

## 腺苷酸环化酶 3 缺失下调小鼠嗅觉受体基因表达

周艳芬<sup>1),2)</sup>, 王伟娜<sup>1)</sup>, 袁焕娜<sup>1)</sup>, 张梦迪<sup>1)</sup>, 吴向博<sup>1)</sup>,  
王亚文<sup>3)</sup>, 王晓婷<sup>4)</sup>, 王振山<sup>1)</sup>\*

(<sup>1)</sup>河北大学生命科学学院,河北 保定 071002;<sup>2)</sup>河北省生物工程技术研究中心,河北 保定 071002;

<sup>3)</sup>河北大学预防医学与卫生事业管理系,河北 保定 071000;<sup>4)</sup>河北大学医学院,河北 保定 071000)

**摘要** 主要嗅觉表皮组织(MOE)是哺乳动物感知气味分子的重要器官,气味诱导是嗅觉受体神经元(ORN)活动的起点,嗅觉受体(OR)结合气味分子后通过环腺苷酸(cAMP)信号通路向下游传递信号。腺苷酸环化酶 3(AC3)是此通路中的重要分子。为了探讨 AC3 缺失对小鼠 MOE 内 ORs 基因表达的影响,本文以 AC3 敲除型小鼠(AC3<sup>-/-</sup>)和野生型小鼠(AC3<sup>+/+</sup>)为材料,采用荧光定量 PCR(qRT-PCR)、荧光原位杂交(FISH)技术分析了部分 ORs 基因及与其相关因子在 MOE 中的表达。qRT-PCR 表明,3 月龄 AC3<sup>-/-</sup>小鼠 MOE 中嗅觉受体 *Olf15*、*Olf16*、*Olf533*、*Olf536*、*Olf1507* 和 *Olf642* 的表达量均显著下降。出生后 PND7、PND30 和 PND90 三个不同发育时期的 AC3<sup>-/-</sup>小鼠 MOE 原位杂交显示,嗅觉受体 *Olf15*、*Olf536* 和 *Olf1507* 表达的细胞数目均减少。进一步 qRT-PCR 分析发现,3 月龄 AC3<sup>-/-</sup>小鼠嗅觉受体相关因子 *Rtp1*、*Rtp2*、*Reep1*、*Lhx2*、*Emx2* 和 *Ric-8b* 的表达也均发生显著下调。由此推测,AC3 缺失导致的 ORs 及其相关因子的表达下调可能是嗅觉行为障碍的原因之一。

**关键词** 腺苷酸环化酶 3; 主要嗅觉表皮组织; 嗅觉受体神经元; 嗅觉受体基因

**中图分类号** Q956

## The Expression of Olfactory Receptors and Related Genes is Decreased in Mice with Deletion of Adenylyl Cyclase 3

ZHOU Yan-Fen<sup>1),2)</sup>, WANG Wei-Na<sup>1)</sup>, YUAN Huan-Na<sup>1)</sup>, ZHANG Meng-Di<sup>1)</sup>,  
WU Xiang-Bo<sup>1)</sup>, WANG Ya-Wen<sup>3)</sup>, WANG Xiao-Ting<sup>4)</sup>, WANG Zhen-Shan<sup>1)</sup>\*

(<sup>1)</sup>College of Life Sciences, Hebei University, Baoding 071002, China; <sup>2)</sup>Research Centre of Bioengineering of Hebei Province, Baoding 071002, China; <sup>3)</sup>Department of Preventive Medicine and Health Management, Hebei University, Baoding 071000, China;

<sup>4)</sup>College of Medicine, Hebei University, Baoding 071000, China)

**Abstract** Main olfactory epithelium(MOE) is a primary organ for odorant detection. The odour sensing signaling is induced by odorant binding to odorant receptors (ORs) and then sequentially launches the cAMP signal pathway. Adenylyl cyclase 3 (AC3) is an important component of the olfactory cAMP signal pathway. In the present study, we used fluorogenic quantitative PCR and *in situ* hybridization approaches to study the expression of *Olf15*, *Olf16*, *Olf533*, *Olf536*, *Olf1507* and *Olf642* in MOEs of AC3 knock-out (AC3<sup>-/-</sup>) and wild-type (AC3<sup>+/+</sup>) mice of different ages, and found that it is significantly down-regulated in MOEs of AC3<sup>-/-</sup> mice. Furthermore, the expression of transcription factors, *Lhx2* and

收稿日期: 2017-07-18; 修回日期: 2017-10-09; 接受日期: 2017-10-11

国家自然科学基金(No. 31171191, 31471178); 河北省自然科学基金(C2016201008)和河北省巨人计划项目(No. 201235)资助

\* 通讯作者 Tel: 15232271056; E-mail: zswang@hbu.edu.cn

Received: July 18, 2017; Revised: October 9, 2017; Accepted: October 11, 2017

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 31471178 and 31171191); Natural Science Foundation of Hebei Province of China (No. C2016201008), and Grant Project in Hebei Province of China (No. 201235)

\* Corresponding author Tel: 15232271056; E-mail: zswang@hbu.edu.cn

*Emx2*, transport proteins, *Rtp1* and *Rtp2*, and coupling G protein cofactor, *Ric-8b*, is also significantly down-regulated in MOEs of *AC3*<sup>-/-</sup> mice. Thus, we speculate that the down regulation of ORs and the related transcription factors in *AC3*<sup>-/-</sup> mice may lead to defective olfactory detection.

**Key words** adenylyl cyclase 3; main olfactory epithelium; olfactory receptor neurons; olfactory receptor genes

嗅觉在动物的觅食、避害、求偶、个体间信号识别及繁衍后代等行为中起重要作用<sup>[1]</sup>。主要嗅觉表皮组织(main olfactory epithelium, MOE)是嗅觉感知的重要器官<sup>[2]</sup>。MOE 由数层细胞组成,从基底至顶层依次为:水平型与球型干细胞构成的基底层;未成熟嗅觉受体神经元(immature olfactory receptor neurons, iORN)和成熟嗅觉受体神经元(mature olfactory receptor neurons, mORN)构成的中间层;支持细胞构成的顶层<sup>[3, 4]</sup>。嗅觉受体神经元(olfactory receptor neurons, ORN)为双极神经元,胞体位于 MOE 中,其树突末端膨大形成嗅泡(knobs),并放射状伸出 10~30 根用于气味感知的纤毛,纤毛交织成网形成纤毛层,其轴突延伸并汇聚成束,由胶质细胞包裹,形成嗅神经,靶向投射至嗅球(olfactory bulb)。

在小鼠 MOE 中,嗅觉信号的感知活动发生在 mORN 的纤毛末端,气味分子首先与嗅觉受体(odorant receptors, ORs)结合后,激活嗅觉特异性 G 蛋白(olfactory related G protein, Golf)、腺苷酸环化酶 3(adenylate cyclase 3, AC3),促进 cAMP 生成,进而触发环核苷酸门控离子通道(cyclic nucleotide-gated channel, CNG)开放,细胞膜去极化产生动作电位,完成嗅觉冲动的形成与传导<sup>[5-7]</sup>。AC3 是嗅觉 cAMP 信号通路中的关键分子,AC3 缺失小鼠嗅电图(EOG)信号完全被阻断,母鼠识别幼仔气味并施予母性关爱行为的能力丧失,雄性求偶能力下降<sup>[5, 8, 9]</sup>。MOE 中存在的其他亚型 AC,如 AC2 和 AC4 也不能补偿 AC3 缺失引起的嗅觉功能的丧失<sup>[7, 10]</sup>。利用基因芯片对 AC3 缺陷型小鼠 MOE 进行分析表明,ORs 家族有 407 个成员表达发生下调<sup>[11, 12]</sup>,说明 AC3 缺失影响 ORs 家族的表达。Lyons 等<sup>[13]</sup>研究表明,ORs 的表达也可以诱导和调控 AC3 的表达。这些结果表明,AC3 与 ORs 之间存在着密切的相互作用。而 AC3 缺失如何影响小鼠 MOE 中 ORs 的表达?还有待进一步阐明。

小鼠嗅觉系统中有 1 200 多种 ORs<sup>[2]</sup>。正常情况下,一个 ORN 只选择性表达一个 OR 基因,并且

每个单一性表达的 OR 基因在 MOE 中都有其特定的表达区域<sup>[14, 15]</sup>。自 OR 基因家族被鉴定并克隆以来,研究人员对 ORs 基因从表观遗传调控、转录及转录后调控、ORs 选择概率的调控等多方面、多角度进行研究发现,OR 超家族成员保守性强,不同 OR 成员同源性很高,难以制备有效的抗体用来检测不同 OR 成员的蛋白质表达及定位<sup>[2, 13, 16, 17]</sup>。本研究以出生后 7 d(PND7)、30 d(PND30)和 90 d(PND90)三个年龄段的 *AC3*<sup>-/-</sup> 和同窝出生的野生型小鼠 MOE 组织为材料,利用荧光定量 PCR 对部分 ORs 基因及相关因子的表达进行检测,分析 AC3 缺失对 ORNs 发育和成熟的影响,以及对与 ORs 功能相关的转录因子、辅助因子、转运蛋白表达的影响,并采用荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)技术,对部分 ORs 进行定性定量检测,以明确 AC3 基因对 ORs 基因表达的重要影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

*AC3*<sup>+/-</sup>(C57BL/6 J)小鼠饲养于河北大学实验动物中心 SPF 级动物房。后代小鼠提取 DNA 进行基因型鉴定,选取同窝出生的 PND7、PND30 和 PND90 三个年龄段的 *AC3*<sup>-/-</sup> 和 *AC3*<sup>+/+</sup> 小鼠作为实验材料。实验动物的所有处理方法和操作程序,均符合中华人民共和国科学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》,并得到河北大学动物伦理及关爱委员会的批准。

### 1.2 总 RNA 的提取及单链 cDNA 的合成

取小鼠 MOE,Trizol(Invitrogen)法提取总 RNA 并反转录为单链 cDNA, -20 °C 保存,用于 qRT-PCR。

### 1.3 荧光定量 PCR

从 NCBI 数据库检索 ORs 基因和 OR 相关因子基因的 mRNA 序列,分别根据其序列使用 Primer 5 设计引物(Table 1, 2)。以管家基因  $\beta$ -actin 为内参,20  $\mu$ L 反应体系中包括 10  $\mu$ L 2  $\times$  SYBR Mix (Transgen Biotech), 2  $\mu$ L 正向及反向引

物,1 μL cDNA 模板和 7 μL 无酶水。PCR 反应于荧光定量 PCR 仪(Agilent Technologies),所有试验重复 3 次。以野生型小鼠表达量为对照,利用  $2^{-\Delta\Delta ct}$  法对实验结果进行分析<sup>[18]</sup>, $P < 0.05$  具有统计学意义。

Table 1 Primer sequences of odorant receptors and β-actin

OR gene	Primers (5′ – 3′)	Accession No.
<i>Olf15</i>	F: AGACCTTGCCTTTACTACCAG	NM_008762. 2
	R: GATCAAATGCCATCACCAC	
<i>Olf533</i>	F: TCTAAAAGCAATGGGTAATGA	BC147473. 1
	R: GGATCACAAAAAGGATTTCAC	
<i>Olf536</i>	F: AGCCCAAATGGTGTGATTTC	NM_146520. 2
	R: CAACTTGCTGTCTGTGCTGTC	
<i>Olf16</i>	F: CCTCCATTGCCTACCTCA	NM_008763. 2
	R: TGTAGACAACAGGGTTCAGC	
<i>Olf1507</i>	F: GGGCCATGTGGACAGCAGGG	NM_001170918. 1
	R: AGGCCAGTTCGATCACCTGAGGT	
<i>Olf642</i>	F: ATCATCATCCGCAGTTTC	NM_146329. 1
	R: ACAGGGCAAGCGTATCAG	
β-Actin	F: AAATCGTGCGTGACATCAAA	NM_007393. 3
	R: AAGGAAGGCTGGAAGAGAGC	

Table 2 Primer sequences of odorant receptors related factors

Genes	Primers (5′ – 3′)	Accession No.
<i>Rtp1</i>	F: GTACCTGGAACCTTCATGCCTCAGGC	NM_001004151. 2
	R: CACGCATGCGCACCGAACCAG	
<i>Rtp2</i>	F: GCAGTACCTGGAGCAACATGCCT	NM_001008230. 3
	R: CGCATGCGCACTGAGCCAACA	
<i>Reep1</i>	F: ATGGTGCTCCTGCTCCCTCGG	NM_178608. 4
	R: AGGGTTCTAGCGCGTGCCCG	
<i>Lhx2</i>	F: GGGCTAATCCGCTGGGTCT	NM_010710. 4
	R: GGTAGGGCTGGTCACGAT	
<i>Emx2</i>	F: GGCTCACAGTCTCAGTCTTAC	NM_010132. 2
	R: GACTCGCTGCTTGCTAG	
<i>Ric-8b</i>	F: CCATAGCCAGTGTATTTTCAGC	AY940667. 1
	R: AGATGTGACAAATCGACCAGA	

Table 3 Primer sequences of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) probes

OR genes	Probe primers (5′ – 3′)	Restriction enzymes	Accession numbers
<i>Olf15</i>	F: TTCTGGCGCAAGGAAGAC	<i>EcoR</i> I	NM_008762. 2
	R: CTGGCCGTTTGCATCTCT	<i>Hind</i> III	
<i>Olf536</i>	F: TCTAAAAGCAATGGGTAATGA	<i>Hind</i> III	NM_146520. 2
	R: AGAGATCCTAGGCCCCCATA	<i>Pst</i> I	
<i>Olf1507</i>	F: TTTTAAATTGTCCTGACAAACTGG	<i>Hind</i> III	NM_001170918. 1
	R: TCTGATTCTCTCAGTCCCTTCA	<i>EcoR</i> I	

以小鼠 cDNA 为模板,分别扩增目的片段,其大小在 200 nt ~1 000 nt 之间。采用胶回收法对目的基因回收,利用相应的限制性内切酶对回收产物酶切,与 *pSPT18* 质粒连接,将重组质粒转入 *E. coli*

1.4 荧光原位杂交探针的制备及其检测

在 NCBI 中检索部分 ORs 的 mRNA 序列,用 Primer Premier5 进行探针引物设计,并在上下游引物两端分别加入 *pSPT18* 质粒(Roche, DIG RNA Labeling Kit SP6/T7)中恰当的酶切位点(Table 3)。

*JM109* 中,利用菌落 PCR 验证重组子,并选取 2 ~ 3 个阳性克隆由生工生物工程(上海)有限公司测序鉴定。将测序正确的克隆扩大培养,利用碱裂解法提取重组质粒,随后对重组质粒进行单酶切,以线性

化质粒为模板进行体外转录 (DIG RNA Labeling Kit, 11175025910, Roche) 制备探针, DNase I 处理, 乙醇沉淀后溶于 30  $\mu$ L 水中。Dot 印迹实验检测 DIG 标记效率, 将可用于 FISH 的探针, 保存于  $-20^{\circ}\text{C}$  备用。

1.5 小鼠样本处理及荧光原位杂交

选取 PND7、PND30 和 PND90 的  $AC3^{+/+}$  和  $AC3^{-/-}$  健康小鼠, 乌拉坦麻醉, 4% 多聚甲醛 (PFA) 灌注固定。取完整鼻腔于多聚甲醛溶液中固定、脱钙、脱水、包埋, 从小鼠鼻尖到嗅小球以 12  $\mu$ m 连续切片, 取具有完整的 4 个 OR 表达区域的切片<sup>[19]</sup>。按 Ishii 等<sup>[20]</sup> 原位荧光杂交 (FISH) 方法, 分别对  $AC3^{+/+}$  和  $AC3^{-/-}$  小鼠的 MOE 组织切片 ( $n \geq 3$ ) 进行杂交。激光共聚焦显微镜 (Olympus IX81) 观察拍摄每一样本, 在每一样本的相同位置 (约 400  $\mu$ m 前后) 分别各选取 6 张切片进行荧光原位杂交, 每张切片选取相同位置 (背部区域) 的 3 个视野计数阳性细胞。

1.6 统计学方法

采用 SPSS19.0 统计分析, 实验数据用均数  $\pm$  标准误 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较采用独立样本  $t$  检验。  $P < 0.05$  具有统计学意义。

2 结果

2.1  $AC3^{-/-}$  小鼠 MOE 中部分 ORs 表达下降

ORs 可以分为 2 大类型: Class I 和 Class II。Class I 有 160 个 ORs, 是进化上最古老的基因群<sup>[21]</sup>。Class II 有 1 271 个 ORs, 主要存在于哺乳动物中, 用于检测挥发性化学分子<sup>[22]</sup>。该类型 ORs 基因成簇分布于基因组约 51 个基因座上。每个基因簇有 10 个及以上数量的 ORs 基因, 平均长约 350 kb, 最大基因簇有约 262 个不同 ORs<sup>[23]</sup>。小鼠 ORs 家族成员遍布于除 12 和 Y 染色体以外的其他染色体上。由于不同基因簇的 ORs 基因座位不同, 其指导 ORNs 将轴突汇聚并投射到对应嗅球区域, 以获得嗅觉<sup>[14, 15, 24]</sup>。为了明确  $AC3$  缺失后小鼠 MOE 中部分 ORs 表达是否发生改变, 根据小鼠 ORs 基因的分类和在染色体上的基因座位, 选择不同分类、不同染色体和对应嗅球的 ORs 基因进行 qRT-PCR (Table 4)。

与野生型小鼠相比, 3 月龄  $AC3^{-/-}$  小鼠嗅觉受体  $Olf15$ 、 $Olf16$ 、 $Olf533$ 、 $Olf536$ 、 $Olf1507$  和  $Olf642$  的表达量均显著降低 (Fig. 1), 且  $P < 0.01$ 。

Table 4 The classes of the OR genes tested

OR gene	Class	Chromosome
<i>Olf15</i>	II	16
<i>Olf16</i>	I	1
<i>Olf533</i>	II	7
<i>Olf536</i>	II	7
<i>Olf1507</i>	II	14
<i>Olf642</i>	I	7

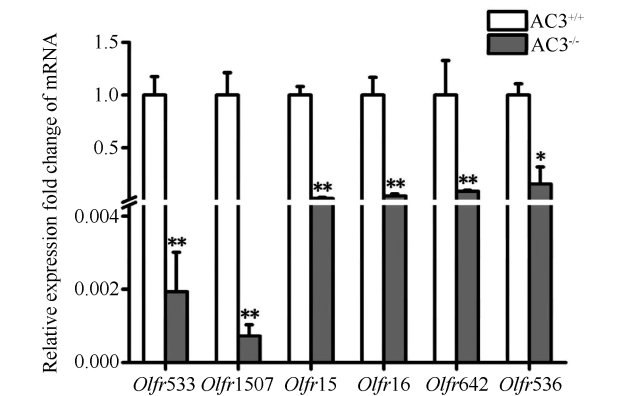


Fig. 1 Relative expression levels of ORs tested by qRT-PCR Main olfactory epitheliums (MOEs) from  $AC3^{-/-}$  ( $n = 3$ ) and wild type ( $AC3^{+/+}$ ) mice ( $n = 3$ ) at PND90 were dissected. Total RNA was isolated using the traditional TRIzol method. cDNA was synthesized using the PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser. The relative expression level of *Olf15*, *Olf16*, *Olf533*, *Olf536*, *Olf1507* and *Olf642*, respectively, was determined by qRT-PCR, with  $\beta$ -actin as an internal control. Data are represented as mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). \*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$

2.2 不同年龄  $AC3^{-/-}$  小鼠 MOE 中部分 ORs 的表达均下降

小鼠每一个 OR 的表达都被限制在 MOE 特定的区域内, 而且表达一个已知的 OR 基因的 ORNs 向嗅球中一组特定的神经纤维球发射轴突<sup>[14]</sup>。根据 OR 的表达区域, MOE 被分为 4 个连续的区域 zone 1 ~ 4。ORs 通过 ORNs 分别投射到嗅球的对应部分: zone 1 对应嗅球背部区域 (dorsal), Zone 2-3 对应嗅球中间区域 (middle), Zone 4 对应嗅球侧部和腹部区域 (ventral)<sup>[15, 24, 25]</sup>。Class I ORs 大多数表达于 MOE 的 zone 1<sup>[25]</sup>, Class II ORs 主要表达于 zone 2 ~ 4 的特定区域<sup>[24, 26]</sup>, 而 zone 2 ~ 4 的许多 ORs 表达不局限于一个区域内, 而是跨区域分布<sup>[14, 27]</sup>。ORs 家族成员成簇分布于不同染色体的基因簇上, 表达会受到不同的调控, 而每个基因簇上可以表达多个 ORs。因此, ORs 家族成员同源性较高<sup>[28]</sup>。为了避免原位杂交时 ORs 表达的相互影响,



本研究选取位于不同染色体、不同基因簇的 *Olf15*、*Olf1507* 和 *Olf536* 基因进行检测,对上述 3 个 ORs 进行探针引物设计 (Table 5), 分别制备探针, 并对 PND7、PND30 和 PND90 不同发育阶段的野生型小鼠和 *AC3*<sup>-/-</sup> 小鼠 MOE 进行原位荧光杂交, 以检测几个 ORs 在 *AC3*<sup>-/-</sup> 小鼠 MOE 中的相对表达量。

**Table 5** Gene cluster and chromosome location of the ORs tested

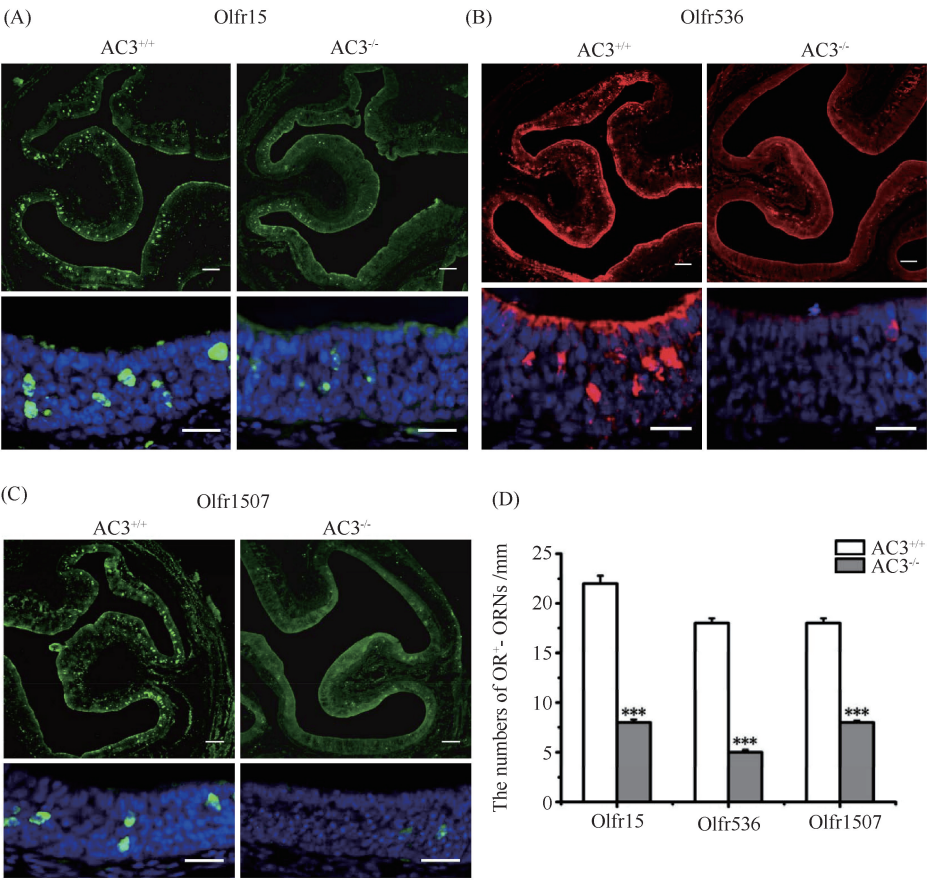
OR gene	Gene cluster	Chromosome
<i>Olf15</i>	256	16
<i>Olf1507</i>	244	14
<i>Olf536</i>	252	7

在 PND7 小鼠 MOE 中, *Olf15*、*Olf536* 和 *Olf1507* 基因在 *AC3*<sup>-/-</sup> 小鼠中表达阳性细胞数量均显著减少。而且在相同激发光强度下, *AC3*<sup>-/-</sup> 组单个 OR<sup>+</sup>-ORN 阳性信号亮度也明显减弱 (Fig. 2 A, B, C)。对 PND7 野生型小鼠和 *AC3*<sup>-/-</sup> 小鼠 MOE 中 OR<sup>+</sup>-ORNs 细胞数进行统计, 量取每张切片

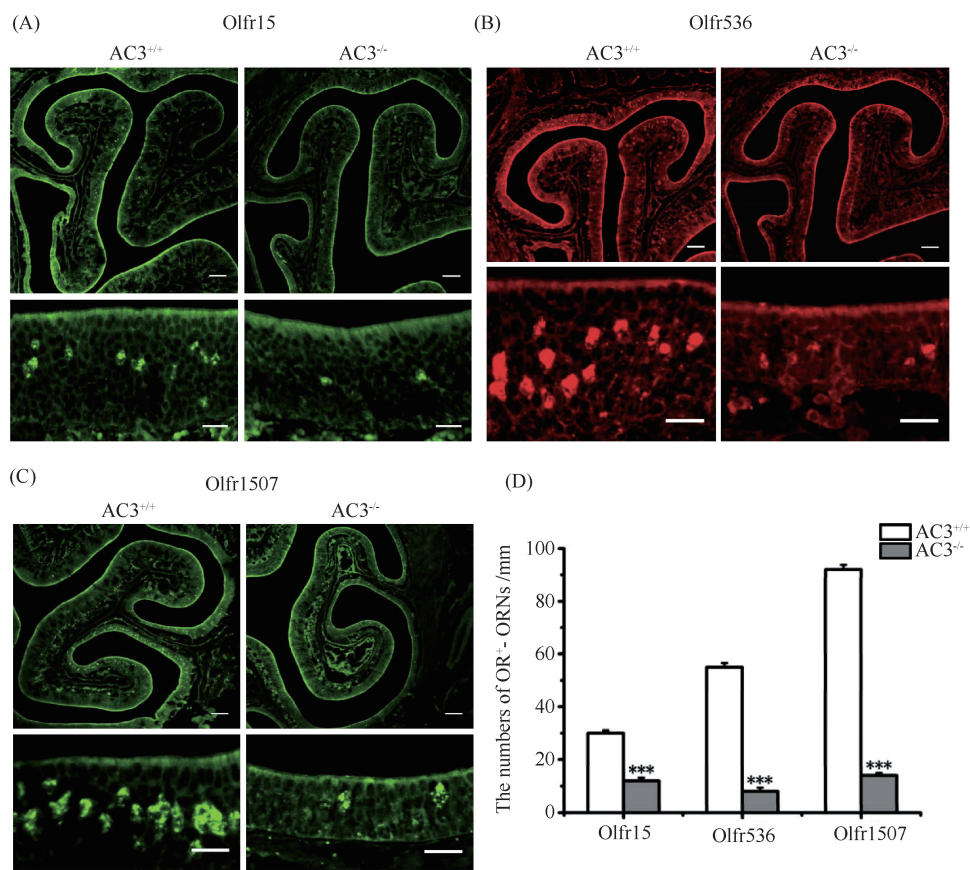
的 MOE 基底膜长度, OR<sup>+</sup>-ORNs 密度为每 mm 的阳性细胞数。结果表明, PND7 *AC3*<sup>-/-</sup> 组 *Olf15* 下调约 65%, *Olf536* 下调约 71%, *Olf1507* 下调约 55% (Fig. 2 D)。

在 PND30 小鼠 MOE 中, 3 个嗅觉受体基因 *Olf15*、*Olf536* 和 *Olf1507* 在 *AC3*<sup>-/-</sup> 小鼠表达的细胞数量进一步减少, 但这种细胞数量的减少并不是均匀的分布, 同等条件下, *AC3*<sup>-/-</sup> 组大部分阳性亮度较野生组更弱 (Fig. 3 A, B, C)。对 PND30 野生型小鼠和 *AC3*<sup>-/-</sup> 小鼠 MOE 中 OR<sup>+</sup>-ORNs 细胞数进行统计表明, *Olf15* 下调约 51%, *Olf536* 下调约 79%, *Olf1507* 下调约 81% (Fig. 3D)。

在 PND90 小鼠 MOE 中, *AC3*<sup>-/-</sup> 组小鼠神经元层严重受损, MOE 的复合层状结构异常。与此相一致, 3 个受体基因 *Olf15*、*Olf536* 和 *Olf1507* 表达的细胞数目也显著减少。 *Olf15* 也称为 *MOR256-17* 或 *OR3*, 最早表达于 E12, 且在 E16 表达丰度较高, 是表达较早的 ORs 之一<sup>[29, 30]</sup>, 在 PND90 小鼠中未

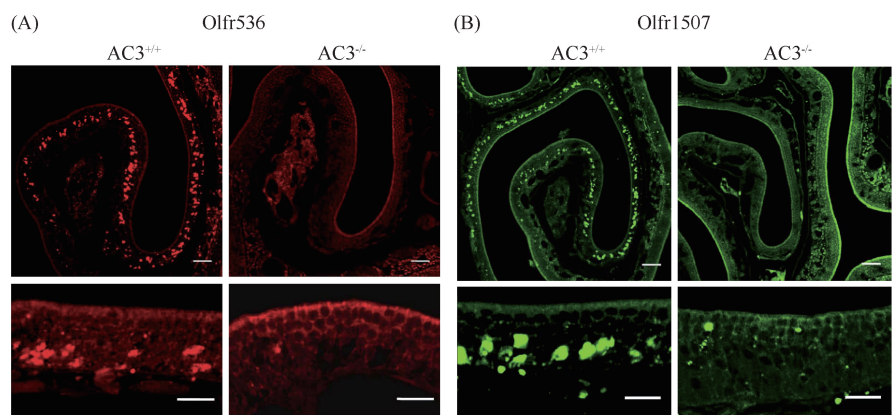


**Fig.2** Expression of *Olf15*, *Olf536*, *Olf1507* in MOEs of PND7 mice The MOE sections were cut in PND7 *AC3* knock-out (*AC3*<sup>-/-</sup>) and wild-type (*AC3*<sup>+/+</sup>) mice. Three target mRNAs were hybridized with DIG-labeled probes followed by reaction with appropriate antibodies, *Olf15*<sup>+</sup>-ORNs -FISH (A), *Olf536*<sup>+</sup>-ORNs -FISH (B), *Olf15*<sup>+</sup>-ORNs -FISH (C). The numbers of OR<sup>+</sup>-ORNs in MOEs per mm (D) are summarized. Scale bar in the upper panel: 100 μm, scale bar in the lower panel: 20 μm, (n = 3, \*\*\*P < 0.001)



**Fig. 3 Expression of *Olf15*, *Olf536*, *Olf1507* in MOEs of PND30 mice** The MOE sections were cut in PND30 *AC3* knock-out (*AC3*<sup>-/-</sup>) and wild-type (*AC3*<sup>+/+</sup>) mice. Three target mRNAs were hybridized with DIG-labeled probes followed by reaction with appropriate antibodies, *Olf15*<sup>+</sup>-ORNs-FISH (A), *Olf536*<sup>+</sup>-ORNs-FISH (B), *Olf15*<sup>+</sup>-ORNs-FISH (C). The numbers of OR<sup>+</sup>-ORNs in MOEs per mm (D) are summarized. Scale bar in the upper panel: 100 μm, scale bar in the lower panel: 20 μm, (*n* = 3, \*\*\**P* < 0.001)

检测出阳性细胞。*Olf536* 和 *Olf1507* 基因在 *AC3*<sup>-/-</sup> 组小鼠中阳性细胞数目显著降低 (Fig. 4 A, B)。在小鼠 PND90 时期,野生小鼠 MOE 中对应的 ORs 表达的阳性细胞数目明显且数量多,而 *AC3* 敲

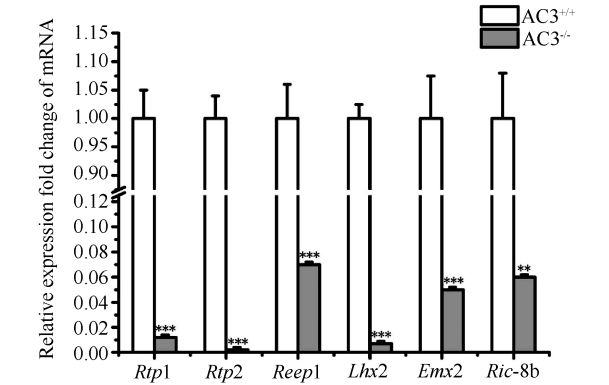


**Fig. 4 Expression of *Olf536* and *Olf1507* in MOEs of PND90 mice** The MOE sections were cut in PND90 *AC3* knock-out (*AC3*<sup>-/-</sup>) and wild-type (*AC3*<sup>+/+</sup>) mice. Two target mRNAs were hybridized with DIG-labeled probes followed by reaction with appropriate antibodies, *Olf536*<sup>+</sup>-ORNs -FISH(A), *Olf1507*<sup>+</sup>-ORNs -FISH(B). Scale bar in the upper panel: 100 μm, scale bar in the lower panel: 20 μm

除小鼠 MOE 中 OR<sup>+</sup>-ORNs 细胞数几乎不可见,故未作统计。

### 2.3 AC3 缺失下调 MOE 内嗅觉受体相关因子的表达

*Lhx2* 参与 ORs 基因的选择性表达并在 ORNs 分化发育晚期起重要作用<sup>[31]</sup>。*Emx2* 结合到 ORs 启动子区,激活大部分 ORs 转录。qRT-PCR 显示 (Fig. 5),*AC3* 缺失后,*Lhx2*、*Emx2* 表达量显著下调,分别下调 99% 和 95% ( $P < 0.001$ )。OR 功能表达所需的转运蛋白和辅助蛋白基因 *Rtp1*、*Rtp2*、*Reep1* 分别下调 98%、99.8% 和 94% ( $P < 0.001$ )。OR 偶联 G 蛋白所需的辅助因子 *Ric-8b* 下调 94.5% ( $P < 0.01$ )。



**Fig. 5 qRT-PCR analysis for relative mRNA expressions of *Rtp1*, *Rtp2*, *Reep1*, *Lhx2*, *Emx2* and *Ric-8b*** MOEs from *AC3* knock-out (*AC3*<sup>-/-</sup>) ( $n = 3$ ) and wild-type (*AC3*<sup>+/+</sup>) mice ( $n = 3$ ) at PND90 were obtained. The relative expression levels for *Rtp1*, *Rtp2*, *Reep1*, *Lhx2*, *Emx2* and *Ric-8b* were determined by qRT-PCR analysis, with  $\beta$ -actin used as an internal control. Data are represented as mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$

### 3 讨论

*AC3* 在小鼠气味探测和 ORNs 轴突导向形成过程中具有十分重要的作用。但是其在出生后 ORNs 发育过程中对 ORs 表达的尚未详细报道。本研究首先利用荧光定量 PCR,检测 3 月龄小鼠 ORs 基因的表达,再利用 FISH 技术检测 ORNs 发育过程中部分 ORs 表达的数量。结果表明,*AC3* 缺陷型小鼠 MOE 中嗅觉受体 *Olf15*、*Olf16*、*Olf533*、*Olf536*、*Olf1507* 和 *Olf642* 基因表达量显著下降。由于小鼠出生 7 d 时 ORNs 分裂最为活跃,且 ORs 已起始表达<sup>[32]</sup>,因此, FISH 技术选用 PND7、PND30 和 PND90 小鼠进行分析。结果表明,*AC3* 缺失后小鼠在出生 7 d 时与正常组比较,MOE 厚度未见明显差

别 (Fig. 2),说明 *AC3* 缺失小鼠出生后到 PND7 时没有明显影响嗅神经的发育。随着年龄的增长,*AC3* 缺失小鼠 MOE 变薄 (Fig. 3, 4)。同时,*AC3* 缺失时,嗅觉受体 *Olf15*、*Olf536* 和 *Olf1507* 在 PND7 时表达的细胞数目均显著减少。PND30 时小鼠神经元层的更替已趋于稳定,嗅觉组织相比于 PND7 小鼠发育更为完善,成熟神经元已占 MOE 中细胞总量的大部分,*Olf536* 和 *Olf1507* 表达的下调幅度比小鼠 PND7 时更为显著。PND90 时小鼠已成年,*AC3* 敲除组小鼠的 OR-FISH 结果显示,几乎无相对应 ORs 阳性细胞,可能是 ORNs 大量死亡造成的,也可能是单个细胞中过于低的表达丰度在 FISH 实验中不能被检测到。

有研究报道,*AC3* 通过下调组蛋白赖氨酸特异性去甲基化酶 1 (lysine specific demethylase1, LSD1) 的水平,调控嗅觉受体基因的转录与表达。ORs 转录的启动依赖组蛋白 H3K9 的去甲基化,它的单一性选择则依赖于组蛋白 H3K9、H3K4 位点去甲基化,LSD1 具有去甲基化功能,因此在嗅觉受体已经稳定表达的成年时期,LSD1 迅速下调<sup>[13]</sup>。*AC3* 通过下调 LSD1,促使已被选择的嗅觉受体稳定表达。因此,我们推测本研究中 *AC3* 缺失可能通过影响 ORs 甲基化水平,导致 ORs 选择或 (和) 表达缺陷。

本室最新研究发现,与 *AC3*<sup>+/+</sup> 小鼠相比较,在所检测 PND7、PND30、PND90 的 3 个年龄段中,成熟神经元数目下调,非成熟神经元数目显著上调,但嗅觉神经元总数目在 PND7、PND30 无差异,仅在 PND90 时大幅度减少<sup>[19]</sup>。另外,本研究组前期的小鼠 MOE 芯片杂交结果表明,在参与检测的 41 266 个基因探针中,除了 1 988 个基因下调表达外,还有 1 391 个上调表达<sup>[12]</sup>。由此可见,OR 基因及其相关因子表达下调的原因还不能完全归因于嗅觉成熟细胞数目减少的结果。ORs 的选择发生在 ORNs 发育初期<sup>[33]</sup>,ORs 作为 ORNs 成熟的标志之一,ORs 选择与表达缺陷的 ORNs 将面临死亡或停留在未成熟阶段<sup>[34]</sup>。因此,*AC3* 缺失除影响 ORs 选择缺陷外,同时也存在其他影响 ORNs 的发育因素存在,如神经元寿命缩短、气味刺激与 cAMP 依赖的嗅觉神经元活性减弱均可能导致在成年时期 ORNs 的大量减少<sup>[35, 36]</sup>,最终导致在出生后发育过程中 ORs 表达大量减少。另外,考虑到 *AC3* 和 ORs 基因在 MOE 组织中的表达均具有时空特异性<sup>[37-41]</sup>以及 *AC3* 缺失小鼠气味诱导的嗅觉神经活动减弱<sup>[5]</sup>等都有可能引起 ORs 基因的表达下调,但其详细作用关系,



有待于进行更加深入的调查研究。

ORs 启动子区的同源域位点有许多相应的结合蛋白质, LIM 同源结构域转录因子 2 ( LIM homeodomain transcription factor 2, Lhx2) 在动物中广泛表达,其 C 端有 2 个 LIM 结构域,在神经系统中往往是神经和神经胶质形成的关键<sup>[42]</sup>。Lhx2 结合在 ORs 基因的增强子和邻近的启动子区的同源结构域位点,几乎所有的 ORs 基因表达均需要 Lhx2 转录因子<sup>[43]</sup>。空通气孔同源盒 2 ( empty spiracles homeobox 2, Emx2) 在神经系统发育过程中与 Lhx2 具有相似的调控作用,它有助于激活很多 ORs 的转录<sup>[44]</sup>。与 Lhx2 相比, Emx2 只影响大约 20% ~ 30% ORs 的表达,而且在非成熟嗅觉神经元 ( iORNs ) 中的影响大于成熟嗅觉神经元 ( mORNs )<sup>[43]</sup>。在 Lhx2<sup>-/-</sup> 小鼠和 Emx2<sup>-/-</sup> 小鼠的研究中,均发现大量 ORs 表达下调, ORNs 发育出现缺陷<sup>[31, 44]</sup>。在 Lhx2:Emx2 双敲除小鼠中、通过对 Olf15 的表达研究发现, Lhx2 和 Emx2 转录因子在对 ORs 表达中具有不同的效应, Lhx2 对 ORs 表达具有一定的选择性,而 Emx2 可能有助于控制 ORs 表达的有效性<sup>[43]</sup>。本研究中, qRT-PCR 检测 AC3 缺失小鼠 MOE 中, Lhx2 和 Emx2 均显著下调,影响 ORs 表达的选择性和表达的有效性,这可能是突变小鼠 ORNs 发育缺陷的原因之一。

Rtp1、Rtp2 和 Reep1 为 3 个特异表达于 ORNs 的基因,与 ORs 互作后可以协助其转运到细胞膜表面实现异源系统表达 ORs<sup>[45]</sup>。本研究中, 荧光定量 PCR 检测 AC3 缺失小鼠 MOE 中 Rtp1、Rtp2 和 Reep1 显著下调,可能导致 ORs 蛋白不能有效被转运至细胞膜发挥功能,进而影响 ORNs 的气味刺激的敏感性,降低神经元的活动,使 ORNs 的发育过程受阻。

抗胆碱酯酶抑制剂-8b ( resistance to inhibitors of cholinesterase, Ric-8b ) 是一种假定的 GTP 交换因子,能与 Gαolf 相互作用,促进依赖于 Gαolf 的 cAMP 聚集。Von Dannecker 等<sup>[46]</sup>发现, Ric-8b-Gαolf 系统促进 ORs 在 HEK293T 细胞中的高效异源表达,同时增强 Gαolf 在细胞表面的聚集,这暗示 Ric-8b 通过加强 OR 偶联 Gαolf 的效率来促进 OR 的功能表达。本研究中 qRT-PCR 检测小鼠 MOE 中 Ric-8b 的表达,发现 AC3 缺失后 Ric-8b 的表达量显著下降,推测 Ric-8b 的表达量下降影响 Gαolf 在细胞表面的聚集,进而影响 OR 的表达。

总之, AC3 缺失显著降低嗅觉受体相关基因 Lhx2、Emx2、Rtp1、Rtp2、Reep1 和 Ric-8b 的表达,进

而影响小鼠 ORs 的表达。qRT-PCR 检测嗅觉受体基因 Olf15、Olf16、Olf533、Olf536、Olf1507 和 Olf642 表达量均显著下降。FISH 检测表明, 3 个不同发育时期, AC3 缺失小鼠 Olf15、Olf536 和 Olf1507 基因随着年龄增长表达量显著下调。推测 AC3 缺失导致的嗅觉缺陷是由于小鼠 MOE 中气味诱导的神经元活动能力下降,导致嗅觉受体相关因子表达量下降,从而对 ORs 的表达产生影响,抑制 ORNs 的轴突与嗅小球的有效连接,导致嗅觉相关功能的丧失随着年龄的增长愈加严重,影响嗅觉系统的发育。

参考文献 ( References )

[ 1 ] Dulac C, Torello AT. Molecular detection of pheromone signals in mammals: from genes to behaviour [ J ]. Nat Rev Neurosci, 2003, 4 ( 7 ) : 551-562

[ 2 ] Buck L, Axel R. A novel multigene family may encode odorant receptors; a molecular basis for odor recognition [ J ]. Cell, 1991, 65 ( 1 ) : 175-187

[ 3 ] Beites CL, Kawauchi S, Crocker CE, et al. Identification and molecular regulation of neural stem cells in the olfactory epithelium [ J ]. Exp Cell Res, 2005, 306 ( 2 ) : 309-316

[ 4 ] Monahan K, Lomvardas S. Monoallelic expression of olfactory receptors [ J ]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2015, 31 : 721-740

[ 5 ] Wong ST, Trinh K, Hacker B, et al. Disruption of the type III adenylyl cyclase gene leads to peripheral and behavioral anosmia in transgenic mice [ J ]. Neuron, 2000, 27 ( 3 ) : 487-497

[ 6 ] Brunet LJ, Gold GH, Ngai J. General anosmia caused by a targeted disruption of the mouse olfactory cyclic nucleotide-gated cation channel [ J ]. Neuron, 1996, 17 ( 4 ) : 681-693

[ 7 ] Belluscio L, Gold GH, Nemes A, et al. Mice deficient in G ( olf ) are anosmic [ J ]. Neuron, 1998, 20 ( 1 ) : 69-81

[ 8 ] Wang Z, Li V, Chan GC, et al. Adult type 3 adenylyl cyclase-deficient mice are obese [ J ]. PLoS One, 2009, 4 ( 9 ) : e6979

[ 9 ] Wang Z, Storm DR. Maternal behavior is impaired in female mice lacking type 3 adenylyl cyclase [ J ]. Neuropsychopharmacology, 2011, 36 ( 4 ) : 772-781

[ 10 ] 周艳芬, 韩绍芳, 舒俐, 等. 腺苷酸环化酶 3 缺失对小鼠主要嗅觉表皮组织内相关因子及信号通路的影响 [ J ]. 中国生物化学与分子生物学报 ( Zhou YF, Han SF, Shu L, et al. Adenylyl cyclase 3 deletion influence the related factors and signaling pathways in the main olfactory epithelium of mice [ J ]. Chin J Biochem Mol Biol, 2016, 32 ( 7 ) : 816-822

[ 11 ] Wang Z, Balet Sindreu C, Li V, et al. Pheromone detection in male mice depends on signaling through the type 3 adenylyl cyclase in the main olfactory epithelium [ J ]. J Neurosci, 2006, 26 ( 28 ) : 7375-7379

[ 12 ] Wang Z, Zhou Y, Luo Y, et al. Gene expression profiles of main olfactory epithelium in adenylyl cyclase 3 knockout mice [ J ]. Int J Mol Sci, 2015, 16 ( 12 ) : 28320-28333

[ 13 ] Lyons DB, Allen WE, Goh T, et al. An epigenetic trap stabilizes singular olfactory receptor expression [ J ]. Cell, 2013, 154 ( 2 ) : 325-336

[ 14 ] Miyamichi K, Serizawa S, Kimura HM, et al. Continuous and overlapping expression domains of odorant receptor genes in the olfactory epithelium determine the dorsal/ventral positioning of glomeruli in the olfactory bulb [ J ]. J Neurosci, 2005, 25 ( 14 ) : 3586-3592

[ 15 ] Ressler KJ, Sullivan SL, Buck LB. A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium [ J ]. Cell, 1993, 73 ( 3 ) : 597-609

[ 16 ] Kanageswaran N, Demond M, Nagel M, et al. Deep sequencing



- of the murine olfactory receptor neuron transcriptome[J]. *PLoS One*, 2015, **10**(1): e0113170
- [17] Khan M, Vaes E, Mombaerts P. Regulation of the probability of mouse odorant receptor gene choice[J]. *Cell*, 2011, **147**(4): 907-921
- [18] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(-Delta Delta C (T)) method[J]. *Methods*, 2001, **25**(4): 402-408
- [19] 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
- [20] Ishii T, Omura M, Mombaerts P. Protocols for two- and three-color fluorescent RNA in situ hybridization of the main and accessory olfactory epithelia in mouse[J]. *J Neurocytol*, 2004, **33**(6): 657-669
- [21] Ngai J, Dowling MM, Buck L, *et al.* The family of genes encoding odorant receptors in the channel catfish[J]. *Cell*, 1993, **72**(5): 657-666
- [22] Freitag J, Ludwig G, Andreini I, *et al.* Olfactory receptors in aquatic and terrestrial vertebrates[J]. *J Comp Physiol A*, 1998, **183**(5): 635-650
- [23] Tegoni M, Pelosi P, Vincent F, *et al.* Mammalian odorant binding proteins[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1482**(1-2): 229-240
- [24] Vassar R, Ngai J, Axel R. Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium[J]. *Cell*, 1993, **74**(2): 309-318
- [25] Sullivan SL, Adamson MC, Ressler KJ, *et al.* The chromosomal distribution of mouse odorant receptor genes[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, **93**(2): 884-888
- [26] Strotmann J, Wanner I, Helfrich T, *et al.* Rostro-caudal patterning of receptor-expressing olfactory neurones in the rat nasal cavity[J]. *Cell Tissue Res*, 1994, **278**(1): 11-20
- [27] Iwema CL, Fang H, Kurtz DB, *et al.* Odorant receptor expression patterns are restored in lesion-recovered rat olfactory epithelium[J]. *J Neurosci*, 2004, **24**(2): 356-369
- [28] Tian H, Ma M. Differential development of odorant receptor expression patterns in the olfactory epithelium; a quantitative analysis in the mouse septal organ[J]. *Dev Neurobiol*, 2008, **68**(4): 476-486
- [29] Strotmann J, Levai O, Fleischer J, *et al.* Olfactory receptor proteins in axonal processes of chemosensory neurons[J]. *J Neurosci*, 2004, **24**(35): 7754-7761
- [30] Nef P, Hermans-Borgmeyer I, Artieres-Pin H, *et al.* Spatial pattern of receptor expression in the olfactory epithelium[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, **89**(19): 8948-8952
- [31] Hirota J, Omura M, Mombaerts P. Differential impact of Lhx2 deficiency on expression of class I and class II odorant receptor genes in mouse[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2007, **34**(4): 679-688
- [32] Rodriguez-Gil DJ, Treloar HB, Zhang X, *et al.* Chromosomal location-dependent nonstochastic onset of odor receptor expression[J]. *J Neurosci*, 2010, **30**(30): 10067-10075
- [33] Shykind BM, Rohani SC, O'Donnell S, *et al.* Gene switching and the stability of odorant receptor gene choice[J]. *Cell*, 2004, **117**(6): 801-815
- [34] Hanchate NK, Kondoh K, Lu Z, *et al.* Single-cell transcriptomics reveals receptor transformations during olfactory neurogenesis[J]. *Science*, 2015, **350**(6265): 1251-1255
- [35] Watt WC, Sakano H, Lee ZY, *et al.* Odorant stimulation enhances survival of olfactory sensory neurons via MAPK and CREB[J]. *Neuron*, 2004, **41**(6): 955-967
- [36] Tian H, Ma M. Activity plays a role in eliminating olfactory sensory neurons expressing multiple odorant receptors in the mouse septal organ[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2008, **38**(4): 484-488
- [37] Challis RC, Tian H, Wang J, *et al.* An olfactory cilia pattern in the mammalian nose ensures high sensitivity to odors[J]. *Curr Biol*, 2015, **25**(19): 2503-2512
- [38] Login H, Haglin S, Berghard A, *et al.* The stimulus-dependent gradient of Cyp26B1 + olfactory sensory neurons is necessary for the functional integrity of the olfactory sensory map[J]. *J Neurosci*, 2015, **35**(40): 13807-13818
- [39] Maritan M, Monaco G, Zamparo I, *et al.* Odorant receptors at the growth cone are coupled to localized cAMP and Ca<sup>2+</sup> increases[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, **106**(9): 3537-3542
- [40] Rodriguez-Gil DJ, Bartel DL, Jaspers AW, *et al.* Odorant receptors regulate the final glomerular coalescence of olfactory sensory neuron axons[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, **112**(18): 5821-5826
- [41] Scholz P, Kalbe B, Jansen F, *et al.* Transcriptome analysis of murine olfactory sensory neurons during development using single cell RNA-seq[J]. *Chem Senses*, 2016, **41**(4): 313-323
- [42] de Melo J, Zibetti C, Clark BS, *et al.* Lhx2 is an essential factor for retinal gliogenesis and Notch signaling[J]. *J Neurosci*, 2016, **36**(8): 2391-2405
- [43] Zhang G, Titlow WB, Biecker SM, *et al.* Lhx2 determines odorant receptor expression frequency in mature olfactory sensory neurons[J]. *eNeuro*, 2016, **3**(5). pii: ENEURO.0230-16. 2016
- [44] McIntyre JC, Bose SC, Stromberg AJ, *et al.* Emx2 stimulates odorant receptor gene expression[J]. *Chem Senses*, 2008, **33**(9): 825-837
- [45] Saito H, Kubota M, Roberts RW, *et al.* RTP family members induce functional expression of mammalian odorant receptors[J]. *Cell*, 2004, **119**(5): 679-691
- [46] Von Dannecker LE, Mercadante AF, Malnic B. Ric-8B promotes functional expression of odorant receptors[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, **103**(24): 9310-9314