且Lgr5阳性细胞维持嗅上皮的自我更新,在正常或损伤嗅上皮中分化为多种细胞类型^[33]。Lgr5是Wnt信号通路靶分子。Wnt通路已被证实在发育过程中参与了嗅上皮的增殖和神经发生,能诱导干细胞向神经元分化^[33,39]。在嗅上皮再生修复过程中,敲除腺瘤性结肠息肉病(adenomatous polyposis Coli, APC)基因导致Wnt通路过度激活,能使表达Lgr5的球形基底细胞大量增殖并促进神经发生;而敲除 β -链蛋白(β -catenin)基因导致Wnt通路阻断时,几乎完全没有神经发生。这表明,Wnt通路可促进Lgr5阳性球形基底细胞的增殖和随后的嗅上皮神经发生^[20]。综合考虑Lgr5在嗅上皮中的表达模式,以及在活性干细胞群中Lgr5和Wnt通路的功能^[33,40],认为Lgr5或许可以成为球形基底细胞中干细胞群的特异性标记物。

2 水平基底细胞(HBCs)

2.1 水平基底细胞的干细胞潜能

水平基底细胞是单层扁平细胞,直接结合并紧密附着于基膜。它于胚胎发育晚期出现,在出生后两周左右才形成完全分化的单层^[41]。在未成熟嗅上

皮的发育过程中, 存在两次水平基底细胞源性神经发生高峰期, 分别在出生后10天和4个月。而其他时间段水平基底细胞基本保持静止状态^[34]。如果把球形基底细胞看作活跃状态的干细胞, 则水平基底细胞可被认为是静息状态的干细胞。在正常嗅上皮中, 水平基底细胞数量较少, 寿命较长, 且大部分情况下处于静息状态。

水平基底细胞最初被称为嗅上皮中的干细胞^[42], 是基于观察损伤后嗅上皮的形态学和组织培养结果。体外培养的损伤后嗅上皮水平基底细胞表达分子谱发生改变, 例如不再表达黏附受体 $\beta 1$, 并开始有丝分裂。在培养7天后, >90%的细胞死亡, 有<7%的细胞分化成了两极或多极细胞, 有2%~3%的细胞持续增殖, 在培养14天后扩大为小细胞簇(4~30个细胞)和大细胞簇(100~1 000个细胞)。在含10% FBS培养液中, 较大的细胞簇(21~28天)产生了多分化形态的多迁移细胞, 具有神经元(如Nestin⁺)和胶质细胞(如S100⁺)的表型^[9,43]。之后通过各种遗传工具追踪发现, 水平基底细胞能够分化为嗅上皮中几乎所有细胞类型^[19,34]。水平基底细胞表达角蛋白5(K5)和角蛋白14(K14), 在其他组织上皮中, 有这两种标志的基底细胞往往是干细胞^[44]。老年小鼠的嗅上皮损伤后, 水平基底细胞仍能从静止、扁平向增殖、锥样的形态转化, 这种增殖分化的能力不因小鼠衰老而改变^[45]。从正常上皮纯化分离的水平基底细胞在体外培养时只能增殖不能分化^[15], 只有在原处接受损伤刺激后移植才表现出干细胞潜能^[18]。

目前有多种造成嗅觉损伤的模型。过于严重的嗅上皮损伤[如敌草腈(dichlorobenzonitrile, DCBN)引起的损伤]会导致水平基底细胞发生呼吸道上皮化生(respiratory epithelium, RE)^[46]; 而轻微的嗅上皮损伤或只损伤嗅神经元的嗅球切除术中, 大部分的水平基底细胞不能被激活。出现这种现象的原因可能是表面的球形基底细胞抑制了它们的活化^[19]。吸入甲基溴(MeBr)能激活水平基底细胞, 是因为甲基溴能选择性杀死嗅神经元和支持细胞, 并减少其他非神经细胞数量。活化的水平基底细胞主要分化为球形基底细胞, 继而扩增分化成神经元和其他类型上皮细胞^[17-18,36]。运用单细胞RNA测序结果表明支持细胞可从水平基底细胞直接分化产生^[47]。水平基底细胞能否直接产生其他类型嗅上皮细胞有待进一步的研究。甲基溴损伤1天后, 嗅上皮大部分增殖的

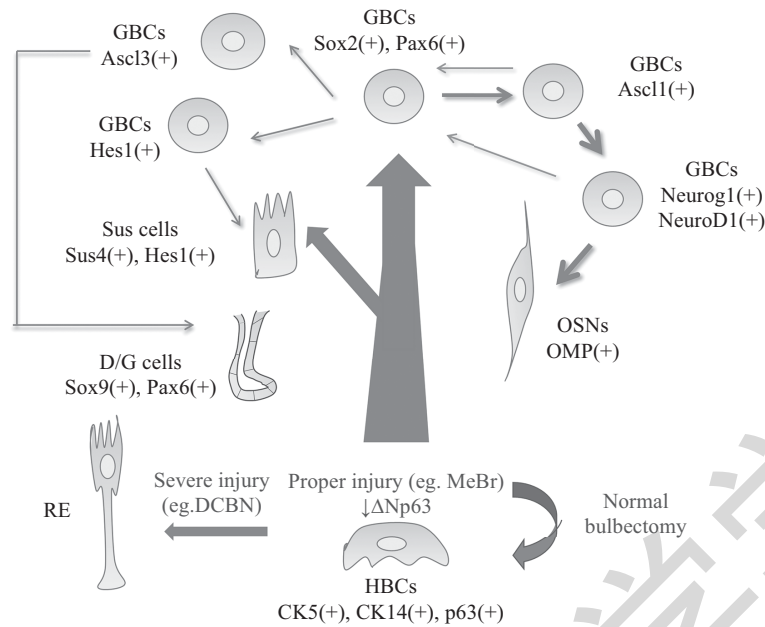
细胞是球形基底细胞, 而水平基底细胞(CK14标记)则处于分化状态。甲基溴损伤的嗅上皮在6~8周后便可完全重建^[24]。水平基底细胞在不同条件下的分化潜能如图1所示。

2.2 p63在调控水平基底细胞激活中的作用

目前对水平基底细胞的活化机制了解十分有限。值得注意的是, 水平基底细胞的活化往往伴随着或多或少的肿瘤蛋白p63(tumor protein p63, p63)基因表达的下调, 包括mRNA水平和蛋白质水平^[36]。p63基因主要编码两类蛋白质, 一类保留了氨基末端的反式激活域, 即Tap63; 而在另一类中, 该结构域被剪接, 由外显子替换, 称 $\Delta Np63$ 。每一类又根据C末端结构域的长度分为五种亚型, 从长到短依次为 α 、 β 、 δ 、 γ 、 ϵ 。 $\Delta Np63\alpha$ 蛋白亚型是嗅上皮p63编码的活化型。它在水平基底细胞中高表达, 而在其他细胞类型则不表达^[17]。损伤刺激引起p63表达水平的下调, 继而水平基底细胞分化为球形基底细胞等各种细胞类型^[17,36]。敲除p63基因的水平基底细胞能在未受损伤的条件下开始分化^[47]; 因病毒感染而过表达 $\Delta Np63\alpha$ 的嗅上皮在适宜损伤刺激后, 大部分水平基底细胞仍保持休眠静止状态。这些结果表明, p63的表达水平是决定水平基底细胞是否激活的主开关。在甲巯咪唑损伤模型初期, $\Delta Np63$ 表达的下调激活水平基底细胞, 使其分化为球形基底细胞。随着上皮逐渐修复, $\Delta Np63$ 的表达水平也逐渐上升, 使水平基底细胞从活化状态转为静止状态^[18]。

2.3 水平基底细胞在损伤修复再生中的作用机制

水平基底细胞具有独特的初级纤毛, 能够调控自身的激活、增殖和分化^[48]。支持细胞的终足与水平基底细胞的初级纤毛对接^[41], 提示损伤信号可能通过纤毛由支持细胞向水平基底细胞传导。纤毛的功能与Notch、Wnt和Hedgehog等通路有关, 这些通路都与脑神经发生有密切联系^[49-50]。Wnt和Notch通路在其他组织上皮中可以影响p63的表达水平^[40,51]。如前所述, Wnt通路已被证实在发育过程中参与嗅上皮的增殖和神经发生^[33,39], 能够诱导干细胞向神经元分化。Notch通路参与支持细胞的分化而非神经元的发生^[47]。它能维持转录因子 $\Delta Np63$ 的水平, 从而维持水平基底细胞的休眠静止状态^[28]。Notch1、Notch2以及Notch通路的下游转录因子Hes1均在水平基底细胞中表达^[18]。Hes1促进支持细胞分化形成^[52]。这些结果表明, Notch通路是决定基底细胞是



水平基底细胞和球形基底细胞的分化能力。在不同情况下,水平基底细胞具有不同的分化潜能:在正常嗅上皮和嗅球切除术后,水平基底细胞只进行自我更新;在嗅上皮严重损伤后(如DCBN损伤),活化的水平基底细胞进行呼吸道上皮化生;而在适宜损伤刺激(如MeBr)后, $\Delta Np63$ 表达下调,大多数水平基底细胞分化为球形基底细胞,继而产生神经元和其他各种细胞。球形基底细胞表达Hes1,向支持细胞分化;表达Ascl3,向导管/腺细胞分化;大部分球形基底细胞表达Ascl1后,继而表达Neurog1和NeuroD1,最后产生嗅神经元。在某些情况下,表达Ascl1或Neurog1和NeuroD1的球形基底细胞会恢复表达Sox2和Pax6,并表现出多向分化潜能。HBCs:水平基底细胞;GBCs:球形基底细胞;D/G cells:鲍曼氏腺细胞;Sus cells:支持细胞;OSNs:嗅神经元;RE:呼吸道上皮;DCBN:敌草腈。

HBCs and GBCs both have differentiative capacity. Under different conditions, HBCs' capacity is different. In normal OE, or following bullectomy, HBCs begin the process of self-proliferation. As a consequence of very severe injury (like DCBN), the activated HBCs contribute to respiratory metaplasia. In contrast, under the stimulation of proper injury, like MeBr, $\Delta Np63$ levels decline and many of the HBCs differentiate into GBCs, which in turn give rise to neurons and other epithelial cell types. As for GBCs, some among the GBCs express Hes1, and transition directly into Sus cells. Some express Ascl3, and turn to be D/G cells. Most of the Sox2/Pax6-expressing GBCs give rise to Ascl1-expressing GBCs, which in turn give rise to Neurog1/NeuroD1-expressing GBCs and in the end, expand the population of OSNs. In some cases, the Ascl1-expressing GBCs and the Neurog1/NeuroD1-expressing GBCs will initiate the expression of Sox2 and Pax6, which are expressed by more upstream GBCs, and evince multipotency either in situ or after transplantation. HBCs: horizontal basal cells; GBCs: globose basal cells; D/G cells: bowman's duct-gland cells; Sus cells: sustentacular cells; OSNs: olfactory sensory neurons; RE: respiratory epithelium; DCBN: dichlobenil.

图1 水平基底细胞和球形基底细胞的分化能力

Fig.1 The differentiative capacity of horizontal basal cells and globose basal cells

否向神经元分化的关键。虽然没有直接证据证明Hedgehog通路参与嗅上皮的发生发展,但Hedgehog通路的众多组件动态定位于纤毛,并且与其他系统的形态发生密切相关^[53],提示Hedgehog通路对于研究嗅上皮的损伤修复再生机制可能具有一定意义。

将脂肪干细胞移植到经DCBN严重损伤的嗅上皮中,嗅上皮能完全再生而非化生为呼吸道上皮,提示脂肪干细胞和水平基底细胞之间可能存在相互作用。其机制或将是未来研究中一个颇有前景的领域^[54]。通常认为,环境毒物造成的慢性持续性炎症反应会造成嗅神经元的丢失,导致嗅觉功能减退^[55]。而急性自限性炎症的情况似乎有所不同。在嗅上皮再生早期,炎症信使核转录因子NF- κ B(nuclear factor- κ B)的缺失会抑制水平基底细胞的增殖^[56],这提示,免疫

反应和嗅上皮再生之间有着密切联系。今后,进一步阐明水平基底细胞活化、增殖和分化的机制,有利于更好地研究其在嗅上皮损伤修复再生中的作用。

3 嗅上皮基底细胞的潜在治疗意义

球形基底细胞和水平基底细胞可以从鼻腔中获得,而不会对机体造成永久性损伤。这种易获得性和干细胞潜能,使它们不仅在嗅上皮嗅觉功能的恢复中起作用,也在中枢神经系统再生治疗方面具有良好的应用前景。

用FACS和GBC-3抗体分离纯化球形基底细胞之后进行电化学实验,发现其表面没有电压门控钠通道,且和神经干细胞一样能表达Nestin和Sox2,表

明其是一类神经干细胞群^[31], 具有补充丢失的神经元进而治疗神经退行性疾病的潜能^[57]。也有报道根据观察行为评分量表(the Basso Beattie Bresnahan locomotor rating scale, BBB)和形态学研究发现, 移植球形基底细胞能促进损伤脊髓的再生^[58]。同时, 也有研究发现, 大鼠的水平基底细胞会在体外表达少突胶质细胞前体细胞和星形胶质细胞的标志物(表1), 水平基底细胞和这两种细胞都从神经嵴发育而来^[35]。水平基底细胞移植到脊髓损伤和横切隐神经大鼠模型后, 能分化为少突胶质细胞和施旺细胞, 治疗中枢神经系统损伤^[37]。综上, 水平基底细胞和球形基底细胞都具有中枢神经系统修复的潜在治疗价值, 值得深入研究。

4 小结与展望

结合上述研究发现, 球形基底细胞是正常嗅上皮中主要的增殖群体, 能自我更新, 也能分化产生包括水平基底细胞在内的几乎所有细胞类型。不同阶段的球形基底细胞的转录因子谱不同, *Lgr5*可作为球形基底细胞干细胞群的特异标记。与活跃的球形基底细胞不同, 水平基底细胞被认为是静息状态的干细胞, 只在受到适宜损伤的情况下被激活。*p63*表达水平的下调是水平基底细胞激活的必要条件, 活化的过程可能涉及Notch、Wnt和Hedgehog等多条信号通路。嗅上皮中的球形基底细胞与水平基底细胞均具有强大的干细胞潜能。最近研究发现, 移植球形基底细胞能促进损伤脊髓的再生, 而水平基底细胞移植到脊髓损伤和横切隐神经大鼠模型后, 能分化为少突胶质细胞和施旺细胞从而治疗中枢神经系统损伤。此外, 脂肪干细胞和水平基底细胞之间可能的相互作用, 免疫反应和嗅上皮再生之间的联系, 也是具有研究价值的重要科学问题。

通常认为, *Sox2*和*Pax6*阳性且*Ascl1*阴性的水平基底细胞是干细胞。然而, 不同类型的球形基底细胞应对上皮损伤的干细胞潜力难以确定。此外, 神经元前体细胞和短暂扩充细胞具有强大的去分化能力。因此, 目前仍然无法明确地定义具有何种分子表型特征的球形基底细胞是干细胞。*Lgr5*作为特异性标记的可能性也需进一步明确。在水平基底细胞方面, 它在胚胎发育的嗅上皮晚期出现, 此时其他类型细胞已经完全发育^[36]; 在正常或只损伤神经细胞的嗅上皮中, 水平基底细胞保持静止; 而在非常严重

的损伤之后, 单靠仅存的水平基底细胞不但无法恢复所有细胞类型, 反而会导致呼吸道上皮化生。水平基底细胞的这些特性令人困惑。

我们还有许多问题无法回答。比如: 如何准确地确定嗅上皮中具有干细胞潜能的细胞? 如何激活干细胞? 什么因素决定了干细胞的分化方向? 表达*Ascl1*、*Neurog1*和*NeuroD1*的“下游”细胞, 如何恢复成为具有自我更新能力和多向分化潜力的干细胞? 这些问题的阐明, 将会有助于我们更好地了解嗅上皮再生的分子机制, 也有助于我们更好地应用嗅上皮干细胞治疗嗅觉疾病和其他神经系统疾病。

参考文献 (References)

- 1 Cheal M. Social olfaction: a review of the ontogeny of olfactory influences on vertebrate behavior. *Behav Biol* 1975; 15(1): 1-25.
- 2 Keller A, Malaspina D. Hidden consequences of olfactory dysfunction: a patient report series. *BMC Ear Nose Throat Disord* 2013; 13(1): 8.
- 3 Lledo PM, Gheusi G, Vincent JD. Information processing in the mammalian olfactory system. *Physiol Rev* 2005; 85(1): 281-317.
- 4 Schultz EW. Repair of the olfactory mucosa with special reference to regeneration of olfactory cells (sensory neurons). *Am J Pathol* 1960; 37: 1-19.
- 5 Ding XX, Porter TD, Peng HM, Coon MJ. cDNA and derived amino acid sequence of rabbit nasal cytochrome P450Nmb (P450IIIG1), a unique isozyme possibly involved in olfaction. *Arch Biochem Biophys* 1991; 285(1): 120-5.
- 6 Chen Y, Getchell ML, Ding X, Getchell TV. Immunolocalization of two cytochrome P450 isozymes in rat nasal chemosensory tissue. *Neuroreport* 1992; 3(9): 749-52.
- 7 Kusumakshi S, Voigt A, Hubner S, Hermans-Borgmeyer I, Ortalli A, Pyrski M, *et al.* A binary genetic approach to characterize TRPM5 cells in mice. *Chem Senses* 2015; 40(6): 413-25.
- 8 Graziadei GA, Graziadei PP. Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. II. Degeneration and reconstitution of the olfactory sensory neurons after axotomy. *J Neurocytol* 1979; 8(2): 197-213.
- 9 Carter LA, MacDonald JL, Roskams AJ. Olfactory horizontal basal cells demonstrate a conserved multipotent progenitor phenotype. *J Neurosci* 2004; 24(25): 5670-83.
- 10 Farbman AI. Olfactory neurogenesis: genetic or environmental controls? *Trends Neurosci* 1990; 13(9): 362-5.
- 11 Cowan CM, Roskams AJ. Apoptosis in the mature and developing olfactory neuroepithelium. *Microsc Res Tech* 2002; 58(3): 204-15.
- 12 Schwob JE. Neural regeneration and the peripheral olfactory system. *Anat Rec* 2002; 269(1): 33-49.
- 13 Schwartz Levey M, Chikaraishi DM, Kauer JS. Characterization of potential precursor populations in the mouse olfactory epithelium using immunocytochemistry and autoradiography. *J Neurosci* 1991; 11(11): 3556-64.
- 14 Jang W, Chen X, Flis D, Harris M, Schwob JE. Label-retaining, quiescent globose basal cells are found in the olfactory

- epithelium. *J Comp Neurol* 2014; 522(4): 731-49.
- 15 Chen X, Fang H, Schwob JE. Multipotency of purified, transplanted globose basal cells in olfactory epithelium. *J Comp Neurol* 2004; 469(4): 457-74.
 - 16 Huard JM, Youngtob SL, Goldstein BJ, Luskin MB, Schwob JE. Adult olfactory epithelium contains multipotent progenitors that give rise to neurons and non-neural cells. *J Comp Neurol* 1998; 400(4): 469-86.
 - 17 Fletcher RB, Prasol MS, Estrada J, Baudhuin A, Vranizan K, Choi YG, *et al.* p63 regulates olfactory stem cell self-renewal and differentiation. *Neuron* 2011; 72(5): 748-59.
 - 18 Schnittke N, Herrick DB, Lin B, Peterson J, Coleman JH, Packard AI, *et al.* Transcription factor p63 controls the reserve status but not the stemness of horizontal basal cells in the olfactory epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112(36): E5068-77.
 - 19 Leung CT, Coulombe PA, Reed RR. Contribution of olfactory neural stem cells to tissue maintenance and regeneration. *Nat Neurosci* 2007; 10(6): 720-6.
 - 20 Guillemot F, Joyner AL. Dynamic expression of the murine Achaete-Scute homologue Mash-1 in the developing nervous system. *Mech Dev* 1993; 42(3): 171-85.
 - 21 Cau E, Casarosa S, Guillemot F. Mash1 and Ngn1 control distinct steps of determination and differentiation in the olfactory sensory neuron lineage. *Development* 2002; 129(8): 1871-80.
 - 22 Guo Z, Packard A, Krolewski RC, Harris MT, Manglapus GL, Schwob JE. Expression of pax6 and sox2 in adult olfactory epithelium. *J Comp Neurol* 2010; 518(21): 4395-418.
 - 23 Gadye L, Das D, Sanchez MA, Street K, Baudhuin A, Wagner A, *et al.* Injury activates transient olfactory stem cell states with diverse lineage capacities. *Cell Stem Cell* 2017; 21(6): 775-90 e9.
 - 24 Packard AI, Lin B, Schwob JE. Sox2 and Pax6 play counteracting roles in regulating neurogenesis within the murine olfactory epithelium. *PLoS one* 2016; 11(5): e0155167.
 - 25 Chen B, Kim EH, Xu PX. Initiation of olfactory placode development and neurogenesis is blocked in mice lacking both Six1 and Six4. *Dev Biol* 2009; 326(1): 75-85.
 - 26 Manglapus GL, Youngtob SL, Schwob JE. Expression patterns of basic helix-loop-helix transcription factors define subsets of olfactory progenitor cells. *J Comp Neurol* 2004; 479(2): 216-33.
 - 27 Weng PL, Vinjamuri M, Ovitt CE. Ascl3 transcription factor marks a distinct progenitor lineage for non-neuronal support cells in the olfactory epithelium. *Sci Rep* 2016; 6: 38199.
 - 28 Lin B, Coleman JH, Peterson JN, Zunitch MJ, Jang W, Herrick DB, *et al.* Injury induces endogenous reprogramming and dedifferentiation of neuronal progenitors to multipotency. *Cell Stem Cell* 2017; 21(6): 761-74 e5.
 - 29 Rodriguez-Gil DJ, Bartel DL, Jaspers AW, Mobley AS, Imamura F, Greer CA. Odorant receptors regulate the final glomerular coalescence of olfactory sensory neuron axons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112(18): 5821-6.
 - 30 Miragall F, Kadmon G, Husmann M, Schachner M. Expression of cell adhesion molecules in the olfactory system of the adult mouse: presence of the embryonic form of N-CAM. *Dev Biol* 1988; 129(2): 516-31.
 - 31 Thakur A, Muniswami D, Tharion G, Kanakasabapathy I. Immunohistological and electrophysiological characterization of Globose basal stem cells. *Iran J Basic Med Sci* 2014; 17(4): 278-86.
 - 32 Krolewski RC, Packard A, Schwob JE. Global expression profiling of globose basal cells and neurogenic progression within the olfactory epithelium. *J Comp Neurol* 2013; 521(4): 833-59.
 - 33 Chen M, Tian S, Yang X, Lane AP, Reed RR, Liu H. Wnt-responsive Lgr5(+) globose basal cells function as multipotent olfactory epithelium progenitor cells. *J Cogn Neurosci* 2014; 34(24): 8268-76.
 - 34 Iwai N, Zhou Z, Roop DR, Behringer RR. Horizontal basal cells are multipotent progenitors in normal and injured adult olfactory epithelium. *Stem Cells* 2008; 26(5): 1298-306.
 - 35 Suzuki J, Yoshizaki K, Kobayashi T, Osumi N. Neural crest-derived horizontal basal cells as tissue stem cells in the adult olfactory epithelium. *Neurosci Res* 2013; 75(2): 112-20.
 - 36 Packard A, Schnittke N, Romano RA, Sinha S, Schwob JE. DeltaNp63 regulates stem cell dynamics in the mammalian olfactory epithelium. *J Neurosci* 2011; 31(24): 8748-59.
 - 37 Ohnishi Y, Iwatsuki K, Shinzawa K, Ishihara M, Moriwaki T, Umegaki M, *et al.* Adult olfactory sphere cells are a source of oligodendrocyte and Schwann cell progenitors. *Stem Cell Res* 2013; 11(3): 1178-90.
 - 38 Lu QR, Yuk D, Alberta JA, Zhu Z, Pawlitzky I, Chan J, *et al.* Sonic hedgehog—regulated oligodendrocyte lineage genes encoding bHLH proteins in the mammalian central nervous system. *Neuron* 2000; 25(2): 317-29.
 - 39 Wang YZ, Yamagami T, Gan Q, Wang Y, Zhao T, Hamad S, *et al.* Canonical Wnt signaling promotes the proliferation and neurogenesis of peripheral olfactory stem cells during postnatal development and adult regeneration. *J Cell Sci* 2011; 124(Pt 9): 1553-63.
 - 40 Nguyen BC, Lefort K, Mandinova A, Antonini D, Devgan V, Della Gatta G, *et al.* Cross-regulation between Notch and p63 in keratinocyte commitment to differentiation. *Genes Dev* 2006; 20(8): 1028-42.
 - 41 Holbrook EH, Szumowski KE, Schwob JE. An immunochemical, ultrastructural, and developmental characterization of the horizontal basal cells of rat olfactory epithelium. *J Comp Neurology* 1995; 363(1): 129-46.
 - 42 Duggan CD, Ngai J. Scent of a stem cell. *Nat Neurosci* 2007; 10(6): 673-4.
 - 43 Mulvaney BD, Heist HE. Regeneration of rabbit olfactory epithelium. *Am J Anat* 1971; 131(2): 241-51.
 - 44 Alonso L, Fuchs E. Stem cells of the skin epithelium. *Proce Natl Acad Sci USA* 2003; 100 Suppl 1: 11830-5.
 - 45 Brann JH, Ellis DP, Ku BS, Spinazzi EF, Firestein S. Injury in aged animals robustly activates quiescent olfactory neural stem cells. *Front Neurosci* 2015; 9: 367.
 - 46 Xie F, Fang C, Schnittke N, Schwob JE, Ding X. Mechanisms of permanent loss of olfactory receptor neurons induced by the herbicide 2,6-dichlorobenzonitrile: effects on stem cells and noninvolvement of acute induction of the inflammatory cytokine IL-6. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013; 272(3): 598-607.
 - 47 Fletcher RB, Das D, Gadye L, Street KN, Baudhuin A, Wagner A, *et al.* Deconstructing olfactory stem cell trajectories at single-cell

- resolution. *Cell Stem Cell* 2017; 20(6): 817-30 e8.
- 48 Joiner AM, Green WW, McIntyre JC, Allen BL, Schwob JE, Martens JR. Primary cilia on horizontal basal cells regulate regeneration of the olfactory epithelium. *J Neurosci* 2015; 35(40): 13761-72.
- 49 Kumamoto N, Gu Y, Wang J, Janoschka S, Takemaru K, Levine J, *et al.* A role for primary cilia in glutamatergic synaptic integration of adult-born neurons. *Nat Neurosci* 2012; 15(3): 399-405, S1.
- 50 Tong CK, Alvarez-Buylla A. SnapShot: adult neurogenesis in the V-SVZ. *Neuron* 2014; 81(1): 220-20 e1.
- 51 Barbieri CE, Barton CE, Pietenpol JA. Delta Np63 alpha expression is regulated by the phosphoinositide 3-kinase pathway. *J Biol Chem* 2003; 278(51): 51408-14.
- 52 Packard A, Giel-Moloney M, Leiter A, Schwob JE. Progenitor cell capacity of NeuroD1-expressing globose basal cells in the mouse olfactory epithelium. *J Comp Neurol* 2011; 519(17): 3580-96.
- 53 Berbari NF, O'Connor AK, Haycraft CJ, Yoder BK. The primary cilium as a complex signaling center. *Curr Biol* 2009; 19(13): R526-35.
- 54 Franceschini V, Bettini S, Pifferi S, Menini A, Siciliano G, Ognio E, *et al.* Transplanted human adipose tissue-derived stem cells engraft and induce regeneration in mice olfactory neuroepithelium in response to dichlobenil subadministration. *Chem Senses* 2014; 39(7): 617-29.
- 55 Imamura F, Hasegawa-Ishii S. Environmental toxicants-induced immune responses in the olfactory mucosa. *Front Immunol* 2016; 7: 475.
- 56 Chen M, Reed RR, Lane AP. Acute inflammation regulates neuroregeneration through the NF-kappaB pathway in olfactory epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017; 114(30): 8089-94.
- 57 Duan D, Lu M. Olfactory mucosa: a rich source of cell therapy for central nervous system repair. *Rev Neurosci* 2015; 26(3): 281-93.
- 58 Muniswami DM, Kanakasabapathy I, Tharion G. Globose basal cells for spinal cord regeneration. *Neural Regen Res* 2017; 12(11): 1895-904.