文章编号:1000-5404(2010)23-2483-05

论著

小鼠嗅黏膜中水通道蛋白 1 对嗅觉形成的作用

李小松[1,2],唐 玲[3],汪克建[1,2],骆世芳[1,2],漆 伟[1,2],侯良娟[1,2],孙善全[1,2],冉建华[1,2] (400016 重庆,重庆医科大学:基础医学院解剖学教研室[1],神经科学研究中心[2];402161 重庆,重庆医科大学附属永川医院神经内科[3])

【摘要】 目的 研究水通道蛋白 1(aquaporin 1, AQP1)在小鼠嗅黏膜中的表达模式及其对嗅觉形成的作用。方法 应用免疫荧光和免疫印迹技术研究野生型和 AQP1 基因敲除小鼠嗅黏膜中 AQP1 的表达差异;采用埋藏食物小球实验(含对照实验)、嗅觉迷宫实验(含对照实验)2 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 2 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 AQP1 基因敲除小鼠嗅黏膜中没有 AQP1 的表达;免疫荧光结果表明 AQP1 主要分布于嗅黏膜的血管内皮细胞和嗅神经束膜上。行为学检测结果显示,埋藏食物小球实验中第 1、2 天 2 组寻找食物时间差异具有统计学意义($P<0.05$),而第 3 天和对照实验之间无明显差异($P>0.05$);嗅觉迷宫实验中 2 组除对照实验外,寻找食物时间差异具有统计学意义($P<0.05$)。气体刺激性诱发电位结果显示,2 组小鼠嗅黏膜在不同气压强度饱和 Trithylamine 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,AQP1 基因敲除小鼠嗅觉电位的波幅低于野生型小鼠,但差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 AQP1 主要分布在嗅黏膜的血管内皮细胞和嗅神经束膜上;AQP1 基因敲除小鼠的嗅觉敏感性较野生型小鼠有一定程度的降低,但嗅神经元兴奋性没有差异。AQP1 可能在嗅觉信号传递过程中发挥作用。

【关键词】 水通道蛋白 1;小鼠;嗅黏膜
【中图法分类号】 R322.94;R341;R394.2 【文献标志码】 A

Effect of aquaporin 1 on formation of olfaction in olfactory mucosa of mice

Li Xiaosong[1,2], Tang Ling[3], Wang Kejian[1,2], Luo Shifang[1,2], Qi Wei[1,2], Hou Liangjuan[1,2], Sun Shanquan[1,2], Ran Jianhua[1,2] ([1]Department of Anatomy, College of Basic Medical Sciences, [2]Neuroscience Research Center, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [3]Department of Neurology, Affiliated Yongchuan Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 402161, China)

【Abstract】 Objective To study the expression of aquaporin 1 (AQP1) in olfactory mucosa of mice and its effect on formation of olfaction. Methods Different expressions of AQP1 in olfactory mucosa of wild-type and AQP1-knocked out mice were detected by immunoblot and immunofluorescence. Different olfactory functions of mice were assayed by buried food pellet and olfactory maze test and by recording the electric potential on odorant-stimulated electroolfactogram (EOG), respectively. Results Immunoblot and immunofluorescence showed that AQP1 was not expressed in olfactory mucosa of AQP1-knocked out mice. Immunofluorescence image revealed that AQP1 was mainly expressed in endothelial cells of blood vessels and in perineuria of olfactory lamina propria. Olfactory behavioral assay showed that the deference in time to find foods on days 1 and 2 of buried food pellet test was significant ($P<0.05$). However, no difference was observed on day 3 between buried food pellet test and control test ($P>0.05$). The difference in time to find foods was significant on all days of olfactory maze test ($P<0.05$) but not of the control test ($P>0.05$). The potential wave on odorant-stimulated EOG under different psi and the action of saturated trithylamine was similar in wild-type and AQP1-knocked out mice. The amplitude of odorant-stimulated electroolfactogram increased in a pressure-dependent manner. Under the same pressure, the amplitude of odorant-stimulated electroolfactogram was lower in AQP1-knocked out mice than in wild-type mice ($P>0.05$). Conclusion AQP1 is mainly expressed in endothelial cells of blood vessels and in perineuria of olfactory lamina propria. Olfactory sensitivity is lower in AQP1-

【基金项目】 国家自然科学基金(30470608,30500171);重庆市科委留学回国人员直通车项目(CSTC2010BB5098)
【通信作者】 冉建华,电话:(023)68175549,E-mail:ranjianhua2003@yahoo.com.cn

knocked out mice than in wild type mice with no difference in olfactory neuron excitability. AQP1 may play an important role in transmission of olfaction.

[Key words] aquaporin1; mice; olfactory mucosa

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30470608,30500171) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2010BB5098).
Corresponding author: Ran Jianhua, Tel: 86-23-68175549, E-mail: ranjianhua2003@yahoo.com.cn

水通道蛋白家族(aquaporins,AQPs)是一类存在于细胞膜上特异性转运水分子的通道蛋白,目前在哺乳动物体内鉴定出的13个成员(AQP0~AQP12)广泛分布于体内与水代谢密切相关的组织中[1-3]。其中,AQP1是最早被鉴定出来,也是研究最为充分的成员,其独特的"沙漏"三维结构中间是仅允许水分子通过的孔道,汞离子或者有机汞可通过与其细胞外E环上半胱氨酸(Cys-189)结合而抑制其活性[4]。AQP1选择性分布于体内与液体吸收或分泌有关的上皮细胞和内皮细胞中,在包括尿液形成、脑脊液循环、房水循环、内耳淋巴液循环、胆汁的分泌与浓缩、呼吸道表面液体分泌等多种病理生理过程中发挥重要作用[5-10]。近年研究发现AQP1在大鼠嗅觉系统中表达[11-13],但对于其具体功能尚缺乏研究。本研究拟通过免疫荧光、免疫印迹技术检测小鼠嗅黏膜中AQP1的表达,嗅觉行为学检测、气体刺激性嗅觉电位(electroolfactogram,EOG)记录比较野生型和AQP1基因敲除小鼠的嗅觉差异,探讨AQP1在小鼠嗅觉系统中表达的作用和机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

8~12周龄体质量匹配、雌雄不拘的野生型和AQP1基因敲除小鼠各9只(CD1),由Alan S. Verkman教授(the University of California, San Francisco,UCSF)馈赠。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)。rAQP1抗体(Millipore,美国),Goat-OMP抗体(Millipore,美国),Mouse-GFAP(Santa Cruz,美国),Texas红驴抗兔荧光二抗(The Jackson Laboratory,美国),FITC驴抗山羊荧光二抗(Millipore,美国),RIPA裂解液(Sigma,美国)。

1.2 方法

1.2.1 动物选择及喂养 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。

1.2.2 免疫荧光检测 将完成行为学测试的小鼠(野生型和AQP1基因敲除小鼠各3只)用3.5%水合氯醛(350 mg/kg)腹腔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%的硝酸脱钙48~72 h(容积比,避光脱钙防止硝酸见光分解),常规石蜡包埋,取作连续冠状切片,片厚6 μm,裱片于APES处理过的玻片上,60 ℃烘烤24 h,然后40 ℃烘烤48~72 h,室温储存。石蜡切片经二甲苯和梯度酒精脱蜡水化后,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rAQP1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。

1.2.3 免疫印迹检测 将完成行为学测试的小鼠(野生型和AQP1基因敲除小鼠各3只)腹腔麻醉,断头后收集中、上鼻甲及鼻中隔上份的黏膜,加入200 μl裂解液研磨成碎片后移入EP管中(冰上操作),4 ℃离心12 000×g,30 min;取上清测定蛋白浓度。样品按60 μg蛋白/道上样于10% SDS-PAGE gels(Invitrogen,美国),加入电泳缓冲液,120 mV,2.5 h;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rAQP1抗体多克隆抗体(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3次后用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,暗房内压片,曝光、显影、冲洗。

1.2.4 行为学测试

1.2.4.1 埋藏食物小球实验(buried food pellet test) 参照经典的方法[14]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AQP1基因敲除小鼠各9只)进食,每只给予鼠料0.2 g/d,自由饮水;同时这3 d内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10 min。测试前将0.5 g的食物小球埋藏在鼠料表面以下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鼠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笼中。休息4 h后,将食物小球随机置放在鼠料表面不同位置,重复实验作为对照。所有实验以300 s(5次测试的平均值)内未找到食物小球的小鼠即定为嗅觉丧失。

1.2.4.2 嗅觉迷宫实验(olfaction maze test) 参考Lu等[15]方法自制圆形迷宫,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。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。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部位。所有实验以300 s(5次测试的平均值)内未找到食物小球

的小鼠即定为嗅觉丧失。

1.2.5 嗅觉电位测试 参考 Lu 等[15]方法将完成行为学测试的小鼠(野生型和 AQP1 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 2 个进口,第 1 个进口连接持续送入湿化空气的开关,第 2 个进口连接含有饱和 Trithylamine 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:通过电控开关给予不同气体压力的饱和 Trithylamine,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。

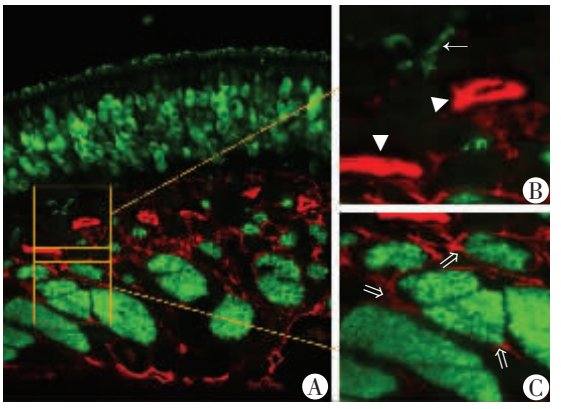
1.3 统计学分析

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组间两两比较的 t 检验。

2 结果

2.1 免疫荧光检测

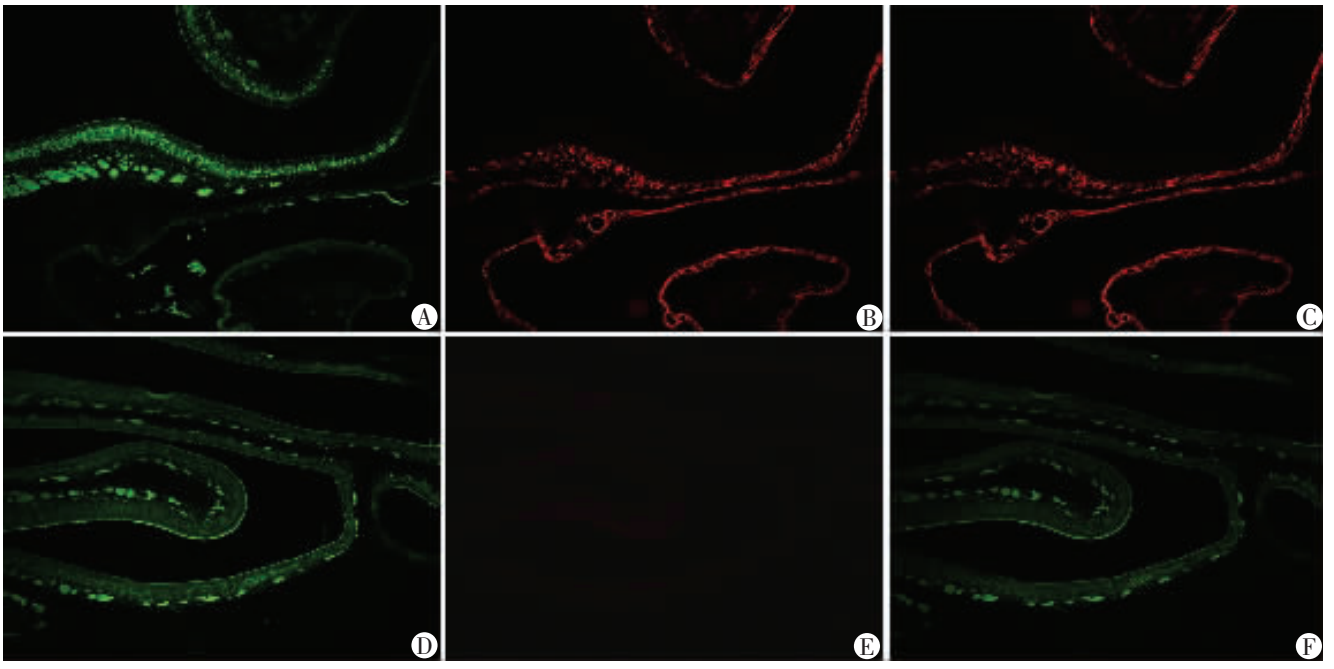
红色荧光标记 rAQP1 和绿色荧光标记 Goat-OMP 在野生型和 AQP1 基因敲除小鼠鼻腔嗅黏膜中表达的结果见图 1、2。AQP1 基因敲除小鼠整个嗅黏膜中没有红色荧光分布,而在嗅黏膜上皮层中可见重叠排列且细胞质呈绿色荧光的嗅神经元表达,其向鼻腔内伸出绿色细条状的周围突末端在嗅黏膜表面相互联接呈点状绿色荧光分布,在嗅黏膜固有层中亦可见聚集成团、大小不一发绿色荧光的嗅神经束;野生型小鼠嗅黏膜上皮层中未见红色荧光分布,但可见 OMP 阳性呈绿色荧光的嗅神经元表达,其表达特点与 AQP1 基因敲除小鼠中的表达模式相似;嗅黏膜固有层中 AQP1 表达强烈,部分散在分布表达极强的红色荧光在固有层结缔组织中形成形态各异、大小不一、线条较粗与血管相似的圈状结构,部分表达较强线条较细的红色荧光包绕在绿色的嗅神经束周围形成,还有部分染色稍强的红色荧光分布在基底层中点状绿色荧光的周围。野生型和 AQP1 基因敲除小鼠在鼻腔中嗅上皮和呼吸道上皮连接处均可见 OMP 阳性呈绿色荧光的嗅神经元表达从有到无的过渡现象,AQP1 基因敲除小鼠在此处未见红色荧光分布,而野生型小鼠的红色荧光在固有层中表达。



↑:嗅神经;⇑:神经束膜;△:血管

A:AQP1 在野生型小鼠嗅黏膜中的表达(×400);B:AQP1 在血管内皮细胞上以及穿基底膜嗅神经周围的表达(×600);C:AQP1 在嗅神经束膜上的表达(×600);绿色荧光为 Goat-OMP 阳性染色,红色荧光为 rAQP1 阳性染色

图 2 免疫荧光检测 AQP1 在野生型小鼠鼻腔嗅黏膜中的表达

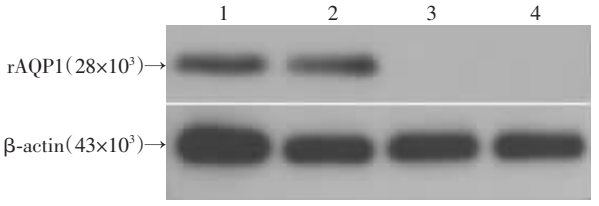


A~C:野生型小鼠;D~F:AQP1 基因敲除小鼠;A、D:Goat-OMP 阳性染色;B、E:rAQP1 阳性染色;C、F:Goat-OMP 和 rAQP1 染色叠加

图 1 免疫荧光检测 AQP1 在小鼠鼻腔嗅黏膜中的表达 (×100)

2.2 免疫印迹检测

野生型小鼠嗅黏膜组织液中可检测到相对分子质量为28×10³的阳性条带，而AQP1基因敲除小鼠嗅黏膜组织液中未见相应条带（图3）。



1、2：野生型小鼠；3、4：AQP1基因敲除小鼠

图3 Western blot检测AQP1在野生型小鼠和AQP1基因敲除小鼠中的表达

2.3 行为学测试

埋藏食物小球实验结果显示，第1天检测到野生型小鼠寻找到食物的时间为（32.5±7.3）s，AQP1基因敲除小鼠则为（58.7±14.2）s；第2天检测到野生型小鼠寻找到食物的时间为（26.1±6.0）s，AQP1基因敲除小鼠则为（44.0±7.8）s；第3天检测到野生型小鼠寻找到食物的时间为（26.4±5.5）s，AQP1基因敲除小鼠则为（31.6±6.2）s。对照实验中野生型和AQP1基因敲除小鼠寻找到食物的时间分别为（19.2±5.3）s和（22.3±7.3）s。其中，在第1、2天测试中野生型和AQP1基因敲除小鼠寻找食物的时间之间差异明显（$P<0.05$），而第3天和对照实验中2组小鼠寻找食物的时间具有一定差异，但无统计学意义（$P>0.05$）。

嗅觉迷宫实验结果显示，第1天检测到野生型小鼠寻找到食物的时间为（43.1±4.0）s，AQP1基因敲除小鼠则为（72.7±12.4）s；第2天检测到野生型小鼠寻找到食物的时间为（33.5±3.8）s，AQP1基因敲除小鼠则为（58.2±6.1）s；第3天检测到野生型小鼠寻找到食物的时间为（28.7±3.1）s，AQP1基因敲除小鼠则为（37.3±5.4）s。阳性对照中野生型和AQP1基因敲除小鼠寻找到食物的时间分别为（20.2±4.6）s和（24.9±5.8）s。其中，所有测试中野生型和AQP1基因敲除小鼠寻找食物的时间之间差异明显（$P<0.05$），而对照实验中具有一定差异，但无统计学意义（$P>0.05$）。

2.4 嗅觉电位测试

在给予0.05、0.2 psi和0.4 psi不同气体压力强度的饱和Trithylamine作用于暴露充分的嗅黏膜后，均记录到先负后正，波幅随气压增加而增大的嗅觉电位；其中，野生型小鼠的嗅觉电位分别为（0.18±0.09）、（0.42±0.03）mV和（0.71±0.03）mV；AQP1基因敲除小鼠的嗅觉电位分别为（0.17±0.08）、（0.41±0.06）mV和（0.71±0.06）mV；统计分析结果表明，在相同气压强度的饱和Trithylamine作用下，野生型小鼠嗅觉电位的波幅与AQP1基因敲除小鼠无明显差别（$P>0.05$）。2组小鼠嗅黏膜在分别给予0.05、0.2 psi和0.4 psi不同压力强度的空气作用后均未能记录到嗅觉电位。

3 讨论

鼻腔作为呼吸道的一部分，其上皮的液体转运十分频繁，从而可以湿化进入鼻腔的空气，同时维持上皮层内局部水、电解质微环境的稳定而保持嗅神经元的功能活性[13,15]。AQP1具有特异性转运水分子的功能，并广泛分布于体内与水代谢密切相关的组织和上皮，因此本研究采用免疫印迹和免疫荧光方法检测AQP1在嗅黏膜中的表达特征。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28×10³的AQP1表达，而AQP1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。野生型和AQP1基因敲除小鼠嗅黏膜的免疫荧光结果表明，AQP1主要分布于嗅黏膜的固有层中。大量研究表明，AQP1分布于体内与液体转运密切相关的部位[5-10]，并在除脑以外的心血管系统中表达丰富[16]，由此推测固有层中表达最强烈的圈状结构可能是血管内皮，但还需要与血管内皮细胞特异性的标记物Ⅷ因子共表达后证实这一推测；包绕在嗅神经束周围表达较强的红色荧光提示AQP1可能分布于神经束膜上，参与了嗅神经束的保护和促进神经信号传递的过程，部分染色稍强分布在基底层中点状绿色荧光周围的红色荧光提示AQP1表达的神经束膜从嗅神经元中枢突穿过基底层进入固有层后就包绕在其周围，以上观察与Ablimit等[13]研究结果相似。

以上形态学研究结果提示AQP1主要分布于嗅黏膜的固有层血管内皮和神经束膜上，而AQP1分布的功能意义如何目前尚缺乏相关研究。最近有研究显示，脊髓被根神经节细胞膜上的AQP1可通过与Na离子通道协同作用调节痛觉和温度觉的传递[17]；那么嗅黏膜中的AQP1是否与嗅觉信号的形成和传递有关？为此，本研究对野生型和AQP1基因敲除小鼠采用2种行为学方法进行嗅觉检测。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AQP1基因敲除小鼠寻找食物的时间均随测试次数的增加而逐渐下降，但2组之间存在明显差别；埋藏食物小球实验中第1、2天2组之间的差异具有统计学意义（$P<0.05$），而第3天和对照实验中2组小鼠寻找食物时间无明显差异（$P>0.05$）；嗅觉迷宫实验中2组除对照实验外，所有测试时间点的差异具有统计学意义（$P<0.05$）。由于本实验中对各组小鼠寻找食物进行了预先的训练，因此得到寻找食物时间的减少这一结果除了与嗅觉系统受损有关外，还不能排除与小鼠嗅觉相

关的其他感觉甚至高级皮质功能的改变有关。实验均未出现大于 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 2 种实验结果均提示 AQP1 基因敲除小鼠在同一时间点寻找食物的时间较野生型小鼠延长,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 AQP1 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使用于嗅觉评价的方法,主要包括电刺激性和气体刺激性[18]。本研究中采用气体刺激性嗅觉诱发电位主要是通过采用特殊的嗅质——Trithylamine 作用于嗅黏膜中嗅神经元顶膜上的受体,二者相互作用后开启相应的离子通道,导致细胞去极化从而在上皮层表面产生负向电流的一种方法。因此,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 AQP1 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 Trithylamine 作用在 2 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 AQP1 基因敲除小鼠稍大,但无统计学意义($P>0.05$),可见气体刺激性嗅觉诱发电位检测结果不能解释 2 组间小鼠行为学上的差异。对于行为学和嗅觉电位结果出现差异的原因,我们认为行为学测试中检测到的 AQP1 基因敲除小鼠嗅觉敏感性下降可能与其在神经束膜上的表达有关,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功能的完整性,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,因此还需要进一步的实验证实。

参考文献:

[1] Ogushi Y, Kitagawa D, Hasegawa T, *et al*. Correlation between aquaporin and water permeability in response to vasotocin, hydrin and {beta}-adrenergic effectors in the ventral pelvic skin of the tree frog Hyla japonica[J]. J Exp Biol, 2010, 213(Pt 2):288 - 294.

[2] Kim J E, Ryu H J, Yeo S I, *et al*. Differential expressions of aquaporin subtypes in astroglia in the hippocampus of chronic epileptic rats [J]. Neuroscience, 2009, 163(3):781 - 789.

[3] 邱国平, 孙善全, 刘辉, 等. AQP9 在脑出血大鼠脑组织中的表达变化[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(5):402 - 405.

[4] Buck T M, Wagner J, Grund S, *et al*. A novel tripartite motif involved in aquaporin topogenesis, monomer folding and tetramerization [J]. Nat Struct Mol Biol, 2007, 14(8):762 - 769.

[5] Bouley R, Palomino Z, Tang S S, *et al*. Angiotensin Ⅱ and hypertonicity modulate proximal tubular aquaporin 1 expression [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2009, 297(6):F1575 - F1586.

[6] Satoh J, Tabunoki H, Yamamura T, *et al*. Human astrocytes express aquaporin-1 and aquaporin-4 *in vitro* and *in vivo*[J]. Neuropathology, 2007, 27(3):245 - 256.

[7] Fukuda M, Nakanishi Y, Fuse M, *et al*. Altered expression of aquaporins 1 and 4 coincides with neurodegenerative events in retinas of spontaneously diabetic Torii rats[J]. Exp Eye Res, 2010, 90(1):17 - 25.

[8] Lopez I A, Ishiyama G, Lee M, *et al*. Immunohistochemical localization of aquaporins in the human inner ear[J]. Cell Tissue Res, 2007, 328(3):453 - 460.

[9] Li L, Zhang H, Ma T, *et al*. Very high aquaporin-1 facilitated water permeability in mouse gallbladder[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2009, 296(4):G816 - G822.

[10] Jesse N M, McCartney J, Feng X, *et al*. Expression of ENaC subunits, chloride channels, and aquaporins in ovine fetal lung:ontogeny of expression and effects of altered fetal cortisol concentrations[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2009, 297(2):R453 - R461.

[11] Furukawa M, Shimoda H, Kajiwara T, *et al*. Topographic study on nerve-associated lymphatic vessels in the murine craniofacial region by immunohistochemistry and electron microscopy [J]. Biomed Res, 2008, 29(6):289 - 296.

[12] Ablimit A, Aoki T, Matsuzaki T, *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(5):481 - 488.

[13] Ablimit A, Matsuzaki T, Tajika Y, *et al*. Immunolocalization of water channel aquaporins in the nasal olfactory mucosa[J]. Arch Histol Cytol, 2006, 69(1):1 - 12.

[14] Nathan B P, Yost J, Litherland M T, *et al*. Olfactory function in apoE knockout mice[J]. Behav Brain Res, 2004, 150(1/2):1 - 7.

[15] Lu D C, Zhang H, Zador Z, *et al*. Impaired olfaction in mice lacking aquaporin-4 water channels[J]. FASEB J, 2008, 22(9):3216 - 3223.

[16] Tewari N, Kalkunte S, Murray D W, *et al*. The water channel aquaporin 1 is a novel molecular target of polychlorinated biphenyls for in utero anomalies[J]. J Biol Chem, 2009, 284(22):15224 - 15232.

[17] Zhang H, Verkman A S. Aquaporin-1 tunes pain perception by interaction with Na(V)1.8 Na^+ channels in dorsal root ganglion neurons [J]. J Biol Chem, 2010, 285(8):5896 - 5906.

[18] London A J, Kimmelman J, Emborg M E. Research ethics. Beyond access *vs* protection in trials of innovative therapies [J]. Science, 2010, 328(5980):829 - 830.

(收稿:2010-06-15 修回:2010-07-13)

(编辑 龙 亮)