

2016 届研究生硕士学位论文

分类号: Q189

学校代码: 10269

密 级: _____

学 号: 51131300095



華東師範大學

East China Normal University

硕士学位论文

MASTER'S DISSERTATION

过敏性鼻炎小鼠模型的行为
特征及其分子机制的初步研究

院 系: 生命科学学院

专 业: 神经生物学

研究方向: 分子神经生物学

指导教师: 梅兵 研究员

学位申请人: 郭 超

2016 年 04 月

Dissertation for Master's degree in 2016

University code: 10269

Student ID: 51131300095

East China Normal University

MASTER'S DISSERTATION

The study of behavioral traits and their molecular mechanisms in mice model of allergic rhinitis

Department:	<u>School of Life Science</u>
Major:	<u>Neurobiology</u>
Research direction:	<u>Molecular Neurobiology</u>
Supervisor:	<u>Prof. Bing Mei</u>
Candidate:	<u>Chao Guo</u>

April, 2016

华东师范大学学位论文原创性声明

郑重声明：本人呈交的学位论文《过敏性鼻炎小鼠模型的行为特征及其分子机制的初步研究》，是在华东师范大学攻读硕士/博士（请勾选）学位期间，在导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确说明并表示谢意。

作者签名：_____

日期：____年____月____日

华东师范大学学位论文著作权使用声明

《过敏性鼻炎小鼠模型的行为特征及其分子机制的初步研究》系本人在华东师范大学攻读学位期间在导师指导下完成的硕士/博士（请勾选）学位论文，本论文的著作权归本人所有。本人同意华东师范大学根据相关规定保留和使用此学位论文，并向主管部门和学校指定的相关机构送交学位论文的印刷版和电子版；允许学位论文进入华东师范大学图书馆及数据库被查阅、借阅；同意学校将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于（请勾选）

- ☐ 1. 经华东师范大学相关部门审查核定的“内部”或“涉密”学位论文*，于____年____月____日解密，解密后适用上述授权。
- ☐ 2. 不保密，适用上述授权。

导师签名_____

本人签名 Guo Chao

____年____月____日

* “涉密”学位论文应是已经华东师范大学学位评定委员会办公室或保密委员会审定过的学位论文（需附获批的《华东师范大学研究生申请学位论文“涉密”审批表》方为有效），未经上述部门审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。

郭 超 硕士学位论文答辩委员会成员名单

姓名	职称	单位	备注
殷东敏	研究员	华东师范大学	主席
曹晓华	研究员	华东师范大学	
陈爱华	研究员	华东师范大学	
孟 博	高级工程师	华东师范大学	答辩秘书

论文摘要

过敏性疾病是严重影响人类健康的疾病之一，是由机体的免疫系统对一些通常无危险性的环境物质如花粉、尘埃等的过度敏感而导致的疾病。近年来，特别是工业化革命以后，过敏性疾病的患病率迅速上升。其中过敏性鼻炎（allergic rhinitis, AR）是发病率最高的过敏性疾病，并越来越受到重视。研究发现包括 AR 在内的过敏性疾病与情绪障碍之间存在关联，并且少年期患有 AR 的患者以后患上抑郁症的风险几率增加。但是，人们并不清楚 AR 在抑郁症等情绪障碍中扮演何种角色，以及青少年时期患有 AR 是否会对大脑造成永久性的影响以及可能机制也不清楚。

因此，为了研究少年期 AR 对焦虑和抑郁情绪的影响，本研究以 OVA 作为过敏原，建立少年期过敏性鼻炎小鼠模型，并在不同的时期和过敏原暴露状态下检测其行为特征，以及分析其发生行为异常的可能分子机制。

1) 以 C57BL/6 少年期 AR 小鼠为研究对象，通过行为学检测手段，发现 AR 小鼠持续暴露于过敏原期间的焦虑行为明显增加和部分抑郁样行为明显增加。

2) 以 C57BL/6 少年期 AR 小鼠为研究对象，通过行为学检测手段，发现 AR 小鼠和服用抗过敏药物的 AR 小鼠长期隔离过敏原后无明显行为异常；当再次持续暴露于过敏原期间 AR 小鼠也无明显行为异常，而服用抗过敏药物的 AR 小鼠自发活动量无明显异常，但焦虑样行为明显增加。

3) 以 BALB/c 少年期 AR 小鼠为研究对象，通过行为学检测手段，发现 AR 小鼠在短期隔离过敏原后刻板样行为明显减少，抑郁样行为明显增加，社交记忆能力轻微下降。通过免疫组化实验，分析 c-fos 阳性细胞的数量，发现 AR 小鼠在末次激发 12 小时后，LSd 和 PVN 处的神经细胞活动被抑制，而眼眶前额叶外侧和腹侧区、内侧杏仁核内的神经细胞活动情况则无异常；行为学检测结束后 AR 小鼠外侧中隔背侧区、眼眶前额叶外侧和腹侧区、内侧杏仁核内的神经细胞活动无明显异常。通过免疫组化实验，分析 Iba-1 标记的小胶质细胞形态，发现 AR 小鼠在行为学检测结束后扣带皮层内的小胶质细胞处于激活状态。通过荧光定量

PCR 实验，分析目标基因的 mRNA 表达水平，发现 AR 小鼠皮层（前中后三个区）和纹状体中与抑郁症相关的 BDNF、CRF、LTP-9 的 mRNA 的表达量与对照小鼠没有明显差异。

总的来说，少年期 AR 小鼠在短期隔离过敏原后表现出的部分抑郁样情绪和部分社交记忆障碍可能是由于 LSd 和 PVN 神经元被抑制以及小胶质细胞在扣带皮层的激活所导致的。而 AR 小鼠在少年期持续暴露于过敏原期间确实会增加其焦虑和抑郁样行为，但是长期隔离过敏原并没有异常的行为症状，反而是再次暴露于过敏原时，服用过抗过敏药物的 AR 小鼠焦虑样行为明显增加。

关键词：过敏性鼻炎；少年期；抑郁症；社交记忆；神经活动

ABSTRACT

Allergy is greatly threatening the health of mankind, in which an abnormal adaptive immune responses directed against normally harmless environmental substance, e.g. pollen, dust etc. Recently, especially after the industrial revolution, the prevalence of allergy has increased quickly. And allergic rhinitis (AR) has been received increasing attention because it is the most common allergy. Besides, it was reported that allergy including AR was associated with anxious, depressive mood disorders, and in adolescence AR increased the risk of depression in their later life. But, it is not clear that whether AR initiate, perpetuate or exacerbate the pathological mood disorders; whether AR in adolescents caused a permanent effect on the brain. It is important to uncover the mechanisms of relationship between AR and mood disorders.

Thus, we built juvenile mice model of allergic rhinitis using OVA as allergen, tested their behaviors in different situation of allergen exposure and the molecular mechanism for the abnormal behavioral traits.

1) Behavioral tests showed that C57BL/6 juvenile AR mice presented higher anxiety-like and depression-like behaviors during OVA allergen exposure.

2) Behavioral tests showed that C57BL/6 juvenile AR mice with and without PA treatment showed no significant behavioral changes after long term OVA allergen isolation. During OVA allergen re-exposure, AR mice without PA treatment presented no significant behavioral changes, but AR mice with PA treatment showed higher anxiety-like behavior.

3) Behavioral tests showed that BALB/c juvenile AR mice showed lower stereotypic behavior, higher depression-like behavior and lower social memory after a short term allergen isolation. Immunostaining of c-fos showed that 12 hours after the last nasal challenge, neural cells in periventricular nucleus (PVN) and lateral septum dorsal part (LSd) were inhibited, while no significant changes in prefrontal cortex (PFC) and medial amygdala (MeA); After behavioral tests, no significant changes of neural

cells activity in LSd, PFC and MeA, but the microglia cells were activated in the forebrain cingulate cortex area. RT-PCR tests for mRNA levels showed that no significant changes of BDNF, LTR-9, and CRF depression-related gene expressions can be found in the cortex and striatum of AR mice after behavioral tests.

In conclusion, inhibition of neurons in LSd and PVN brain areas and activation of microglial cells in cingulate cortex may contribute to depression-like behaviors and social memory deficits after short-term allergen isolation in BALB/c AR mice. During allergen exposure, C57BL/6 juvenile AR mice showed higher anxiety-like behaviors and depression-like behaviors. After long-term allergen isolation, C57BL/6 juvenile AR mice behaved normally, but AR mice with PA treatment showed higher anxiety-like behaviors during allergen re-exposure.

Keywords: Allergic rhinitis; Juvenile; Depression; Social memory; Neural activity

目录

论文摘要.....	III
第一章过敏性鼻炎小鼠模型的建立的尝试及其行为特征.....	1
摘要.....	1
前言.....	2
1. 材料与方法.....	6
2. 结果.....	19
3. 讨论.....	28
4. 版图与说明.....	33
第二章过敏性鼻炎小鼠模型行为异常的细胞和分子机制.....	53
摘要.....	53
前言.....	54
1. 材料与方法.....	57
2. 结果.....	63
3. 讨论.....	66
4. 版图说明.....	68
第三章综述	74
炎症与抑郁症.....	74
僵核与抑郁症.....	76
已\待刊文章.....	79
参考文献.....	81
致谢	91

第一章 过敏性鼻炎小鼠模型的建立及其行为特征

摘要

过敏性疾病是由自身免疫系统对外界无危害物质的过度反应而造成的疾病，正严重影响人类的健康。其中过敏性鼻炎（allergic rhinitis, AR）作为发病率最高的过敏性疾病正受到越来越多的重视。研究发现包括 AR 在内的过敏性疾病与情绪障碍之间存在关联，并且少年期患有 AR 的患者以后患上抑郁症的风险几率增加。但是，人们并不清楚 AR 在抑郁症等情绪障碍中扮演何种角色，以及青少年时期患有 AR 是否会对大脑造成永久性的影响以及可能机制也不清楚。

本实验采用刚离乳的 BALB/c 和 C57BL/6 小鼠，以 OVA 为过敏原，尝试建立 AR 小鼠模型。分析两种 AR 小鼠模型的行为表型，以及比较了 C57BL/6 AR 小鼠与服用抗过敏药物的 AR 小鼠的行为表型。以挠鼻子和打喷嚏的行为症状，抗 OVA 抗体的表达情况和炎性细胞嗜酸性粒细胞的数量作为检测鼻炎模型造模是否成功的指标。通过分析小鼠在旷场实验、高架实验、新环境抑制进食实验、强迫游泳实验、悬尾实验、糖水偏好实验、食物挖掘实验、社会交互实验、前脉冲抑制实验、被动回避实验、条件恐惧记忆实验的行为表型来检测小鼠的自发活动量、情绪样行为、嗅觉能力、社交能力、学习记忆能力和惊吓反应抑制能力。

建模的结果显示，（1）鼻炎症状中，BALB/c 少年 OVA 组小鼠比 Veh 组小鼠表现出较高次数的挠鼻子和打喷嚏行为；C57BL/6 AR 少年期 OVA 组小鼠的挠鼻子和打喷嚏行为与 Veh 组小鼠无明显差异。（2）Anti-OVA-IgE 表达情况中，两种品系的小鼠都产生抗过敏原 OVA 的抗体。（3）炎性细胞情况中，BALB/c 少年 OVA 组小鼠鼻粘膜固有层的嗜酸性粒细胞数明显高于 Veh 组小鼠鼻粘膜中的数量。以上结果提示，BALB/c 少年期小鼠可能比 C57BL/6 少年期小鼠对 OVA 过敏原具有更高的响应。

行为学实验结果显示，（1）C57BL/6 少年期 AR 小鼠持续暴露于过敏原期间总运动距离明显减少，但是总运动次数和运动时间无明显异常，焦虑样行为明显

增加和部分抑郁样行为明显增加。(2) C57BL/6 少年期 AR 小鼠长期隔离过敏原后, AR 小鼠和服用过抗过敏药物的 AR 小鼠都无明显行为异常;当再次持续暴露于过敏原时, AR 小鼠无明显行为异常,而服用抗过敏药物的 AR 小鼠的自发活动量无明显异常,但焦虑样行为明显增加。(3) BALB/c 少年期 AR 小鼠短期隔离过敏原后自发活动量无明显异常,刻板样行为明显减少,部分抑郁样行为明显增加,社交记忆部分受损和做窝能力轻微下降。

结论, BALB/c 少年期小鼠对 OVA 抗原具有较高的响应,提示该品系小鼠更利于少年期 AR 模型的建立。C57BL/6 少年期 AR 小鼠持续暴露于过敏原期间会导致其焦虑样行为增加和部分抑郁样行为增加;C57BL/6 少年期 AR 小鼠长期隔离过敏原后不会导致其焦虑和抑郁样行为增加,而再次暴露于过敏原时也不会导致其焦虑和抑郁样行为增加;服用过抗过敏药物的 C57BL/6 少年期 AR 小鼠长期隔离过敏原后,也不会导致其焦虑和抑郁样行为增加,但再次暴露于过敏原时会导致其焦虑样行为增加;BALB/c 少年期 AR 小鼠短期隔离过敏原后会导致其部分抑郁样行为增加和部分社交记忆下降。

关键词: 过敏性鼻炎, 小鼠模型, 行为特征

前言

过敏性疾病是由自身免疫系统对一些花粉、动物皮毛等非传染性环境物质的过度反应而造成的疾病,严重影响着人类的健康^[1]。近年来随着工业化的程度提高,生态环境不断恶化,敏性疾病的患病率呈现迅速增长的趋势。据 2014 年欧洲过敏反应与临床免疫学会(EAACI)发布,目前过敏性疾病正在影响全球超过十亿人的生活,并且根据过去 60 年的流行趋势分析,预计到 2050 年累计患病人数将达到 40 亿^[2]。而在所有过敏性疾病中, AR 是患病率最高的过敏性疾病^[2],是由过敏原引起的鼻黏膜慢性炎症反应的疾病,临床症状包括打喷嚏、流涕、鼻塞、鼻子痒、眼睛痒、上颚痒,通常还出现鼻后滴漏、咳嗽、烦躁和疲劳的症状^[3;4]。研究显示,欧洲国家的 AR 患病率为 20%~30%,美国的患病率为 12%~30%,中国的患病率为 10%~35%^[5-7]。随着研究的深入,人们发现青少年的 AR 患病率

要高于成年人的患病率，最高可达 45%^[5]。不仅如此，AR 患病率除了在年龄上有差异外，性别上也存在差异。男孩的发病率要高于女孩，但过了青春期后女性的发病率则高于男性^[8;9]。此外，AR 进一步可发展为过敏性哮喘，60%的鼻炎患者同时患有哮喘^[10]，两者存在相似的疾病发病机制，被认为是“同一呼吸道，同一疾病”^[11]。

另一方面，据世界卫生组织的数据显示，抑郁症是全球第三大导致全球疾病负担的疾病，影响了 3.5 亿人口，预计到 2030 年将成为全球第二大疾病^[12; 13]。据 2014 年美国国立卫生研究院数据显示，美国成年人抑郁症的患病率为 6.6%，而青少年的患病率达 11.4%^[14]。实际上，科研人员已经注意到过敏性疾病，尤其是 AR 与抑郁等情绪障碍之间存在关联^[15-18]。例如季节性的花粉 AR 与高抑郁症发病率之间存在的关联^[16]；一项超过 85,000 个 AR 样本的流行病学调查发现，AR 病患比非过敏性疾病患者高 1.7 倍的几率被诊断为抑郁症^[19]；一篇系统性分析了 AR 与情绪紊乱的文献综述显示，大部分流行病学调查的结论是 AR 与抑郁症之间存在关联^[15]；最近一项流行病学研究认为青少年过敏性鼻炎会导致其患上抑郁症，而过敏性哮喘则与抑郁症没有直接相关性^[18]；近来还有报道 12-15 岁时患有 AR 的患者，其成年后（约 23 岁）患上抑郁症的风险增加^[17]。另外，注意力缺陷多动症障碍（Attention deficit hyperactivity disorder, ADHD）的儿童患有过敏性鼻炎的几率较高^[20; 21]，而患有过敏性鼻炎的儿童中也具有较高的多动症患者^[22]。患有过敏性鼻炎的儿童同时还表现出学习和记忆能力减退，容易产生焦虑（Anxiety），容易患上自闭症（Autism spectrum disorder, ASD）^[23]。同时患有 ADHD 和 ASD 的患儿，其患上过敏性疾病的几率更加高^[24]。另有研究发现患有自闭症的儿童更多的患上过敏性鼻炎，而不是过敏性哮喘^[25]。虽然有报道认为过敏性哮喘与情绪障碍之间也存在关联^[26]，但是也有报道认为这样的矛盾可能是没有区分哮喘患者是否同时患有 AR 所导致的^[18]。

尽管过敏性疾病尤其是 AR 与情绪障碍的发病存在相关性，但是到目前为止，并没有直接证据证明过敏性疾病会导致抑郁症等情绪障碍。对于机制研究的角度，科研人员已经发现炎症与情绪障碍之间可以相互影响，例如外周炎症信号或分子

可能通过“体液途径”、“神经途径”、“细胞途径”的方式进入中枢系统，进而引发脑内炎症而产生抑郁样行为^[27-29]。反过来，社会应激可以引起抑郁和焦虑样情绪障碍的同时激发了机体的免疫系统，进而产生炎症反应^[30; 31]。有研究认为，抑郁症也许是机体免疫系统对应激的“过度敏感”，进而产生的炎症反应^[32; 33]。虽然 AR 和哮喘被认为是“同一疾病”，但它们与情绪障碍疾病的相关性并不一致。以上提示我们，过敏性鼻炎，尤其是青少年的过敏性鼻炎是否直接导致情绪障碍、甚至可增加成年后情绪障碍（如抑郁症）的风险，这非常值得证实。

以动物模型研究过敏原的致敏反应试验发现，不同品系的成年小鼠对不同过敏原的致敏会产生不同程度的过敏反应。其中 OVA 是过敏性疾病模型建立中使用最广泛的过敏原，是蛋清的主要蛋白质。鸡卵清蛋白的分子量为 45kDa^[34]，可以进行腹腔注射^[35]或者皮下注射^[36]来达到整体致敏效果，并通过局部激发诱导出 AR^[36]。佐剂是用于提高 OVA 的免疫原性，增强 Th2 型细胞免疫应答，使得动物模型更易于建立^[37]。而动物品系中，BALB/c 成年小鼠较 C57BL/6、CBA/J、SJL 成年小鼠对 OVA 过敏原有较高的 IgE 响应^[38; 39]，也因此我们在实验三种选择了少年期 BALB/c 小鼠建立 AR 小鼠模型。成年小鼠的性别对过敏原的响应强度会因为过敏原的种类和小鼠品系不同而有差异^[40]。关于哺乳期小鼠过敏性呼吸道疾病的研究多数集中在 BALB/c 品系小鼠，且其对 OVA 过敏原同样会产生过敏反应^[41; 42]。过敏性抗原可以通过母乳转移给子代，导致子代抗原特异性免疫耐受^[42; 43]。但是鲜有关于刚离乳的雄性 BALB/c 和 C57BL/6AR 小鼠模型报道。

目前少量研究关注了过敏性疾病动物模型的行为特征。如在旷场实验和高架实验中处于早期阶段的成年大鼠哮喘模型表现出较高的焦虑样行为^[44]；食物过敏的少年小鼠模型表现出刻板样行为和社交记忆减退^[45]，而抑制 mTORC1 可以改善食物过敏小鼠模型的行为缺陷^[46]；成年 AR 模型小鼠和大鼠在被过敏原激发 1 天后，其焦虑样行为上升，以及社会交互行为下降^[47]。而关于少年期致敏的 AR 小鼠模型的行为特征，以及其成年后行为特征的研究，都鲜有报道。并且，AR 是引发还是维持亦或是加剧了抑郁症疾病也是不清楚的。

为了研究青少年时期的 AR 与成年后抑郁样情绪障碍风险增加的几率与可能

的生理机制，本实验以两种不同品系的刚离乳的小鼠为研究对象，探索了建立过敏性鼻炎模型的条件，检测并比较了其持续暴露于过敏原期间和隔离过敏原一定时间后的行为特征。醋酸泼尼松（Prednisone Acetate, PA）是一种肾上腺皮质激素类的免疫抑制性药物，具有抗过敏和抗炎的作用，可抑制组胺等物质的形成和释放^[48]，是临床上常用的口服免疫抑制性药物，用于治疗过敏性、自身免疫性炎症性疾病^[49]。本实验对 C57BL/6 少年期 AR 小鼠给予醋酸泼尼松，以观察其对 AR 小鼠鼻炎症状以及情绪状态等影响。

当前生态环境逐渐恶劣，尤其是空气污染日益严重。同时人们的工作、竞争压力不断增加，而各类过敏性疾病、情绪障碍类疾病的发病率也呈增长趋势。那么，究竟过敏性疾病和情绪障碍之间是由并行存在的因素导致其发生相关性，还是相互影响、相互加剧、甚至互为因果？本课题的研究为临床上青少年 AR 与抑郁样情绪的相关性研究提供了一定的理论依据，具有重要的科学意义和社会意义。

1. 材料与方法

1.1. 实验动物及分组

雄性 C57BL/6 和 BALB/c 小鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司，SD 大鼠在华东师大脑功能基因组学研究所的 SPF（无特定病原体）啮齿类动物中心内繁殖和饲养。饲养条件：自由进食、饮水；12/12 h 昼夜交替，7:00-19:00 为白昼；室温为 22 ± 2 °C，相对湿度在 50 % ~60 %。实验一和实验二采用 C57BL/6 小鼠，实验三采用 BALB/c 小鼠。

实验一。将 4 周龄的雄性 C57BL/6 小鼠随机分成两组，对照 Veh 组（10 只），过敏性鼻炎 OVA 组（8 只）。小鼠 4 周龄开始致敏，7 周龄开始进行行为学检测。实验流程如图（Fig.1.1a）。

实验二。将 3 周龄的雄性 C57BL/6 小鼠按体重随机分成 3 组。对照 Veh 组（12 只），过敏性鼻炎 OVA 组（14 只），致敏后服抗过敏药物 PA 组（14 只）。小鼠 3 周龄开始致敏，5 到 6 月龄进行行为检测。实验流程如图（Fig.1.1b）。

实验三。将 3 周龄的雄性 BALB/c 小鼠按体重随机分成 2 组。对照 Veh 组（21 只），过敏性鼻炎 OVA 组（21 只）。小鼠 3 周龄开始致敏，8 周龄进行行为学检测。实验流程如图（Fig1.1.c）。

本实验对小鼠的操作符合华东师范大学实验动物使用与管理委员会关于动物伦理的要求。

1.2. 主要试剂和药品

药品名称	来源（公司）
鸡卵清蛋白（OVA）	Sigma
醋酸泼尼松龙	上海信谊药厂
氯化铝	国药集团化学试剂
Alum 佐剂	Thermo
Evans Blue	Sigma

苏木精-伊红

碧云天

1.3. 主要仪器设备

实验设备	来源（公司）
旷场运动测试（TRU Scan system）	Coulbourn
视频追踪系统（Anymaze video tracking system）	Stoelting
社会行为分析系统（Social Scan Top）	Clever Sys. Inc
条件恐惧和震惊反射系统（Startle and Fear conditioning System）	Panlab
震惊反射系统（SR-LAB™ Startle response system）	SD
被动回避测试系统（Shuttle box for Passive avoidance test）	Kinder Instruments
悬尾测试系统（Tail suspension）	MED
强迫游泳（Forced swimming）	定制
高架十字迷宫（Elevated plus maze）	定制
高架零迷宫（Elevated zero maze）	定制
饲养笼监控（Home cage video recording）	自制

1.4. 实验方法

1.4.1. 佐剂的配制

在实验一和实验二中，使用自行配制的 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 佐剂（终浓度 4%）。将 1.7g AlCl_3 缓慢加入 25ml 超纯水中，当完全溶解后加入 NaOH 固体约 1.8g，直到形成 pH 值在 8-9 之间的凝胶。实验三中，为了将实验条件标准化，直接购置了佐剂 Imjet®Alum。

1.4.2. 腹腔致敏

实验一。配置 4ml OVA 试剂 (10 μ g OVA/400 μ l 佐剂)。于 OVA 中加入佐剂并涡旋震荡数分钟。在第 1 天和第 8 天对小鼠进行腹腔注射 (i.p)。OVA 组 (8 只, 4 周龄小鼠) 腹腔注射 0.4ml 佐剂与 OVA。Veh.组 (10 只, 4 周龄小鼠) 腹腔注射佐剂 0.4ml。

实验二。腹腔注射时程同实验一。配置 6.4ml OVA 试剂 (100 μ g OVA/200 μ l 佐剂)。第 1 天和第 8 天对小鼠进行腹腔注射。OVA 组和 PA 组 (各 14 只, 3 周龄小鼠) 每只小鼠注射 0.2ml 佐剂与 OVA。Veh.组 (12 只, 3 周龄小鼠) 注射佐剂 0.2ml。

实验三。腹腔注射的时程同实验一。称量 3.0mg 鸡卵清蛋白 (OVA) 于离心管, 加入 1.5ml 无菌 PBS 混匀, 缓慢加入 1.5ml 佐剂 Alum; 涡旋震荡 30min。使 OVA 的终浓度为 100 μ g OVA/100 μ l 佐剂。第 1 天和第 8 天对小鼠进行腹腔注射。OVA 组 (21 只, 3 周龄) 每只注射 0.1ml 佐剂含 OVA。Veh 组 (21 只, 3 周龄) 每只注射 0.1ml 佐剂。

1.4.3. 鼻腔激发

实验一。称量 2.0mg OVA (存放于 4 $^{\circ}$ C 冰箱) 于离心管, 加入 0.9% 的灭菌生理盐水 0.2ml, 使 OVA 的终浓度为 200 μ g OVA/20 μ l 生理盐水。加入生理盐水后涡旋震荡几分钟。以上 OVA 溶液每天新配。并于第 15、16、17、18、19、20、21 天连续 7 天对 OVA 组进行鼻腔滴注, 每个鼻孔 10 μ , Veh 组小鼠滴注生理盐水。在第 21 天进行鼻腔滴注后, 观察其挠鼻子等行为特征。以后每天在行为学结束后再进行激发。

实验二。前期鼻腔激发时程和方法同实验一。配置 0.6ml OVA 溶液 (200 μ g OVA/20 μ l), 每只 20 μ l。OVA 和 PA 组小鼠被 OVA 激发 (Veh 组则用生理盐水同样操作) 7 天后, PA 组小鼠再连续 7 天进行 OVA 激发并按体重灌胃 (i.g) 醋酸泼尼松龙 (5mg/kg 体重); OVA 组小鼠则再连续 7 天进行 OVA 激发并按体重灌

胃生理盐水（5ml/kg 体重）；Veh 组小鼠则进行生理盐水滴鼻和按体重灌胃生理盐水（5ml/kg 体重）。最后，录像并观察其挠鼻子和打喷嚏的行为特征。末次激发 3 个月后进行行为学检测。之后再次给予小鼠暴露过敏原，先连续滴鼻激发 3 天，以后每天在行为学结束后进行激发。

实验三。鼻腔激发时程和方法同实验一。称量 6.0mg OVA 于离心管，加入无菌 PBS 0.6ml，使 OVA 的终浓度为 200 μ g OVA/20 μ l PBS。加入 PBS 吹打混匀。末次激发后进行录像观察。两周后进行行为学检测。

1.4.4. 过敏性鼻炎症状观察

实验一。在第 21 天鼻腔激发后放入一新笼盒，观察并记录 5 分钟内小鼠打喷嚏和挠鼻子的次数，采用叠加打分方法，若总分大于 10 分，则从行为学角度说明造模成功^[50; 51]。评分标准如下：打喷嚏 1 次记 1 分，挠鼻子 2 次记 1 分，剧烈挠鼻子不止记 2 分^[50; 51]。实验二中改进观察的环境条件。小鼠鼻腔激发后，将小鼠放入特制的小盒（Fig.1.3c）适应 5min，然后录制 10min 小鼠的活动情况。统计小鼠在后 5min 中内挠鼻子、打喷嚏的次数。实验三。方法同实验二。

1.4.5. 大鼠被动皮肤过敏实验（Passive Cutaneous Anaphylaxis, PCA）

由于致敏小鼠的血清（内含丰富的抗 OVA 抗原的 IgE 和 IgG1 抗体）被注射于正常大鼠皮下时，抗体与局部皮肤肥大细胞的表面受体结合，使大鼠被动致敏。当抗原攻击时，引起局部肥大细胞释放过敏介质，从而使局部血管的通透性增加，注入的染料 Evans Blue 可渗出，形成蓝斑^[52; 53]。实验过程如下（Fig.1.2a）：

- (1) 10%水合氯醛麻醉小鼠，用量为（体重*0.5%），眼眶采血（约 0.5ml），室温放置 10min~20min，3000rpm，20min，取上清于新 EP 管；
- (2) 取 3 个 EP 管，每管加入 120 μ L 0.9% 的 NaCl，取 40 μ L 血清加入 EP 号管，混匀，再进行倍比稀释，按 1:4，1:16，1:64 三个稀释比例；
- (3) 麻醉大鼠（300g 左右）10%水合氯醛，用量（体重 \times 0.5%），剃毛；
- (4) 大鼠皮下注射小鼠血清（0.1ml），做好标记；

- (5) 48 小时后, 注射 Evans Blue ,每只大鼠用量为: 10mg Evans blue, 2mg OVA, 1ml 0.9%的 NaCl;
- (6) 0.5 小时后, 急性断头处死大鼠;
- (7) 剪开大鼠皮肤, 观察并拍照, 测量蓝斑直径。

1.4.6. 鼻粘膜组织学观察—吉姆萨染色 (Giemsa staining)

吉姆萨染液由天青和伊红混合而成, 对于细胞胞浆的着色力较强, 能较好的显示胞浆的嗜酸性、嗜碱性。嗜酸性颗粒为碱性蛋白, 能与酸性染料伊红结合而被染成粉红色, 被称为嗜酸性物质; 细胞核蛋白和淋巴细胞胞浆为酸性, 能与天青结合而被染成紫蓝色, 被称为嗜碱性物质; 中性颗粒呈等电状态, 能结合伊红和天青而被染成淡紫色, 被称为中性物质。而过敏性鼻炎患者的鼻粘膜中会有大量生成嗜酸性颗粒物质的细胞。通过吉姆萨染色可以清楚地分析过敏性鼻炎模型小鼠的鼻粘膜是否产生了大量的嗜酸性粒细胞。实验过程如下:

- (1) 取鼻腔浸泡于 4% PFA 中, 4℃固定 2 天;
- (2) 将鼻腔浸泡于 10% EDTA 溶液中, 脱钙 4 周, 每周更换一次液体;
- (3) 将鼻腔浸泡于 30% 蔗糖溶液中, 脱水 2 天;
- (4) 将鼻腔包埋于 OCT 中, 并冻存于-20℃中, 待需要时取出进行冰冻切片;
- (5) 鼻腔切片厚度为 30 μm ;
- (6) 超纯水清洗鼻腔切片 2×1 min;
- (7) 将鼻腔切片浸泡于吉姆萨染液中 5min;
- (8) 蒸馏水清洗数秒;
- (9) 0.5%的乙酸清洗 2 min;
- (10) 自来水冲洗 2 min;
- (11) 无水乙醇迅速脱水 2×10 s;
- (12) 二甲苯透明 2×5 min;
- (13) 中性树脂封片;
- (14) 拍照并统计。

1.4.7. 旷场实验 (Open field test, OFT)

由于小鼠具有趋避空旷场地的特性,但是又会倾向于探索新鲜事物,因此旷场试验可用于检测小鼠自发活动行为、探索行为以及部分反映出小鼠的焦虑情绪^[54]。不同实验室对于旷场实验的参数设定不同,比如旷场的大小、光照强度、实验时间等^[55; 56]。而通过录像分析小鼠在平面的移动轨迹来测量小鼠的自发活动量是大多数实验室采取的方式^[55],其移动距离可以很好反映小鼠的水平活动情况,但不能很好的反应小鼠的垂直运动,本实验室 OFT 检测设备还可以监控出小鼠的垂直运动情况。

实验一。本实验采取小鼠的总运动距离、次数、时间来测量其自发活动量;在中心区域所待时间和进入次数测量其焦虑情绪。实验时,将一只小鼠放入实验旷场设备箱内,让其自由地探索。用 Tru Scan 软件统计并分析小鼠在箱内的活动 10 分钟情况。两组小鼠交替在四个设备箱进行实验。实验结束后,将小鼠取出并放回饲养笼,清除小鼠尿液和粪便,然后用 20%的乙醇去除设备箱残留的小鼠气味。箱子大小为:26cm (长)×26cm (宽) ×37cm (高),照明:日光灯关闭,照明强度低于 10 lux。

实验二。方法同实验一。三套相同的设备同时运行,三组小鼠交替在三个设备箱中进行实验。检测时长 5min,照明:180-230 lux。

实验三。方法同实验一。为了检测小鼠长时间的自发活动量和刻板样行为,我们延长检测时间至 60min。本实验室所使用的系统将小鼠刻板样行为定义为,小鼠在某一小范围内连续 3 个及以上的相对于起点不发生较大的位置改变(移动或行进)的一种反复动作,这个动作即为转圈行为。4 套相同的设备同时运行,2 组小鼠交替在 4 套设备箱中进行检测,时长 60min,照明:180-230 lux。

1.4.8. 高架十字迷宫实验 (Elevated plus maze, EPM) 及高架 O 迷宫 (Elevated zero maze)

高架十字迷宫及 O 迷宫均用于检测小鼠的焦虑样情绪。该实验是建立在小

鼠具有趋避空旷和高架地区的天性，同时在新颖环境中具有自发探索行为^[57]。实验一采用高架十字迷宫进行检测。实验设备由开臂、闭臂和中心区域组成。开臂和闭臂垂直交叉形成的区域为中心区域。小鼠可以自由在各个区域探索。用小鼠在开臂所待时间和进入开臂的次数来测量小鼠的焦虑样情绪。实验时，将小鼠背对实验员而头朝向开臂放入中心区域中。使用 Anymaze 视频分析软件录像并分析小鼠 5 分钟内在开臂和闭臂的停留时间和次数。每只小鼠实验结束后，清理小鼠尿液和粪便，并用 20%乙醇去除残留的小鼠气味。开臂大小 35cm（长）×5cm（宽）；闭臂 35cm（长）×5cm（宽）×5cm（高）；照明 50-60 lux。

我们发现，高架十字迷宫实验中，小鼠在十字的中心区域停留时间可能对实验结果造成一定干扰，使得结果较难判定，实验二及实验三中则采用了设计更加合理的高架 O 迷宫。该设备由开臂、闭臂组成并形成圆形如图 Fig.1.3a。实验时，将小鼠背对实验员而头朝向闭臂放入。其他步骤同实验一。迷宫的内径 33cm；外径 46cm；距离地面高 46cm。光照强度：50-60 lux。

1.4.9. 新环境进食抑制（Novelty-suppressed Feeding test, NSF）

本实验以小鼠吃到食物的潜伏期为指标来测量其焦虑和抑郁样情绪。将剥夺一天食物的小鼠放在一个中心有食物、且有强光的新颖旷场中时，小鼠则面临着选择去中心吃食物或者待在周边以避免跑到可导致焦虑的中心区域中^[58]。基于食物奖赏和焦虑对抗，用小鼠吃食物的潜伏期来测量小鼠抑郁样和焦虑样的行为。实验流程如图（Fig.1.2b）。检测所用的旷场装置大小为 40cm（长）×40cm（宽）×45cm（高）；中心放置一片直径 9.0cm 的白色滤纸，食物称重后固定在滤纸上；光照强度：350-400lux。实验前，记录小鼠剥夺食物前后的体重，将小鼠置于一新饲养笼至少 30min，然后将小鼠放置于旷场。当小鼠咬第一口食物时则立即将其取出，记录小鼠吃食物的潜伏时间，最长记录 5min。最后将小鼠放到原饲养笼，并让其自由摄食 3min（食物为放置于旷场中心的食物），称量剩余食物重量。并以小鼠食物消耗量指数来测量其食欲，同时也是作为小鼠焦虑、抑郁样行为的对照。计算公式如下：

$$\text{小鼠食物消耗量指数} = \frac{\text{食物消耗量(mg)}}{\text{体重减少量(g)}} \times 100\%$$

1.4.10. 强迫游泳实验 (Forced swimming test, FST)

当小鼠面临着无法逃避或者回避的压力情况时,其不动状态被认为是“行为绝望”的一种体现,也被解释为动物在“等待”决策或者做出适应性响应。而其中小鼠的不动行为则可以模拟出抑郁症的一种病理状态^[59]。本实验以小鼠束缚在水中的不动时间来测量其抑郁样情绪。容器直径 10cm,高 25cm,水深 15cm;水温: 23℃;光照强度: 50-60lux;设备如图 (Fig.1.3d)。实验时,将小鼠放置于透明的、装了小鼠饮用水的圆柱形容容器。使用 Anymaze 软件或 Forced Swim Version 2.00 软件 (Clever sys 公司) 来录像并分别分析小鼠在 6 分钟内的不动、游泳、逃跑、潜水的活动情况。每只小鼠实验完毕后用灭菌纸巾擦干并放回饲养笼。倒去容器里的水,换上新的小鼠饮用水。

1.4.11. 悬尾实验 (Tail suspension test, TST)

本实验以小鼠悬在空中的不动时间来测量其抑郁样情绪。实验采用 Kinder 公司的悬尾设备。设备箱大小: 30cm×30cm×30cm,光照强度为: 50-60lux (如图 Fig.1.3b)。预实验确定小鼠挣扎的最低阈值,当小鼠处于阈值以下时视为不动状态。实验时,使用医用胶布将小鼠距尾部基端的2/3处粘附,并倒挂小鼠于设备箱内上侧的钩子上,检测其在 6 分钟内的活动情况,实验结束后将小鼠取出,并清理设备箱内的尿液和粪便,喷洒 20%乙醇除去残留气味。两套设备同时运行,两组小鼠交替在两套设备箱内进行检测。使用 Tail Suspension 的软件自动统计小鼠最后 5 分钟的不动时间。

1.4.12. 糖水偏好实验 (Sucrose preference test, SPT)

《精神疾病诊断与统计手册,第五版》认为抑郁症的一项指标是对奖赏的反应性下降,即快感缺乏^[60]。本实验使用糖水 (1%蔗糖) 来检测小鼠对奖赏的反应性以指示小鼠抑郁样情绪。正常情况下小鼠偏好蔗糖水,反之说明小鼠快感缺

乏或有抑郁样情绪。

第一天，适应阶段。在小鼠原饲养笼中多加入一个饮水瓶，让小鼠适应两个瓶子饮水；

第二天，适应阶段。一瓶是标准饮用水，另一瓶替换为 1% 的蔗糖糖水；

第三天，适应阶段。替换两个水瓶位置；

第四天，检测阶段。小鼠单笼饲养，给予饮用水及蔗糖水（水平位置随机），小鼠可自由选择饮水 24h，记录水瓶前后重量；

第五天，检测。水瓶位置调换，再次检测 24h 内两水瓶内饮水消耗量。

数据计算：合并两天内小鼠消耗饮用水及蔗糖水的量，小鼠对糖水偏好性的计算公式：

$$\text{糖水偏好} = \frac{\text{糖水消耗量}}{\text{总液体消耗量}} \times 100\%$$

1.4.13. 食物挖掘实验 (Buried Food Test)

根据小鼠具有利用嗅觉去觅食的天性，让小鼠寻找埋藏的食物，以此检测其嗅探能力^[61]。我们用小鼠寻找到被埋藏食物的潜伏时间来测量其嗅探能力。6 套设备同时进行，2 组小鼠交替在设备箱中进行检测。实验设备如图 (Fig1.3g)，流程如下：

- (1) 剥夺小鼠进食 18h (21:00-15:00)；
- (2) 第二天，将小鼠放入检测笼盒中（底部垫有 3cm 深的垫料）适应 5min；
- (3) 将小鼠取出暂时放在一干净笼盒；
- (4) 将小鼠平时吃的饲料颗粒 (1.5±0.3g) 埋藏于垫料下 1cm 深，开启录像；
- (5) 将小鼠放入设备内 5min，通过观察录像记录小鼠挖掘出并咬第一口食物时的潜伏期。
- (6) 取出小鼠，放回原饲养笼，恢复给食。

1.4.14. 社会交互实验 (Five-trial social interaction test, SIT)

社会交互实验用于评估小鼠的社会识别能力，即识别新颖小鼠和熟悉小鼠的

能力，本实验将其分成三种社交能力，包括社交能力、社交记忆和社交新奇性。实验在待测小鼠的饲养笼内进行。其中，以待测小鼠首次主动接触陌生小鼠（刺激小鼠）的总时间来测量其社交能力（Sociability）；待测小鼠多次暴露于同一刺激小鼠，以其每次接触的时间变化量来测量小鼠的社交记忆能力（Social memory）；以待测小鼠接触新刺激的时间与旧刺激鼠的时间差异来测量其社交记忆的提取能力即社交新奇能力（social novelty）。

实验的刺激小鼠为 6 周龄 BALB/c 小鼠，实验时间为 20:00-次日 6:00，在昏暗的红灯下进行。通过观察录像，记录待测小鼠在 1min 的检测区间内每次接触刺激鼠的时间，包括待测小鼠主动去嗅探、舔舐刺激小鼠的肛殖区和头部。受训后的统计人员通过观察视频录像来记录。双盲统计每次接触的时间。实验流程（Fig.1.2d）如下：

- （1）待测小鼠单笼饲养 5 天，期间不更换垫料；
- （2）实验当天，让小鼠先适应录像设备 30min，实验开始前开启录像；
- （3）将刺激 A 鼠放入待测小鼠饲养笼内，1min 后取出，间隔 10min 后再将刺激鼠 A 放入待测小鼠笼内，重复 4 次；
- （4）将一新的刺激鼠 B 放入待测小鼠饲养笼内，1min 后取出。

1.4.15. 做窝行为实验（Nest building test, NBT）

做窝行为是一种先天行为，对于小鼠来说可以用来保持体温和躲避掠食者^[62]。做窝的能力经常被用作小鼠神经疾病模型的一个参数，如阿尔茨海默症^[63]、自闭症^[64]、抑郁症^[65]等小鼠模型的做窝能力都有不同程度的降低，同时可以反应其抑郁样情绪。本实验通过小鼠做窝的形状进行给分，用以测量小鼠的做窝能力以指示其抑郁样情绪。实验在 18:00-次日 8:00 进行。将小鼠单笼饲养，更换新垫料、食物和水，每个饲养笼内的左上角放置一块紧实的棉花板块（大小：5cm×5cm×0.5cm，重 2.7g，Ancare 公司）。第二天进行拍照并打分。两个实验者分别打分，双盲，以平均值为最终得分。打分规则和图例（Fig.1.3d）如下：

0 分，没有做窝，棉板块没有动过；

- 1 分，棉块被撕碎，但是无凸起状
- 2 分，窝的形状不完整，只有部分凸起状；
- 3 分，窝的形状像一个广口杯，窝壁没有完全垒叠起来；
- 4 分，窝的形状像一个细口杯，窝壁完全垒叠起来。

1.4.16. 被动回避实验 (Passive avoidance test, PAT)

被动回避实验是由恐惧来驱动的回避反应行为的检测，以小鼠进入惩罚箱的潜伏期来测量小鼠抑制能力和背侧海马依赖的记忆能力^[66]。实验采用 kinder 公司的穿梭箱设备，箱子中间有一个可以自动开启和关闭的门。实验设备由两个箱子组成，箱子大小：20.3cm×25.4cm×35.7cm；由电脑自动控制开关的闸门分隔为 A 箱（明箱：光照强度：980~2520 lux）和 B 箱（暗箱，给予足部电击）。箱体底部可给予小鼠足部电击。在检测阶段中，以小鼠从 A 箱进入 B 箱的潜伏期来测量小鼠的抑制能力和记忆能力。

实验流程如图 (Fig.1.2c)。

第一天，适应阶段。将小鼠放入 A 箱 30s 后开启闸门，仪器自动记录小鼠进入 B 箱的潜伏期。小鼠进入 B 箱后立即取出并放回原饲养笼。20%乙醇清除小鼠气味；

第二天，训练阶段。将小鼠放入 A 箱 30s 后开启闸门，仪器自动记录小鼠进入 B 箱的潜伏期。当小鼠进入 B 箱后，仪器自动关闭闸门，3s 后给予足部电击 (0.5mA, 2s)。30s 后将小鼠放回原饲养笼。20%乙醇清除小鼠气味；

第三天，检测阶段。将小鼠放回 A 箱 5s 后开启闸门。记录小鼠进入 B 箱的潜伏期。若 10min 后还没有进入，则记录为 10min。

1.4.17. 条件恐惧记忆实验 (Fear conditioning test, FCT)

情景性条件恐惧反应 (contextual fear conditoning) 测试是将小鼠放置于一新环境，给予厌恶刺激 US（如足底电刺激）后取出，如果小鼠记得这个环境与厌恶刺激的关联，那么当小鼠再次回到这个环境时，它通常会有僵直 (Freezing)

反应^[67]。僵直被定义为“除了呼吸之外的不动状态”^[67]。并且这个学习过程主要依赖于背侧海马^[68]。线索性条件恐惧记忆实验（Cued fear conditioning）是将一个 CS（如声音刺激）加入环境中；本实验选择延迟条件性刺激，在给予 CS 的最后几秒给予 US，当小鼠在另一新环境中再次接受 CS 时，通常也会有僵直反应^[67]。而这个学习过程主要依赖杏仁核的基底外侧核^[67]。本实验以僵直的时间来测量小鼠的联合学习能力。实验设备使用 Panlab Harvard Apparatus 公司的软件和硬件。两组小鼠在四个设备中交替检测。实验流程（Fig.1.2e）如下：

（1）适应阶段。让小鼠适应设备 20min，背景白噪音 60dB；

（2）训练阶段。小鼠进入设备（黑色方形墙，栅格底板）3min 后，给予 20s 声音刺激（CS，80dB，3kHz），在末尾 2s 给予足底电刺激（US，0.4mA），间隔 30s 后再次给予 CS 和 US，一共重复 3 次，最后小鼠在设备内呆 2min 后取出并放回原饲养笼，70%乙醇清理设备；实验期间开启背景音；

（3）检测阶段。情景记忆检测时，将小鼠放回原来训练它的设备中，时长 6min；两小时后进行线索记忆检测。将小鼠放置于一新环境中（白色圆形墙、平面底板，1%醋酸）3min，然后开启声音（CS，80dB，3kHz），持续 3min。实验期间开启背景音。

1.4.18. 前脉冲抑制实验（Prepulse inhibition, PPI）

听觉惊吓反应是一种保护性反应，是由突然而强烈的声音刺激引发的^[69]。当两个声音刺激在相隔很短时间内依次出现时，第一个较弱的阈下声音刺激会降低动物对第二个较强的阈上声音刺激的惊吓反应幅度，这种现象叫做前脉冲抑制^[69; 70]。而在很多精神分裂和狂躁型抑郁症的病患中都发现有前脉冲抑制缺失的现象^[71; 72]。本实验以前脉冲抑制率（PPI）来测量小鼠的感觉门控能力。实验设备采用 SR-LAB 惊吓反应系统，包括隔音减震的隔离箱，限制小鼠运动的圆柱形内罩，监测小鼠惊吓反应的传感器。实验时，将小鼠放入内罩，关闭隔离箱门，然后在电脑上使用设备配套软件给予一系列声音刺激。仪器记录小鼠在测试期间对每个声音刺激的惊吓反应程度。实验结束后将小鼠取出，20%乙醇清理设备和清

除小鼠气味。

整个实验阶段背景噪音设置为 65dB。实验分为四个阶段：适应期、单独惊吓刺激 1 期（SS1）、混合期、单独惊吓刺激 2 期（SS2）。四个阶段依次出现。其中，适应期持续 5 分钟。SS1 期设置为 6 个单独惊吓刺激（120dB），刺激时长 40 毫秒，刺激间隔时间在 5~25 秒之间随机变化。混合期设置为 68 个刺激，每个刺激之间的时间间隔为 5~25 秒之间随机变化。混合期的刺激类型分为 8 种，具体刺激参数见下表 1.1。前三种刺激各出现 6 次，后五中刺激各出现 10 次，出现顺序随机。SS2 期参数设置与 SS1 期相同。

表 1-1 PPI 测试混合期参数设置

前脉冲刺激	间隔时长	惊吓刺激	惊吓反应符号
73dB, 20ms	80ms	120dB,40ms	SR _{PPI73}
77dB, 20ms	80ms	120dB,40ms	SR _{PPI77}
81dB, 20ms	80ms	120dB,40ms	SR _{PPI81}
73dB, 40ms	无	无	SR ₇₃
77dB, 40ms	无	无	SR ₇₇
81dB, 40ms	无	无	SR ₈₁
无（White Noise）	无	120dB,40ms	SR ₁₂₀
0dB, 40ms	无	无	SR _{negative}

PPI 计算公式：

$$\text{White Noise 的 PPI (\%)} = \frac{AvgSR_{120} - AvgSR_{PPI71}}{AvgSR_{120}} \times 100\%$$

$$71\text{dB 的 PPI (\%)} = \frac{AvgSR_{120} - AvgSR_{PPI71}}{AvgSR_{120}} \times 100\%$$

$$77\text{dB 的 PPI (\%)} = \frac{AvgSR_{120} - AvgSR_{PPI77}}{AvgSR_{120}} \times 100\%$$

$$81\text{dB 的 PPI (\%)} = \frac{AvgSR_{120} - AvgSR_{PPI81}}{AvgSR_{120}} \times 100\%$$

其中， $AvgSR_{120}$ 是 SS1 和 SS2 期惊吓刺激反应的平均值； $AvgSR_{PPI71}$ 、 $AvgSR_{PPI77}$ 、 $AvgSR_{PPI81}$ 分别是 71dB、77dB、81dB 前脉冲抑制后的惊吓刺激反

应。

1.5. 实验数据处理和分析

使用 GraphPad Prism 6 进行数据统计，根据实验设计采用 unpaired two-tailed t-test、paired two-tailed t-test、One-way ANOVA、Tukey's multiple comparison Test、Two-way RM ANOVA、Sidak's multiple comparisons test、Log-rank (Mantel-Cox) Test 方法进行分析，用平均值 \pm 标准误显示数据。P<0.05 为差异具有统计学意义；P<0.01 为统计学上具有显著差异；P<0.001 为统计学上具有极显著差异。

2. 结果

2.1. C57BL/6 少年小鼠过敏性鼻炎模型的建立及其持续暴露于过敏原期间的行为特征

采用 4 周龄的 C57BL/6 小鼠进行 OVA 致敏，连续 7 天激发后进行挠鼻子的行为学打分，结果显示 OVA 组小鼠有 1 只不足 10 分，其他都大于 10 分。行为学结束后各组随机选取 3 只小鼠进行 PCA 实验。结果显示，OVA 组小鼠的血清呈现高表达抗 OVA 抗原的抗体，均是阳性结果；而 3 只 Veh 组小鼠则均是阴性结果 (Fig.1.4a)。AR 模型基本建立成功。

连续激发一周后开始进行行为学检测，期间每天行为学检测完毕后再给予鼻腔激发。旷场实验结果显示，OVA 组小鼠总运动距离 $1801 \pm 105.9\text{cm}$ 较 Veh 组小鼠 $2088 \pm 40.57\text{cm}$ 明显减少 ($p = 0.0322$) (Fig.1.4c)；OVA 组小鼠的总运动时间 $391.6 \pm 9.167\text{s}$ 与 Veh 组小鼠的总运动时间 $413.9 \pm 3.608\text{s}$ 没有明显统计学差异 ($p = 0.0542$) (Fig.1.4d)；OVA 组小鼠的总运动次数 194.3 ± 3.624 和 Veh 组小鼠的总运动次数 189.9 ± 3.695 也无明显统计学差异 ($p = 0.4200$) (Fig.1.4e)；OVA 组小鼠进入中央区域的次数 44.00 ± 4.796 比 Veh 组小鼠 56.50 ± 1.721 明显减少 ($p = 0.0371$) (Fig.1.4b)。表明 OVA 组小鼠运动迟缓，并其表现出焦虑样行为。

高架十字迷宫实验显示 OVA 组小鼠进入开臂的时间 59.30 ± 5.381 比 Veh 组小鼠进入开臂的时间 $88.05 \pm 9.065\text{s}$ 明显减少 ($p = 0.0213$) (Fig.1.5a)；但是 OVA

组小鼠的运动距离 $9.859 \pm 0.4717\text{m}$ 与 Veh 组小鼠 $10.77 \pm 0.4440\text{m}$ 无明显统计学差异 (Fig.1.5b)。表明 OVA 组小鼠表现出了焦虑样行为。

悬尾实验中, OVA 组小鼠不动时间 $50.34 \pm 3.573\text{s}$ 比 Veh 组小鼠不动时间 $39.27 \pm 3.303\text{s}$ 明显增加 ($p = 0.0377$) (Fig.1.5c); 强迫游泳实验中 OVA 组小鼠不动时间 $26.38 \pm 1.625\text{s}$ 与 Veh 组小鼠的不动时间 $26.10 \pm 1.545\text{s}$ 没有明显统计学差异 ($p = 0.9046$) (Fig.1.5d)。表明 OVA 组小鼠展现出部分抑郁样行为。

前脉冲抑制实验中, OVA 组小鼠对 120dB 声音的惊吓刺激声音的反应程度 73.45 ± 5.509 与 Veh 组小鼠的反应程度 86.38 ± 11.14 无明显统计学差异 ($p = 0.3508$) (Fig.1.6a); 在 73dB 的前脉冲声音下, OVA 组小鼠对惊吓刺激声音的抑制率 $23.50 \pm 5.355\%$ 与 Veh 组小鼠的抑制率 $20.51 \pm 4.642\%$ 无明显统计学差异 ($p = 0.6776$); 在 77dB 的前脉冲声音下, OVA 组小鼠对惊吓刺激声音的抑制率 $31.18 \pm 3.363\%$ 与 Veh 组小鼠的抑制率 $25.23 \pm 5.906\%$ 无明显统计学差异 ($p = 0.4256$); 在 81dB 的前脉冲声音下, OVA 组小鼠对惊吓刺激声音的抑制率 $41.60 \pm 7.201\%$ 与 Veh 组小鼠的抑制率 $30.54 \pm 5.996\%$ 无明显统计学差异 ($p = 0.2512$)。

通过 Two-way RM ANOVA 方法分析比较了小鼠在有前脉冲刺激和无前脉冲刺激时对惊吓刺激的抑制反应。由于前脉冲刺激因素 (组内因素) 和 OVA 因素 (组间因素) 对 PPI 无明显交互影响 ($F_{(3, 48)} = 0.5338, P = 0.6614$); OVA 因素对 PPI 无明显影响 ($F_{(1, 16)} = 1.330, P = 0.2657$); 前脉冲刺激因素对 PPI 具有明显影响 ($F_{(3, 48)} = 19.97, P < 0.0001$); 因此需要进行事件后分析, Sidak's *post-hoc* 分析得出 OVA 组小鼠在无前脉冲刺激声音 (白噪音) 下对惊吓刺激反应的抑制率为 $12.99 \pm 4.085\%$, 相比较这与 OVA 组小鼠在 73dB 下无明显统计学差异 ($p = 0.3577$)、在 77dB 和 81dB 下都表现出明显的惊吓刺激抑制的反应 ($p_{(77\text{dB})} = 0.0147, p_{(83\text{dB})} < 0.0001$); Veh 组小鼠在无前脉冲刺激声音 (白噪音) 下对惊吓刺激的抑制率为 $2.101 \pm 7.141\%$, 相比较这与 Veh 组小鼠在 73dB、77dB、81dB 的前脉冲刺激声音下都表现出了明显的抑制反应 ($p_{73\text{dB}} = 0.0043, p_{77\text{dB}} = 0.0002, p_{81\text{dB}} < 0.0001$)。结果表明, OVA 组小鼠的感觉门控能力没有明显受损。

小结: 实验结果显示, C57BL/6 少年小鼠过敏性鼻炎模型建立基本成功; AR

小鼠持续暴露于过敏原期间表明 OVA 组小鼠运动迟缓，总运动时间和次数无明显异常，焦虑样行为明显增加，部分抑郁样行为都明显增加，但前脉冲惊吓反应抑制能力无明显异常。

2.2. C57BL/6 少年小鼠过敏性鼻炎模型的建立及其长期隔离过敏原后的行为特征

小鼠在进行行为学检测前每组随机选取 1 只小鼠进行 PCA 实验，结果显示 OVA 组小鼠的血清呈现高表达抗 OVA 抗原的抗体，为阳性结果；Veh 组小鼠和 PA 组小鼠的血清中没有表达抗 OVA 抗原的抗体，为阴性结果（Fig.1.7a）。在行为学结束后，每组随机挑选 3 只小鼠，再次进行 PCA 实验，结果显示 OVA 组小鼠血清仍为阳性，Veh 组小鼠血清均为阴性，而 PA 组小鼠有 1 只呈现阴性 2 只呈现阳性（Fig.1.7b）。小鼠末次激发后，3 组小鼠的挠鼻子次数无明显统计学差异（ $F_{(2,36)} = 1.276, P = 0.2914$ ）；打喷嚏次数无明显统计学差异（ $F_{(2,36)} = 1.024, P = 0.3695$ ），但是 OVA 组小鼠显示出较高的趋势（Fig.1.7cd），综合来看，我们认为 AR 小鼠模型建立基本成功。

末次激发后隔离过敏原 3 个月再进行行为学检测，实验数据采用 One-way ANOVA 进行分析比较 3 组小鼠。

旷场实验中 3 组小鼠在 5min 内的总移动距离没有明显统计学差异（ $F_{(2,32)} = 0.5753, P = 0.5682$ ）（Fig.1.8a）；总运动次数没有明显统计学差异（ $F_{(2,32)} = 1.921, P = 0.1630$ ）（Fig.1.8b）；进入中心区域时间没有明显统计学差异（ $F_{(2,32)} = 0.2157, P = 0.8071$ ）（Fig.1.8c）；进入中心区域的次数也没有明显统计学差异（ $F_{(2,32)} = 0.03155, P = 0.9690$ ）（Fig.1.8d）。

高架 O 迷宫实验显示，3 组小鼠进入开臂次数没有明显统计学差异（ $F_{(2,32)} = 0.4593, P = 0.6358$ ）；进入开臂的时间也没有明显统计学差异（ $F_{(2,32)} = 1.111, p = 0.3417$ ）（Fig.1.9）。

新环境进食抑制实验显示 3 组小鼠进食量的指数没有明显统计学差异（ $F_{(2,29)} = 1.551, P = 0.2292$ ）（Fig.1.10a）；为了更加科学的描述实验结果，采用了 Log-rank Test 进行分析 3 组小鼠主动摄食的潜伏期，结果显示 3 组小鼠主动摄食的潜伏期

也没有明显统计差异 ($\chi^2 = 0.2036$, $df = 2$, $p = 0.9032$) (Fig.1.10b)。

3 组小鼠在强迫游泳中的不动时间没有明显统计学差异 ($F_{(2,30)} = 0.1275$, $P = 0.8807$) (Fig.1.11a)。3 组小鼠在悬尾实验中不动时间无明显统计学差异 ($F_{(2,30)} = 0.2659$, $P = 0.7683$) (Fig.1.11b)。

采用被动回避实验来检测小鼠的抑制能力和记忆能力, 结果显示 3 组小鼠在适应阶段进入暗箱的潜伏期没有明显统计差异 ($F_{(2,29)} = 0.3713$, $P = 0.6930$); 训练阶段进入暗箱的潜伏期也没有明显统计学差异 ($F_{(2,29)} = 0.3599$, $P = 0.7008$); 由于小鼠可能在实验观察期内仍旧没有进入暗箱, 因此为了更加科学的描述实验结果, 采用了 Log-rank Test 分析 3 组小鼠进入暗箱的潜伏期, 结果 3 组小鼠进入暗箱的潜伏期也没有明显统计学差异 ($\chi^2 = 2.984$, $df = 2$, $p = 0.2250$) (Fig.1.12)。

当小鼠再次暴露于过敏原 OVA 期间时, 采用 Two-way RM ANOVA 进行分析, 结果显示 3 组小鼠在旷场实验的移动距离与再次暴露 OVA 前的移动距离比较无明显统计学差异 (Time: $F_{(2,21)} = 0.5242$, $P = 0.5996$); 3 组小鼠再次暴露于 OVA 期间移动距离也无明显统计学差异 (OVA re-exposure: $F_{(1,21)} = 3.771$, $P = 0.0657$); 并且时间因素 (组内因素) 和再次暴露 OVA 因素 (组间因素) 没有明显交互影响 (Interaction: $F_{(2,21)} = 0.05628$, $P = 0.9454$) (Fig.1.13a)。结果提示, 3 组小鼠再次暴露 OVA 期间和再次暴露 OVA 前后的自发活动量无明显统计学差异。

3 组小鼠进入中心区域的时间与再次暴露前进入中心区域的时间比较, 时间因素和再次暴露 OVA 因素存在明显交互影响 (Interaction: $F_{(2,21)} = 10.22$, $P = 0.0008$); 而由于时间因素对小鼠没有明显影响 ($F_{(2,21)} = 1.597$, $P = 0.2262$), 提示 3 组小鼠再次暴露前后进入中心区域的时间无明显统计学差异; 再次暴露 OVA 因素对小鼠产生明显影响 (OVA re-exposure: $F_{(1,21)} = 6.265$, $P = 0.0206$), 提示 3 组小鼠再次暴露 OVA 期间进入中心区域时间存在明显统计学差异。经 Sidak's *post-hoc* 分析结果发现 PA 组小鼠再次暴露过敏原期间, 其进入中心区域时间比再次暴露过敏原期前明显减少 ($p = 0.0002$); 而再次暴露过敏原期间 PA 组小鼠比 Veh 组小鼠进入中心区域时间明显减少 ($p = 0.0026$) (Fig.1.13b)。而 OVA 组小鼠再次暴露过敏原期间, 其进入中心区域时间比再次暴露过敏原前无明显统计学差异

($p = 0.9470$)；而再次暴露过敏原期间 OVA 组小鼠比 Veh 组小鼠进入中心区域时间明也无明显统计学差异 ($p = 0.1695$)。实验结果提示，服用 PA 后的 AR 小鼠再次接触过敏原时表现出了焦虑样行为，但是未服用过 PA 的 AR 小鼠则没有表现出异常的焦虑样行为。

强迫游泳实验中 3 组小鼠不动时间与再次暴露过敏原前的不动时间比较，时间因素对小鼠不动时间的影响无明显统计学差异 (Time: $F_{(1, 22)} = 3.623$, $P = 0.0702$)；再次暴露 OVA 对小鼠不动时间无明显影响 (OVA re-exposure: $F_{(2, 22)} = 0.3840$, $P = 0.6856$)；时间因素和再次暴露 OVA 因素没有明显交互影响 (Interaction: $F_{(2, 20)} = 0.2611$, $P = 0.7728$) (Fig.1.14a)。结果提示，在强迫游泳实验中 AR 小鼠和服用过 PA 的 AR 小鼠都没有表现出异常的抑郁样行为。

悬尾实验中 3 组小鼠不动时间与再次过敏原暴露前的不动时间比较，时间因素对小鼠不动时间有明显统计学差异 (Time: $F_{(1, 41)} = 5.074$, $P = 0.0297$)，但 Sidak's *post-hoc* 分析结果发现 3 组小鼠组间都无明显差异 ($p > 0.2$)；再次暴露 OVA 因素对小鼠不动时间没有明显统计学差异 (OVA re-exposure: $F_{(2, 41)} = 0.8718$, $P = 0.4258$)，并且时间和再次暴露 OVA 因素没有明显交互影响 (Interaction: $F_{(2, 16)} = 0.3747$, $P = 0.6934$) (Fig.1.14b)。结果提示，在悬尾实验中 AR 小鼠和服用过 PA 的 AR 小鼠都没有表现出异常的抑郁样行为。

小结：实验结果表明，C57BL/6 少年小鼠过敏性鼻炎模型建立基本成功；长期隔离（3 个月）过敏原后 AR 小鼠和服用过 PA 的 AR 小鼠在情绪和记忆能力上无明显异常；再次持续暴露于过敏原时 AR 小鼠情绪上无明显行为异常，而服用过 PA 的 AR 小鼠自发活动量无明显异常，但焦虑样行为明显增加。

2.3. BALB/c 少年小鼠过敏性鼻炎模型的建立及其短期隔离过敏原后的行为特征

BALB/c 小鼠按体重随机分组，OVA 组小鼠体重为 $16.65 \pm 0.1808\text{g}$ ，Veh 组小鼠体重为 $16.69 \pm 0.2062\text{g}$ 。在激发 1 个星期后 OVA 组小鼠的体重 $24.56 \pm 0.2862\text{g}$ 比 Veh 组小鼠体重 $25.68 \pm 0.3265\text{g}$ 明显减少 ($p = 0.0332$)；在激发 2 周后 OVA 组小鼠体重恢复到 $25.63 \pm 0.2927\text{g}$ 与 Veh 组小鼠体重 $26.38 \pm 0.3483\text{g}$ 之间无明显

显统计学差异 ($p=0.4352$) (Fig.1.15)。末次激发后观察小鼠抓鼻和打喷嚏行为, 结果 OVA 组小鼠的抓鼻次数 9.625 ± 1.244 比 Veh 组小鼠的抓鼻次数 4.000 ± 0.3096 明显增加 ($p=0.0001$); OVA 组小鼠的打喷嚏次数 8.000 ± 0.9421 比 Veh 组小鼠的打喷嚏次数 5.531 ± 0.5332 明显增加 ($p=0.0298$)。末次激发 12 小时后每组随机选取 3 只小鼠进行 PCA 检测, 结果显示 OVA 组小鼠表达了抗 OVA 的抗体, 均为阳性, Veh 组小鼠没有表达抗 OVA 的抗体, 结果均为阴性结果 (Fig.1.16a)。末次激发 12 小时后每组随机选取 3 只小鼠的鼻腔进行吉姆萨染色实验, 结果 OVA 组小鼠的鼻粘膜固有层中的嗜酸性粒细胞个数 25.33 ± 2.404 比 Veh 组小鼠中的个数 3.667 ± 1.202 明显增加 ($p=0.0013$) (Fig.1.16e)。结果表明, BALB/c 少年小鼠过敏性鼻炎模型建立基本成功。

行为学检测后, 每组随机选取 3 只小鼠进行 PCA 检测, 结果显示 OVA 组小鼠血清均为阳性, Veh 组小鼠血清均为阴性 (Fig.1.16b)。表明, BALB/c 少年小鼠体内持续表达着对 OVA 抗原的抗体。

末次激发 2 周后进行行为学检测。旷场实验中, 采用 Two-way RM ANOVA 分析小鼠的自发活动量。结果显示小鼠在 60min 内 OVA 因素 (组间) 和时间因素 (组内) 对小鼠的运动距离没有明显交互影响 (Interaction: $F_{(11,374)}=0.9212$, $P=0.5198$); OVA 对小鼠运动距离没有明显影响 (OVA challenge: $F_{(1,34)}=0.1525$, $P=0.6986$); 时间因素对组内小鼠的运动距离产生明显影响 (Time: $F_{(11,374)}=52.19$, $P<0.0001$), 提示两组小鼠运动距离的变化只是由时间引起的 (Fig.1.17a)。同时, 时间和 OVA 因素对小鼠的运动次数无明显交互影响 (Interaction: $F_{(11,374)}=0.7073$, $P=0.7317$); OVA 对小鼠运动次数无明显影响 (OVA challenge: $F_{(1,34)}=1.880$, $P=0.1793$); 时间因素对组内小鼠的运动次数产生明显效应 (Time: $F_{(11,374)}=18.36$, $P<0.0001$), 提示两组小鼠在 60min 内的运动次数的变化是由时间引起的 (Fig.1.17b)。结果表明, OVA 组小鼠的自发活动量与 Veh 组小鼠相比没有明显统计学差异。

另外在旷场实验中还分析了小鼠的焦虑样行为。在这 60min 内 OVA 因素对小鼠进入中心区域的时间没有明显影响 (OVA challenge: $F_{(1,34)}=0.9156$, $P=$

0.3454); 时间因素对小鼠进入中心区域产生明显影响 (Time: $F_{(11,374)} = 3.011$, $P = 0.0007$); 由于时间因素和 OVA 因素对小鼠进入中心区域的时间存在交互影响 (Interaction: $F_{(11,374)} = 1.845$, $P = 0.0454$), 但是 Sidak's *post-hoc* 分析 Veh 组小鼠和 OVA 组小鼠的差异无统计学意义 ($p > 0.6$); 提示, 小鼠进入中心区域的时间变化是由时间因素导致的, 而不是 OVA 引起的 (Fig.1.17c)。类似的, OVA 因素对小鼠进入中心区域次数的影响 (Fig.1.17d) 亦无明显统计学差异 (OVA challenge: $F_{(1,34)} = 0.2044$, $P = 0.6540$), 时间因素对小鼠进入中心区域次数的影响则有明显差异 (Time: $F_{(11,374)} = 15.15$, $P < 0.0001$), 并且时间因素和 OVA 因素对小鼠进入中心区域的时间无明显统计学差异 (Interaction: $F_{(11,374)} = 1.504$, $P = 0.1274$), 提示, OVA 对小鼠进入中心区域的次数变化是由时间因素导致的, 而不是 OVA 引起的。结果表明, OVA 组小鼠的焦虑样行为没有明显异常。

旷场实验中我们还分析了小鼠的刻板样行为。OVA 组小鼠在 60min 内的总运动次数 2178 ± 37.21 与 Veh 组小鼠的总移动次数 2224 ± 39.20 无明显统计学差异 ($p = 0.4026$) (Fig.1.17e); OVA 组小鼠的刻板样行为的总次数 312.7 ± 5.289 比 Veh 组小鼠的总次数 327.4 ± 3.637 明显减少 (Fig.1.17f) ($p = 0.0287$); OVA 组小鼠发生刻板样行为的总时间 $650.2 \pm 17.60s$ 比 Veh 组小鼠的总时间 $699.9 \pm 16.73s$ 明显减少 ($p = 0.0485$) (Fig.1.17g)。

高架 O 迷宫实验中, OVA 组小鼠进入高架零迷宫开放臂的次数 16.00 ± 2.061 与 Veh 组小鼠进入的次数 12.22 ± 1.830 无明显统计学差异 ($p = 0.1795$) (Fig.1.18c); OVA 组小鼠进入开放臂的时间 $62.62 \pm 8.964s$ 与 Veh 组小鼠进入的时间 $46.31 \pm 8.214s$ 无明显统计学差异 ($p = 0.1886$) (Fig.1.18d)。

在糖水偏好实验中, 两组小鼠对糖水都有偏好性 ($>50\%$), 同时 OVA 组小鼠对糖水的偏好性 $64.66 \pm 3.943\%$ 与 Veh 组小鼠对糖水偏好性 $66.93 \pm 4.807\%$ 没有明显统计学差异 ($p = 0.7200$) (Fig.1.18e)。

新环境抑制进食中 (Fig.1.19ab), OVA 组小鼠的摄食指数 2.355 ± 0.3888 与 Veh 组小鼠的指数 2.214 ± 0.4383 无明显统计学差异 ($p = 0.8124$); 通过 Log-rank

Test 分析得出 OVA 组小鼠主动吃到食物的潜伏期与 Veh 组小鼠的潜伏期比较也无明显统计学差异 ($\chi^2 = 1.104$, $df = 1$, $p = 0.2935$)。

悬尾实验中, OVA 组小鼠不动时间 $130.6 \pm 13.09s$ 比 Veh 组小鼠的不动时间 $93.39 \pm 9.115s$ 明显增多 ($p = 0.0262$) (Fig.1.19c)。强迫游泳实验中 (Fig.1.20), OVA 组小鼠的不动时间 $103.4 \pm 11.63s$ 与 Veh 组小鼠 $113.7 \pm 5.806s$ 没有明显统计学差异 ($p = 0.4315$); OVA 组的逃跑时间 $28.44 \pm 4.855s$ 与 Veh 组逃跑时间 $20.92 \pm 2.509s$ 没有明显统计学差异 ($p = 0.1778$); OVA 组小鼠的游泳时间 $101.4 \pm 12.89s$ 与 Veh 组小鼠的游泳时间 $111.5 \pm 9.358s$ 没有明显统计学差异 ($p = 0.5310$); OVA 组小鼠的攀爬时间 $66.77 \pm 12.55s$ 与 Veh 组小鼠的攀爬时间 $52.96 \pm 9.463s$ 没有明显统计学差异 ($p = 0.3856$), 而 F 检验分析结果显示 OVA 组小鼠不动时间离散程度 ($p = 0.0065$) 和游泳时间的离散程度 ($p = 0.0095$) 都高于 Veh 组小鼠。结果表明, OVA 组小鼠表现出了部分抑郁样行为。

做窝实验中 (Fig.1.21a), OVA 组小鼠的做窝得分 2.389 ± 0.2791 与 Veh 组小鼠得分情况 3.000 ± 0.1808 无有明显统计学差异 ($p = 0.0748$)。

嗅觉能力检测实验中, OVA 组小鼠吃到食物的潜伏期 $32.56 \pm 5.041s$ 与 Veh 组小鼠吃到的潜伏期 $39.65 \pm 6.482s$ 没有统计学差异 ($p = 0.3910$) (Fig.1.21b)。

社会交互实验中 (Fig.1.21c) 待测小鼠在第 1 到第 4 个 trial 中接触同一只刺激鼠, 在第 5 个 trial 中接触新的刺激鼠。我们采用 Two-way RM ANOVA 进行分析, 时间因素 (组内因素) 和 OVA 因素 (组间因素) 对接触刺激鼠的时间没有明显交互影响 (Interaction: $F_{(4, 120)} = 0.6904$, $P = 0.6000$); OVA 因素对接触刺激鼠的时间没有明显影响 (OVA challenge: $F_{(1, 30)} = 1.346$, $P = 0.2551$); 经 Sidak's *post-hoc* 事件后检验, 结果显示, 在第 1 个 trial 中, OVA 组小鼠接触刺激鼠的时间 $39.43 \pm 2.016s$ 与 Veh 组小鼠接触的时间 $42.47 \pm 2.096s$ 无明显统计学差异 ($p = 0.8886$), 结果提示 OVA 组小鼠的社交能力与 Veh 组小鼠没有明显统计学差异。另外, 在第 5 个 trial 中, OVA 组小鼠接触刺激鼠的时间 $43.03 \pm 2.278s$ 与 Veh 组小鼠接触刺激鼠的时间 $37.13 \pm 2.053s$ 无明显统计学差异 ($p = 0.3186$)。提示, OVA 组小鼠的社交能力与 Veh 组小鼠无明显统计学差异。

为了比较小鼠在不同 trial 中接触刺激鼠的时间，Two-way RM ANOVA 分析结果显示时间因素（组内因素）对接触刺激鼠的时间有明显统计学差异（ $F_{(4, 120)} = 9.287, P < 0.0001$ ），经 Sidak's *post-hoc* 事件后检验结果显示，第 1 个 trial 和第 3 个 trial 比较中，OVA 组小鼠在第 3 个 trial 中接触刺激鼠的时间 $31.17 \pm 2.597s$ 比在第 1 个 trial 中明显减少（ $p_{(OVA1:OVA3)} = 0.0259$ ）；Veh 组小鼠在第 3 个 trial 中接触刺激鼠的时间 $33.94 \pm 1.958s$ 比在第 1 个 trial 中接触时间要明显减少（ $p_{(Veh1:Veh3)} = 0.0099$ ）；第 1 个和第 4 个 trial 比较中，OVA 组小鼠在第 4 个 trial 中接触刺激鼠的时间 $33.57 \pm 2.905s$ 比在第 1 个 trial 中无明显统计学差异（ $p_{(OVA1:OVA4)} = 0.2709$ ）；Veh 组小鼠在第 4 个 trial 中接触刺激鼠的时间 $33.56 \pm 2.404s$ 比在第 1 个 trial 中接触时间要明显减少（ $p_{(Veh1:Veh4)} = 0.0059$ ）。结果提示，OVA 组小鼠能获得对刺激鼠的社交记忆（trial 3），但是 OVA 组小鼠对于社交记忆却没能得到维持（trial 4）；Veh 组小鼠可以获得并维持对刺激鼠的社交记忆。

在第 4 个 trial 和第 5 个 trial 比较中，Sidak's *post-hoc* 事件后检验结果显示，OVA 组小鼠在第 5 个 trial 中接触新刺激鼠的时间与在 4 个 trial 中接触旧刺激鼠的时间无明显统计学差异（ $p_{(OVA4:OVA5)} = 0.8743$ ）；Veh 组小鼠在第 5 个 trial 中接触新刺激鼠的时间比第 4 个 trial 时接触旧刺激鼠的时间明显增加（ $p_{(Veh4:Veh5)} = 0.0027$ ）。结果提示，OVA 组小鼠社交新奇性可能受损。

前脉冲抑制实验中，OVA 组小鼠对 120dB 的惊吓声音刺激的反应程度 25.81 ± 2.282 与 Veh 组小鼠的反应程度 24.70 ± 1.106 没有明显统计学差异（ $p = 0.6667$ ）；在 73dB 的前脉冲声音下，OVA 组小鼠对惊吓刺激声音的抑制率 $24.72 \pm 4.062\%$ 与 Veh 组小鼠的抑制率 $24.32 \pm 4.135\%$ 无明显统计学差异（ $p = 0.9461$ ）；在 77dB 的前脉冲声音下，OVA 组小鼠对惊吓刺激声音的抑制率 $32.86 \pm 4.185\%$ 与 Veh 组小鼠的抑制率 $34.30 \pm 3.015\%$ 无明显统计学差异（ $p = 0.7812$ ）；在 81dB 的前脉冲声音下，OVA 组小鼠对惊吓刺激声音的抑制率 $32.86 \pm 4.185\%$ 与 Veh 组小鼠的抑制率 $34.30 \pm 3.015\%$ 无明显统计学差异（ $p = 0.0962$ ）。

通过 Two-way RM ANOVA 方法分析比较了小鼠在有前脉冲刺激和无前脉

冲刺激时对惊吓刺激的抑制反应。由于前脉冲刺激因素（组内因素）和 OVA 因素（组间因素）对 PPI 无明显交互影响（ $F_{(3, 102)} = 2.360, P = 0.0759$ ）；OVA 因素对 PPI 无明显影响（ $F_{(1, 34)} = 0.1147, P = 0.7369$ ）；前脉冲刺激因素对 PPI 具有明显交互影响（ $F_{(3, 102)} = 46.98, P < 0.0001$ ）；因此需要进行事件后分析，Sidak's *post-hoc* 分析得出 OVA 组小鼠在无前脉冲刺激声音（白噪音）下对惊吓刺激反应的抑制率为 $5.490 \pm 4.823\%$ ，相比较，这与 OVA 组小鼠在 73dB、77dB 和 81dB 下都明显表现出对惊吓刺激反应的抑制（ $p_{73dB} = 0.0003, p_{77dB} < 0.0001, p_{81dB} < 0.0001$ ）；Veh 组小鼠在无前脉冲刺激声音（白噪音）下对惊吓刺激的抑制率为 $-0.3527 \pm 4.616\%$ ，相比较，这与 Veh 组小鼠在 73dB、77dB、81dB 的前脉冲刺激声音下都表现出了明显的抑制反应（ $p_{73dB} < 0.0001, p_{77dB} < 0.0001, p_{81dB} < 0.0001$ ）。这表明，OVA 组小鼠和 Veh 组小鼠的感觉门控能力都是正常的。

情景性条件恐惧实验的检测阶段中，OVA 组小鼠在原来被电击箱内的僵直时间比率 $54.75 \pm 3.443\%$ 与 Veh 组小鼠的僵直时间比率 $50.98 \pm 3.682\%$ 没有明显统计学差异（ $p = 0.4606$ ）；声音线索性条件恐惧实验的检测阶段中，OVA 组小鼠在一新环境中听到线索声音时的僵直时间比率 $54.58 \pm 3.552\%$ 与 Veh 组小鼠的僵直时间比率 $60.53 \pm 2.937\%$ 无明显统计学差异（ $p = 0.2051$ ）。提示，OVA 组小鼠的恐惧记忆能力没有受到影响。

小结： 实验结果显示，BALB/c 少年小鼠过敏性鼻炎模型建立基本成功；短期隔离过敏原 AR 小鼠嗅觉能力未受到影响，自发活动量无明显异常，刻板样行为明显减少，部分抑郁样行为明显增加，社交记忆能力部分下降。但焦虑样情绪、做窝能力、惊吓反应抑制能力、场景记忆能力和线索记忆能力未见异常。

3. 讨论

为了进一步研究青少年时期患有过敏性鼻炎的个体是否会导致其行为和情绪异常以及可能的生物学机制。我们采用了 OVA 作为过敏原并辅以铝佐剂进行致敏少年期小鼠。我们的实验结果显示，以刚离乳后不久的 C57BL/6 小鼠进行 AR 造模的 OVA 组小鼠挠鼻子和打喷嚏行为明显增加；但是以刚离乳后不久的

C57BL/6 小鼠进行 AR 造模,我们发现 OVA 组小鼠的挠鼻子和打喷嚏行为与 Veh 组小鼠相比没有显著增加。进一步查阅文献发现,可能是因为 C57BL/6 少年期小鼠对于不同剂量的 OVA 过敏原会有不同程度的响应^[73]。本课题中前者使用 10 μ g OVA 进行致敏,而后者使用了 100 μ g OVA 进行致敏,推测 10 μ g 剂量的 OVA 过敏原更容易诱导少年期的 C57BL/6 小鼠产生过敏性鼻炎。而以刚离乳后不久的 BALB/c 小鼠进行 AR 造模,结果显示 OVA 组小鼠具有较高的挠鼻子和打喷嚏次数。BALB/c 小鼠使用与 Tonelli^[47]等人报道的成年 AR 小鼠模型造模时一致的 OVA 剂量(100 μ g)进行致敏,但是与使用相同剂量进行致敏的 C57BL/6 小鼠比较,似乎具有更高的响应。而成年的 BALB/c 小鼠对 OVA 抗原的反应性也比 C57BL/6 小鼠高^[38;39]。由于两种品系的少年小鼠对 OVA 抗原都产生了抗 OVA 的抗体,因此两种品系的少年小鼠对于 OVA 都会产生免疫反应。综合来说,两种品系的小鼠鼻炎模型基本是成功的。另外,由于儿童的 AR 患病率高于成年人,并且男孩的 AR 患病率高于女孩^[8;9]。所以,我们的实验选择了刚离乳(约 3 周龄)的雄性小鼠进行 AR 建模。而实验结果显示,以 OVA 为过敏原,少年期 BALB/c 小鼠比 C57BL/6 小鼠更容易诱导出 AR 小鼠模型。

行为学检测发现,持续暴露于过敏原期间的 AR 少年小鼠在总运动距离减少,但是总运动次数和时间并没有异常。因此,我们认为持续暴露于过敏原期间的 AR 小鼠运动迟缓。同时,我们也认为持续暴露于过敏原期间的 AR 小鼠进入中心区域的次数减少,但总运动次数无明显异常的情况可以说明其表现出了焦虑样行为。

而长期隔离过敏原的 AR 小鼠和服用过抗过敏药物 PA 的 AR 小鼠的自发活动量都没有表现出异常,也没有表现出焦虑样行为。长期隔离过敏原后再次暴露过敏原时,AR 小鼠也没有表现出自发活动量的异常和焦虑样行为。值得注意的是,服用过 PA 的 AR 小鼠虽然长期隔离过敏原后没有表现出焦虑样行为异常,但是再次暴露于过敏原时却出现了明显的焦虑样行为增加,推测与肾上腺皮质激素类药物全身治疗的副作用有关^[74],提示着以前用过全身性治疗过敏性鼻炎的患者可能在再次接触过敏原时会加剧其焦虑情绪。

另外,短期隔离过敏原后 AR 小鼠自发活动量没有异常,焦虑样行为也没有

异常,但有趣的是其刻板样转圈行为(Circling)却减少了。实验结果与食物过敏小鼠表现出过度的刻板样理毛(Grooming)行为不一致^[45]。一方面可能是因为理毛行为和转圈行为的发生可能存在微小差异,另一方面是食物过敏性小鼠是在激发后当天就进行的检测,此时AR小鼠的鼻痒症状而引发的挠鼻子行为与小鼠的面部理毛行为(whisker trimming and barbering)难以区分。最近一项研究表明高刻板样活动可以预测小鼠在强迫游泳中表现出较低的不动时间^[75]。因此,短期隔离过敏原后的AR小鼠在旷场中表现出较低的刻板样行为可能是抑郁样情绪导致的。

高架实验中,除了持续暴露于过敏原期间的AR小鼠表现出焦虑样行为外,短期隔离和长期隔离过敏原的AR小鼠都没表现出焦虑样行为异常。而这个焦虑样行为的表现与它们在旷场运动中的表现是一致的。由于同一批小鼠在同一设备中进行高架实验对结果是有明显影响的,因此我们没有对长期隔离过敏原后再次接触过敏原的鼻炎小鼠进行高架检测。推测,焦虑样情绪只是伴随着AR的早期症状而同时出现,AR不会引起长时期的焦虑情绪。

抑郁症是一种情绪紊乱的疾病,会导致长期的处于忧伤、无助绝望情绪中并且对事物失去兴趣^[60]。AR少年小鼠在暴露于过敏原期间和短期隔离过敏原后的TST中都表现出了较高的抑郁样行为;但是,我们没有发现在强迫游泳中AR小鼠与对照之间有显著差异;但AR少年小鼠在短期隔离过敏原后,在FST中不动时间的离散性程度比较高,组内个体差异性比较大。与FST类似,TST也是将小鼠置于一个无法回避的压力状态下,但是TST的压力强度比FST温和一些,不会因为浸泡于水中而导致体温下降^[76]。虽然FST和TST的检测原理是相似的,但是它们各自有不同的灵敏度和效能^[77],在其他人的研究中也发现治疗抑郁症的药物有些能有效减少抑郁症小鼠模型在TST的不动时间,但在FST中却没有改善^[78]。而敲除GABA_B受体的小鼠在FST中表现出明显的抗抑郁样行为,但是TST中则没有表现出抗抑郁样行为^[79]。对于少年时暴露在过敏原期间以及短期隔离过敏原后的AR小鼠在TST与FST不一致的结果,提示着AR可能只是导致轻微的抑郁症,或者说AR只是导致抑郁症的部分原因,也可能与GABA_B受

体有关。对于 AR 少年小鼠在长期隔离过敏原后和再次接触过敏原时，其在 TST 和 FST 中都没有表现出抑郁样行为，提示少年期 AR 可能不会导致长期的情绪紊乱^[80]，但全身性的糖皮质激素药物治疗反而可能导致产生焦虑样行为的副作用^[74]。当然，也有研究发现，成年啮齿类动物在被注射疫苗的铝佐剂 20 周后才会表现出焦虑样行为和记忆功能损伤^[81; 82]。这些结果提示我们对于过敏性鼻炎是否会造成长期的情绪行为影响可能还需要更为优化的疾病模型。

有关小鼠情绪性检测中，我们还进行了糖水偏好、新环境抑制进食、小鼠做窝能力的检测，但是短期隔离过敏原后 AR 小鼠在这些行为学检测中的表现都没有明显异常。其一，糖水经常在小鼠实验中作为一种奖赏刺激，这与脑内与多巴胺系统有关，当给小鼠提供糖水选择时，它会倾向于去饮用糖水而不是普通的水^[83]。我们的实验并没有发现短期隔离过敏原的 AR 小鼠对丧失了对糖水的偏好，并且与对照小鼠一样都倾向于饮用糖水。因此，可能短期隔离过敏原的 AR 小鼠的奖赏系统并没有受到显著损伤。其二，新环境抑制进食实验结果显示 AR 少年小鼠在短期和长期隔离过敏原后并没有显示出较高的焦虑和抑郁样行为。实验有可能是因为小鼠本身具有较高的潜伏期去取食，从而产生天花板效应^[84]，导致较多的 OVA 组和 Veh 组小鼠在所设定时间都还没去吃食物，不能更好反应小鼠的情绪状态。其三，小鼠的做窝能力可以反映其是否有抑郁样情绪。我们发现短期隔离过敏原的 AR 小鼠并没有表现出做窝能力明显下降。但有报道指出小鼠的做窝过程似乎更加能反映出小鼠的抑郁样情绪^[65; 85]，例如，亚慢性轻度社交挫败应激的抑郁症小鼠模型可以成功的做窝，但是做窝的潜伏期很长^[65]。

另外，由于很多精神疾病如精神分裂和狂躁型抑郁症中都发现有前脉冲抑制缺失的现象^[71; 72]。因此我们检测了 AR 少年小鼠在持续暴露于过敏原期间和短期隔离过敏原后的前脉冲抑制能力。但是，这两者都表现出正常的前脉冲抑制能力。结果提示持续暴露于过敏原期间和短期隔离过敏原后 AR 小鼠的下丘、脑桥被盖网状核、外侧被盖核、黑质体、脑桥尾侧网状核这些参与前脉冲惊吓反应抑制的中脑系统可能没有受到损伤^[86]。

由于情绪紊乱一般也会伴随着记忆功能的紊乱^[87]。因此我们检测了 AR 小鼠

的社交记忆能力和条件恐惧记忆能力。社会交互行为是多种疾病模型的参数之一，如自闭症、抑郁症、精神分裂症等小鼠模型^[88;89]。我们的检测发现短期隔离过敏原后的 AR 小鼠的社交能力和社交记忆的获得都没有受损，但是其社交记忆的维持和社交新奇性（记忆的提取）都明显下降。小鼠的社交识别能力需要编码嗅觉信息。其中挥发性气味信息主要由主嗅觉系统（main olfactory system, MOS）编码，而非挥发性气味则由副嗅觉系统（accessory olfactory system, AOS）编码^[90]。小鼠的这两个系统都会参与社会识别，且需要经过两个阶段的蛋白合成^[91]。由于 AR 小鼠的社交能力没有受损，而在食物挖掘实验中 AR 小鼠能快速找到被埋藏的食物，说明 AR 小鼠对挥发性气味的嗅觉能力没有出现异常^[61]，提示该 AR 小鼠主嗅觉系统工作正常。有研究发现，大鼠在社交短期记忆的提取阶段会有大量催产素释放到外侧中隔核（lateral septum, LS），但是在获取和维持阶段并不会大量释放^[92]。在社交的长期记忆中，内侧杏仁核、视前区内侧核都被激活^[91]，且内侧杏仁核催产素的释放对于小鼠社交识别能力来说是必须的^[93]。因此 AR 小鼠很有可能是由于 AOS 系统中的 LS 脑区出现了紊乱。另外，除了嗅觉系统之外，视觉和听觉在社交记忆中也起到非常重要的作用^[94]。这需要进一步的深入研究。我们的实验发现短期隔离过敏原后的 AR 小鼠在情景性条件恐惧记忆实验和线索性条件恐惧记忆实验中都表现正常，推测其背侧海马区和外侧杏仁核脑区没有受到明显损伤^[67]。而长期隔离过敏原后的 AR 小鼠在被动回避实验中也表现正常，推测其背侧海马脑区也可能没有受损。

综上，刚离乳的 BALB/c 小鼠比 C57BL/6 年小鼠对 OVA 具有更高的响应。少年期 AR 小鼠会导致其早期的焦虑水平增加，但不会有长期影响，并且不会导致其产生严重的抑郁样情绪。因此，少年期 AR 病患后期抑郁样情绪紊乱几率增加的原因中，AR 可能只是其中一小部分原因。当然，不能排除的是，有可能小鼠并不是最合适的 AR 模型动物，也有可能我们的建模流程并不能完全模拟出人类 AR 的所有症状。

4. 版图与说明

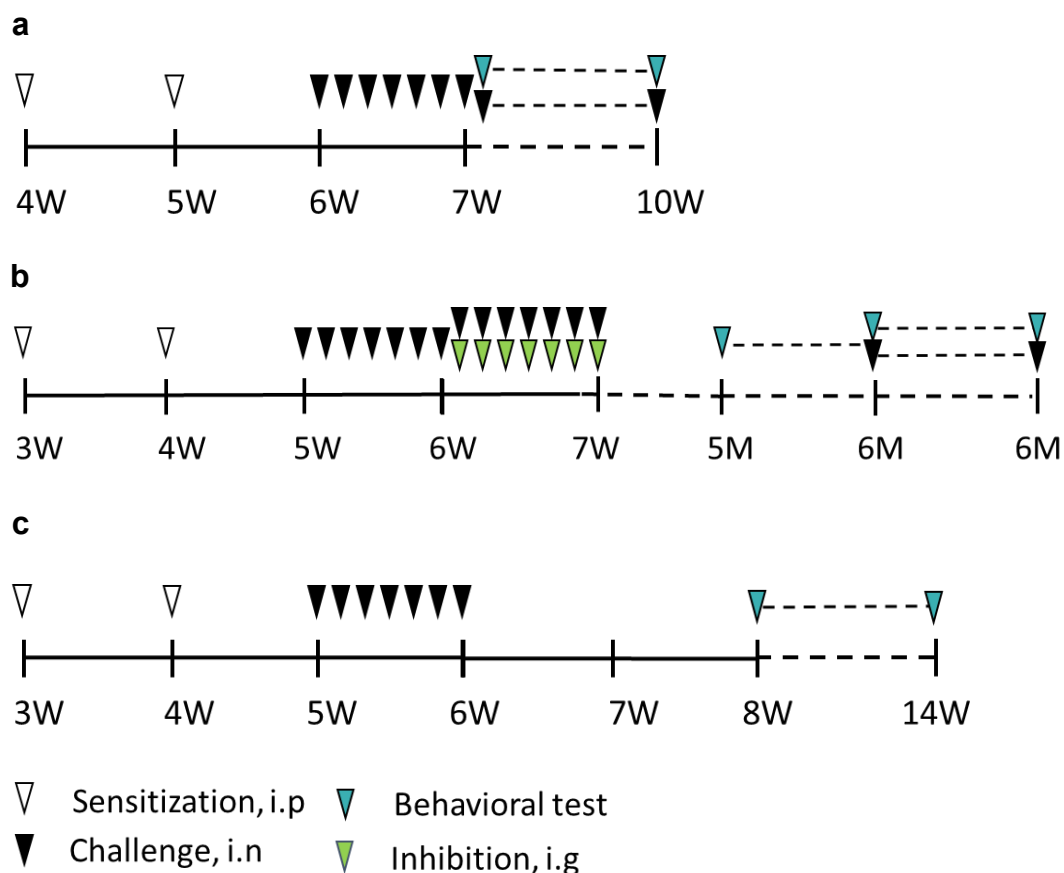


Fig.1.1 Experiment schedule. (a) Experiment schedule of allergic rhinitis model and behavioral tests of young mice during allergen exposure, **Experiment 1**. (b) Experiment schedule of allergic rhinitis model and behavioral tests of middle age mice, **Experiment 2**. (c) Experiment schedule of allergic rhinitis model and behavioral tests of adult mice after allergen exposure, **Experiment 3**. W = weeks old, M = month old, i.p=intraperitoneal, i.n=intranasal, i.g=intragastric.

图 1.1 实验流程。(a) 实验一流程，建立少年小鼠过敏性鼻炎模型以及检测其持续暴露于过敏原期间的行为。(b) 实验二流程，建立少年小鼠过敏性鼻炎模型以及检测其长期隔离过敏原后的行为。(c) 实验三流程，建立少年小鼠过敏性鼻炎模型以及检测其短期隔离过敏原后的行为。W=周龄，M=月龄，i.p=腹腔注射，i.n=鼻腔滴注，i.g=灌胃。

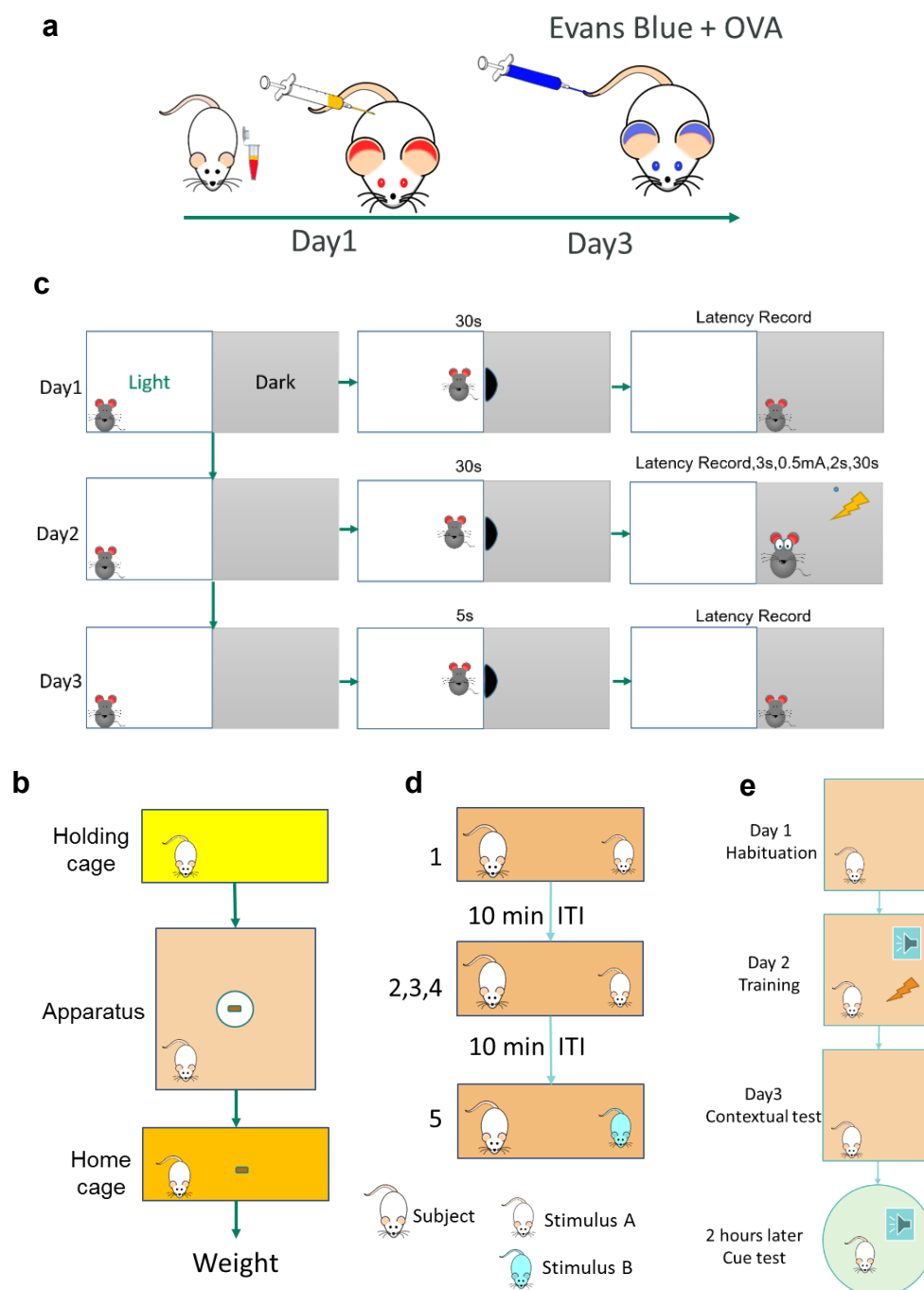


Fig.1.2 Experiment procedure. (a) Passive cutaneous anaphylaxis test procedure. (b) Novelty-suppressed Feeding test procedure. (c) Passive avoidance test procedure. (d) 5-trial social memory test. (e) Fear conditioning test procedure.

图 1.2 实验流程。(a) 大鼠被动皮肤免疫实验。(b) 新环境抑制进食实验。(c) 被动回避实验。(d) 社交记忆实验。(e) 条件恐惧实验。

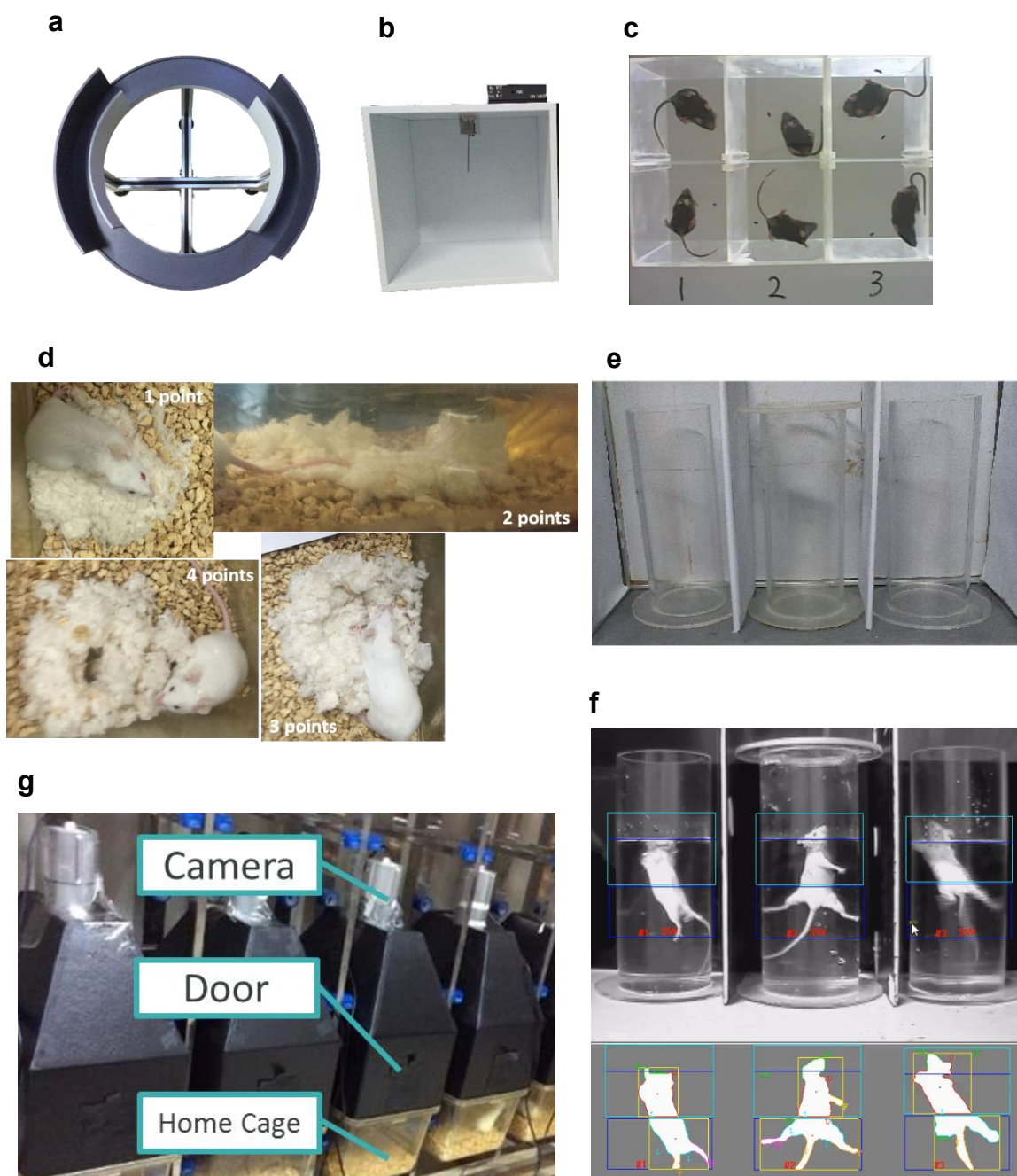


Fig.1.3 Behavioral instruments. (a) Elevated zero maze. (b) Tail suspension box. (c) Apparatus for recording mice's nose scratching and sneezing. (d) Nest building scoring. (e) Forced swimming tanks with white background. (f) Forced swimming tanks with black background. (g) Home cage video recording box.

图 1.3 行为学设备。(a) 高架 O 迷宫。(b) 悬尾实验。(c) 挠鼻与打喷嚏监控设备 (d) 做窝得分。(e) 白色背景强迫游泳。(f) 黑色背景强迫游泳。

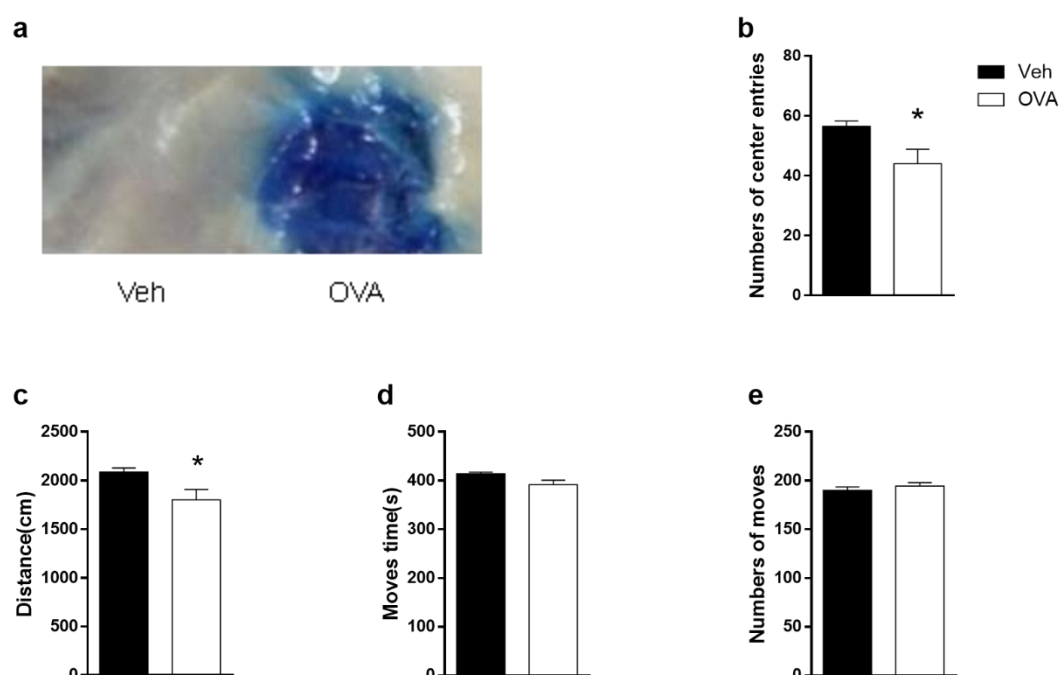


Fig.1.4 PCA and open field tests of Experiment 1. (a) Selected result of passive cutaneous anaphylaxis (PCA) test. Open field test in 10min (b) Numbers of center entries.(c) Distances.(d) Total move time. (e) Numbers of move. The test was implemented during allergen exposure. Student t test was conducted and data are presented as means \pm SEM. N=8~10, *p<0.05.

图 1.4 实验一，PCA 和旷场实验。 (a) 小鼠血清中抗 OVA 抗体表达情况。旷场实验中 (b) 进入中央区域的次数 (c) 运动距离 (d) 运动时间 (e) 运动次数。采用 Student t 检验进行数据分析，以“平均值 \pm 标准误”展示数据。N=8~10, *p<0.05.

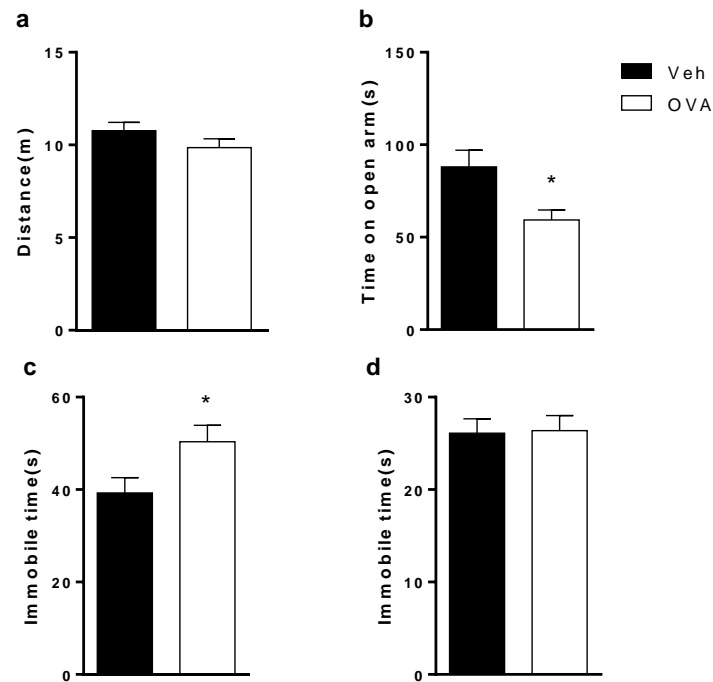


Fig.1.5 Forced swimming, tail suspension and elevated plus maze tests of Experiment 1. (a) Total distance in the elevated plus maze. (b) Time spent in open arms in the elevated plus maze in 5min. (c) Immobile time in the tail suspension test in 5min. (d) Immobile time in the forced swimming test in 5min. Student t test was conducted and data are presented as means \pm SEM. N=8~10, * $p < 0.05$

图 1.5 实验一，强迫游泳、悬尾实验和高架十字迷宫。高架十字迷宫中（a）总运动距离（b）进入开臂时间。（c）悬尾实验中不动时间。（d）强迫游泳中的不动时间。采用 Student t 检验进行数据分析，数据以“平均值 \pm 标准误”展示。N=8~10, * $p < 0.05$

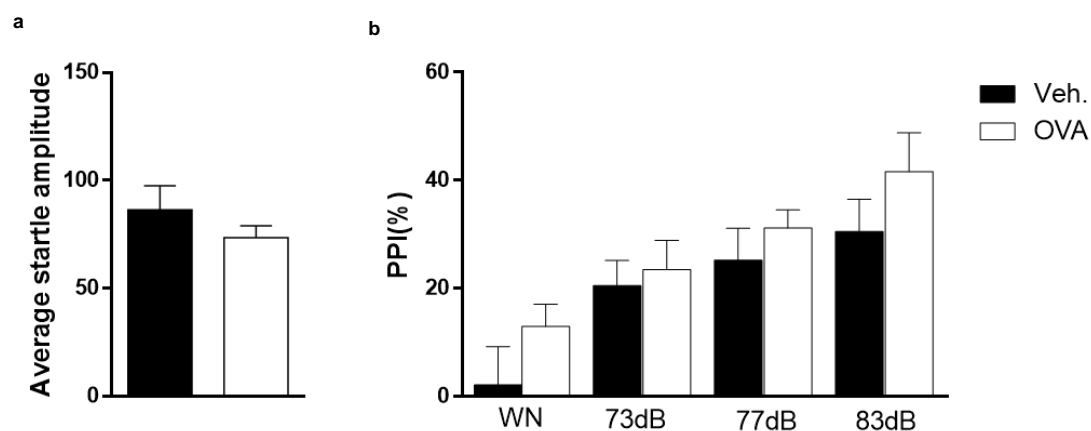


Fig.1.6 Pre-pulse inhibition test of Experiment 1. (a) Mice average responds of the first 6 startle stimulus. (b) The index of pre-pulse inhibition of white noise, 73dB, 77dB, 81dB acoustic responds. Student t test Two-way RM ANOVA and Sidak's multiple comparisons tests were conducted and data are presented as means \pm SEM. N=8~10.

图 1.6 实验一，前脉冲抑制实验。（a）小鼠对惊吓声音刺激的平均反应。（b）小鼠在 73dB， 77dB， 81dB 前脉冲声音下对惊险声音刺激的抑制率。采用 Student t 检验和 Two-way RM ANOVA 以及 Sidak's 事件后检验进行数据分析，以“平均值 \pm 标准误”展示数据。N=8~10。

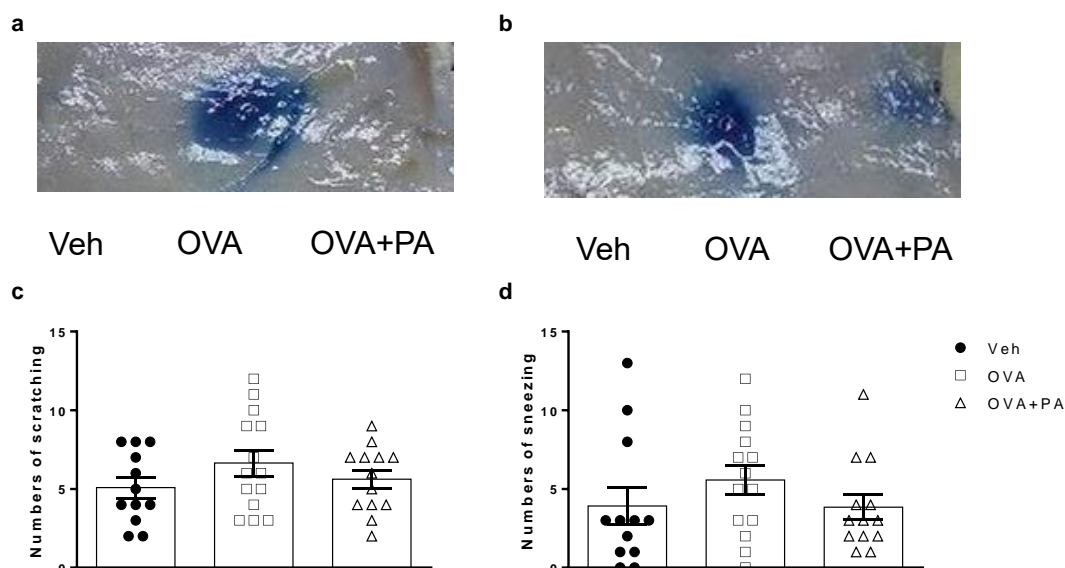


Fig.1.7 PCA test, nose scratching and sneezing after the nasals challenge of Experiment 2. (a) PCA result after the nasals challenge before behavioral test. (b) PCA result after behavioral test. (c) Numbers of nose scratching after the last challenge of nasals. (d) Numbers of sneezing after the last challenge of nasals. One-way ANOVA was conducted and data are presented as means \pm SEM. N=12~14.

图 1.7 实验二，PCA 实验，小鼠挠鼻子和打喷嚏行为。 (a) 末次鼻腔激发后小鼠血清中抗 OVA 抗体表达情况。(b) 行为学检测后小鼠血清中抗 OVA 抗体表达情况。(c) 末次激发后小鼠挠鼻子行为。(d) 末次激发后小鼠打喷嚏行为。采用 One-way ANOVA 统计数据，以“平均值 \pm 标准误”展示数据。N=12~14。

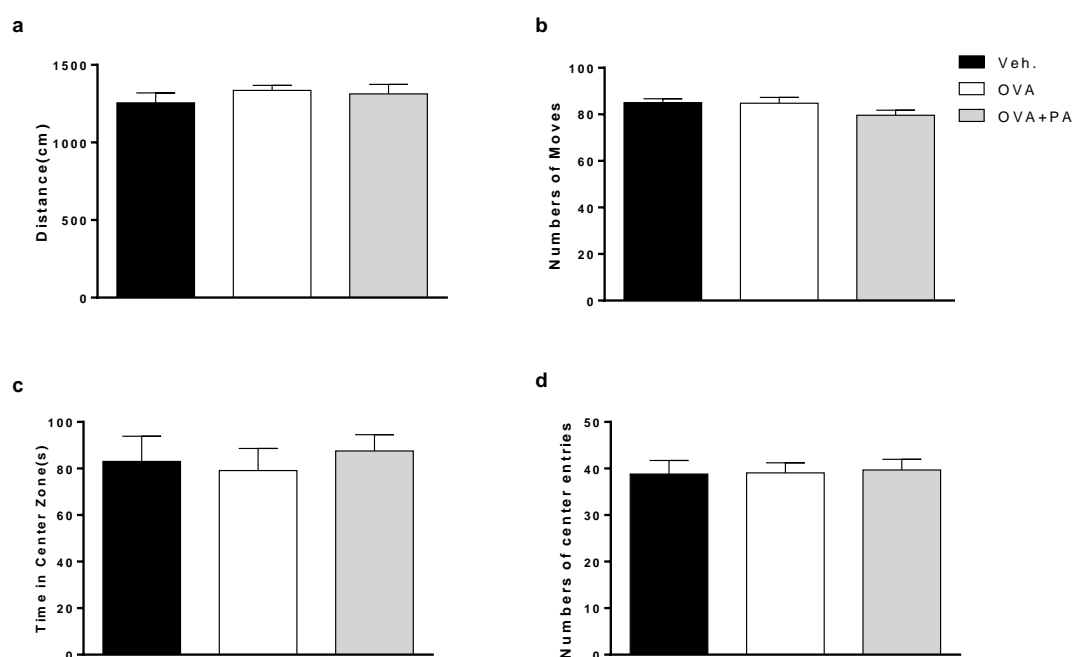


Fig.1.8 Open field test after allergen isolation of Experiment 2. (a) Total distances. (b) Total numbers of moves. (c) Time spent in the center zones. (d) Numbers of center entries. One-way ANOVA was conducted and data are presented as means \pm SEM. N=11~12.

图 1.8 实验二，旷场实验，长期隔离过敏原后。旷场实验中小鼠的（a）总运动距离，（b）总运动次数，（c）进入中心区域的时间，（d）进入中心区域的次数。采用 One-way ANOVA 统计数据，以“平均值 \pm 标准误”展示数据。N=11~12。

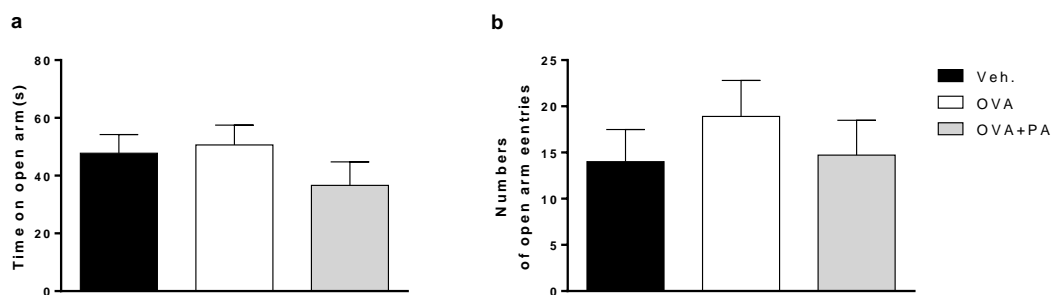


Fig.1.9 Elevated zero maze test after allergen isolation of Experiment 2. (a) Time spent on open arms. (b) Numbers of entries in the open arms. One-way ANOVA was conducted and data are presented as means \pm SEM. N=11~12.

图 1.9 实验二，高架 O 迷宫，长期隔离过敏原后。小鼠在高架 O 迷宫中 (a) 呆在开臂的时间，(b) 进入开臂的次数。采用 One-way ANOVA 统计数据，以“平均值 \pm 标准误”展示数据。N=11~12。

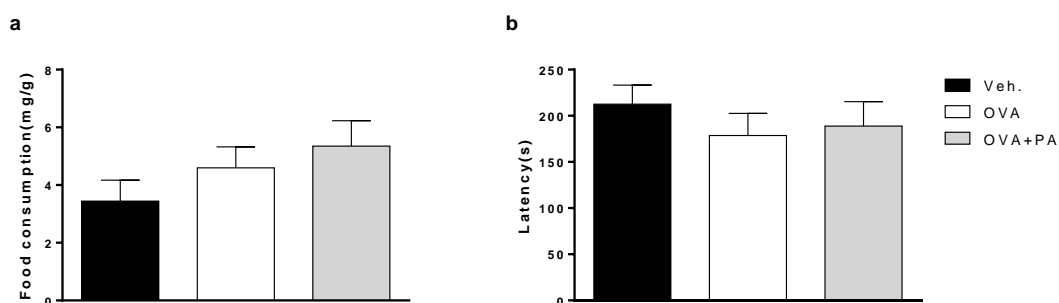


Fig.1.10 Novelty-suppressed feeding after allergen isolation of Experiment 2. (a) The food consumption index. (b) Latency of the first bite to the food pellet. Log-rank test was conducted and data are presented as means \pm SEM. N=11~12.

图 1.10 实验二，新环境抑制进食，长期隔离过敏原后。(a) 小鼠摄食指数。(b) 小鼠摄食潜伏期。采用 Log-rank 统计数据，以“平均值 \pm 标准误”展示数据。N=11~12。

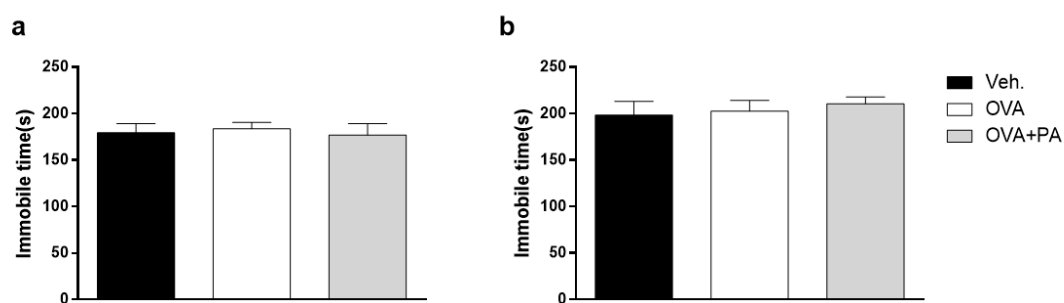


Fig.1.11 Forced swimming and tail suspension tests after allergen isolation of Experiment 2. (a) Immobile time in the forced swimming test. (b) Immobile time in the tail suspension test. One-way ANOVA was conducted and data are presented as means \pm SEM. N=10~12.

图 1.11 实验二，强迫游泳和悬尾实验，长期隔离过敏原后。(a) 小鼠在强迫游泳实验中的不动时间。(b) 小鼠在悬尾实验中的不动时间。采用 One-way ANOVA 统计数据，以“平均值 \pm 标准误”展示数据。N=10~12。

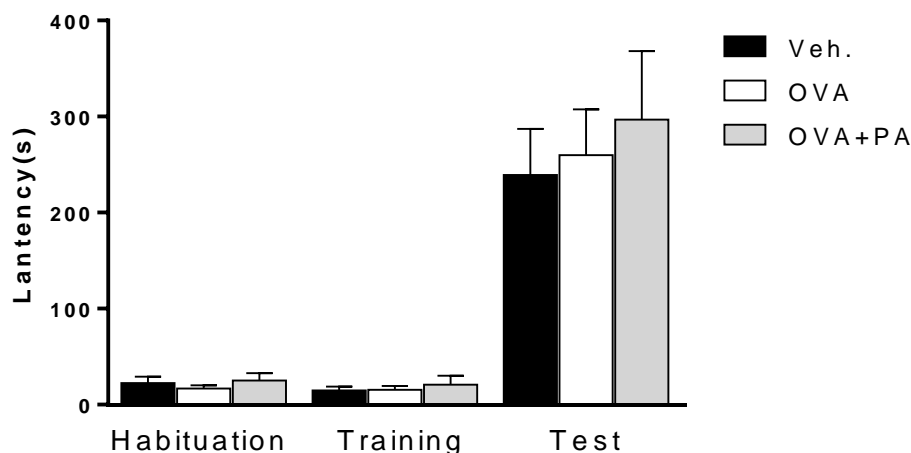


Fig.1.12 One-trial passive avoidance test after allergen isolation of Experiment 2.

The latency of mice entered the dark chamber in habituation, training and test sessions. Log-rank tests were conducted and data are presented as means \pm SEM. N=11~12.

图 1.12 实验二，被动回避实验，长期隔离过敏原后。小鼠在适应、训练和检测阶段进入暗箱的潜伏期。采用 Log-rank 统计数据，以“平均值 \pm 标准误”展示数据。N=11~12。

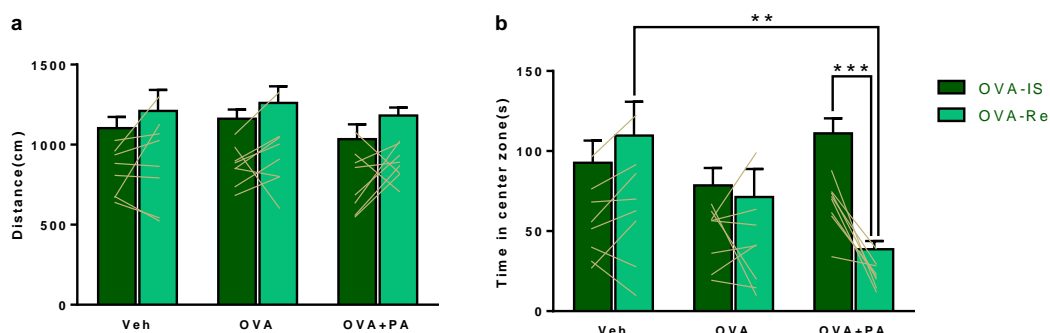


Fig.1.13 Open field test in during allergen re-exposure of Experiment 2. (a) Total distance. (b) Time spent in the center zone. Repeated two-way ANOVA, Sidak's multiple comparisons tests were conducted and data are presented as means \pm SEM. OVA-IS, mice of OVA isolation. OVA-Re group, mice of OVA re-exposure. N=8

图 1.13 实验二，旷场实验，再次暴露于过敏原期间。小鼠在旷场实验中（a）总运动距离，（b）进入中心区域的时间。采用 Two-way RM ANOVA 以及 Sidak's 事件后检验进行数据分析，以“平均值 \pm 标准误”展示数据。OVA-IS，隔离 OVA 组。OVA-Re，再次暴露于 OVA。N=8。

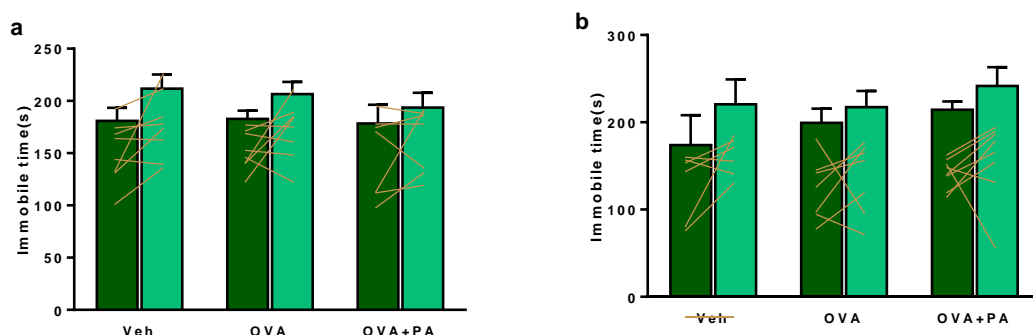


Fig.1.14 Forced swimming and tail suspension tests during allergen re-exposure of Experiment 2. (a) Immobile time in the forced swimming test. (b) Immobile time in the tail suspension test. Two-way RM ANOVA and Sidak's multiple comparisons tests were conducted and data are presented as means \pm SEM. N=6~8.

图 1.14 实验二，强迫游泳和悬尾实验，再次暴露于过敏原期间。（a）小鼠在强迫游泳实验中的不动时间。（b）小鼠在悬尾实验中的不动时间。采用 Two-way RM ANOVA 以及 Sidak's 事件后检验进行数据分析，以“平均值 \pm 标准误”展示数据。N=6~8。

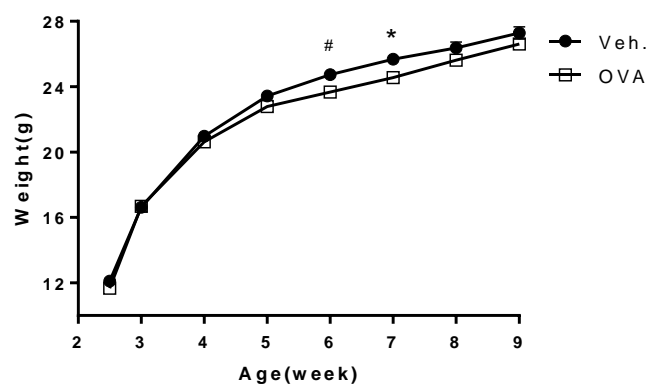


Fig.1.15 Mice body weight of Experiment 3. Mice body weight from 2.5 weeks old to 9 weeks old. Two-way RM ANOVA and Sidak's multiple comparisons tests were conducted and data are presented as means \pm SEM. [#] $p=0.0501$, $^*p<0.05$. N=18.

图 1.15 实验三。小鼠体重。小鼠从 2.5 周龄到 9 周龄的体重。采用 Two-way RM ANOVA 以及 Sidak's 事件后检验进行数据分析,以“平均值 \pm 标准误”展示数据。
[#] $p=0.0501$, $^*p<0.05$. N=18.

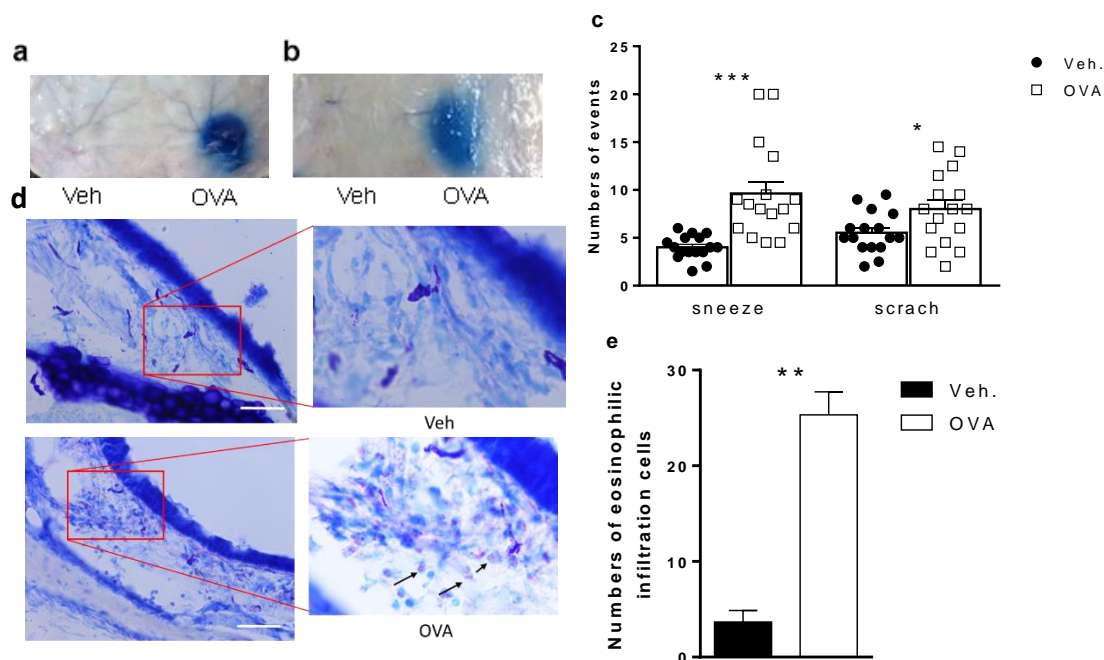


Fig.1.16 PCA test, Giemsa staining, nose scratching and sneezing after the nasals challenge of Experiment 3. (a) PCA results, (d) eosinophils infiltration, and (e) numbers of eosinophilic infiltration cells after 12 hours of the last nasals challenge. (b) PCA results after behavioral tests. (c) Numbers of nose sneezing and scratching after the last challenge of nasals at the age of 6-week-old. Student t test was conducted and data are presented as means \pm SEM N=3, 16. *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$, Bar = 50 μ m.

图 1.16 实验三，PCA 实验、吉姆萨染色和小鼠挠鼻子与打喷嚏行为。小鼠末次激发后（a）血清中表达抗 OVA 抗体，（d）（e）鼻黏膜固有层中嗜酸性粒细胞，（c）挠鼻子和打喷嚏次数。（b）行为学结束后小鼠血清中抗 OVA 抗体表达。采用 Student t 检验进行数据分析，以“平均值 \pm 标准误”展示数据。N=3, 16。*** $p < 0.001$, * $p < 0.05$, Bar = 50 μ m。

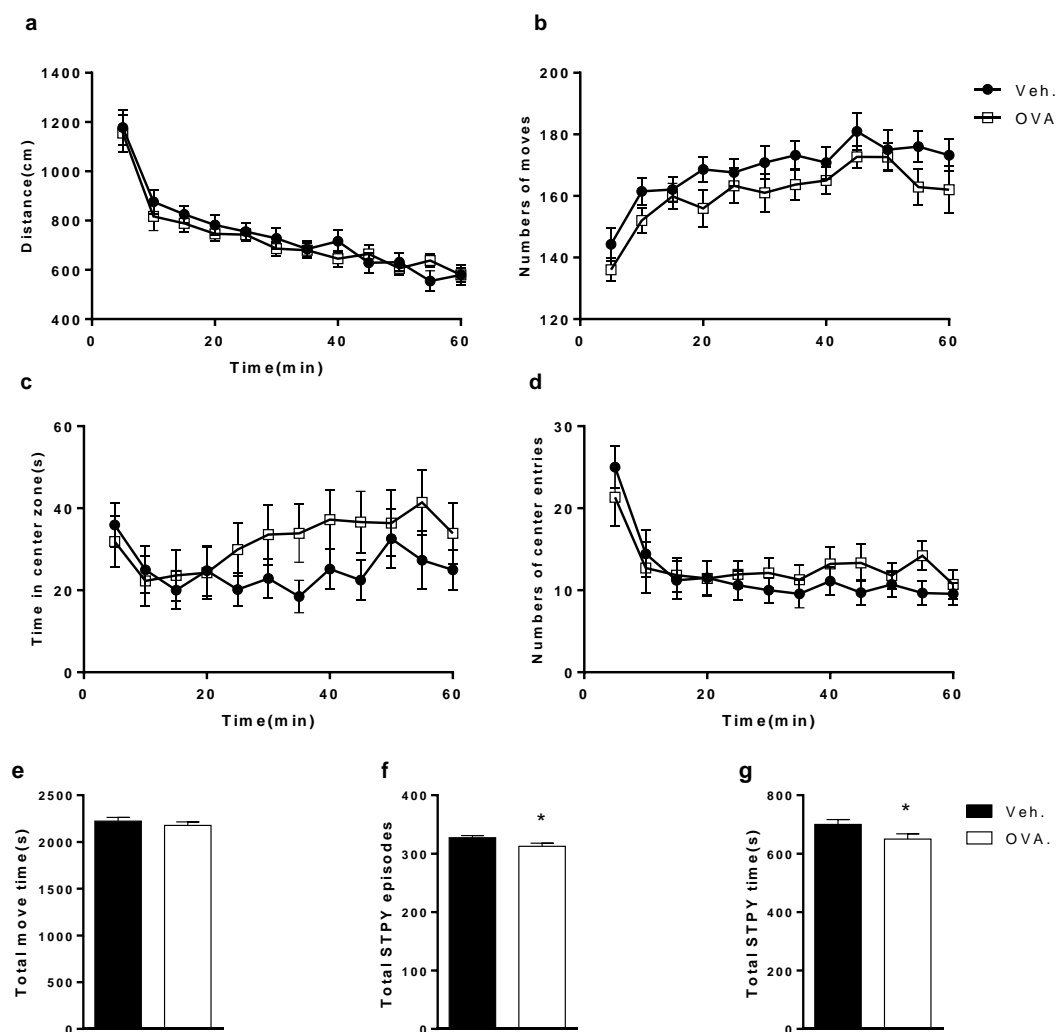


Fig.1.17 Open field test of Experiment 3. (a) Distances of every 5min in total 60min. (b) Moves of every 5min in total 60min. (c) Time spent in the center zones of every 5min in total 60min. (d) Numbers of center entries of every 5min in total 60min. (e) Total moves in 60min. (f) Total episodes of stereotypic behavior in 60min. (g) Total time of stereotypic behavior in 60min. Student t test, Two-way RM ANOVA, Sidak's multiple comparisons tests were conducted and data are presented as means \pm SEM. N=18. * $p < 0.05$.

图 1.17 实验三，旷场实验。小鼠在旷场实验中（a）总运动距离，（b）总运动次数，进入中心区域的（c）时间和（d）（e）次数，刻板样行为的（f）次数和（g）时间。采用 Student t 和 Two-way RM ANOVA 检验进行数据分析，以“平均值 \pm 标准误”展示数据。N=18。* $p < 0.05$ 。

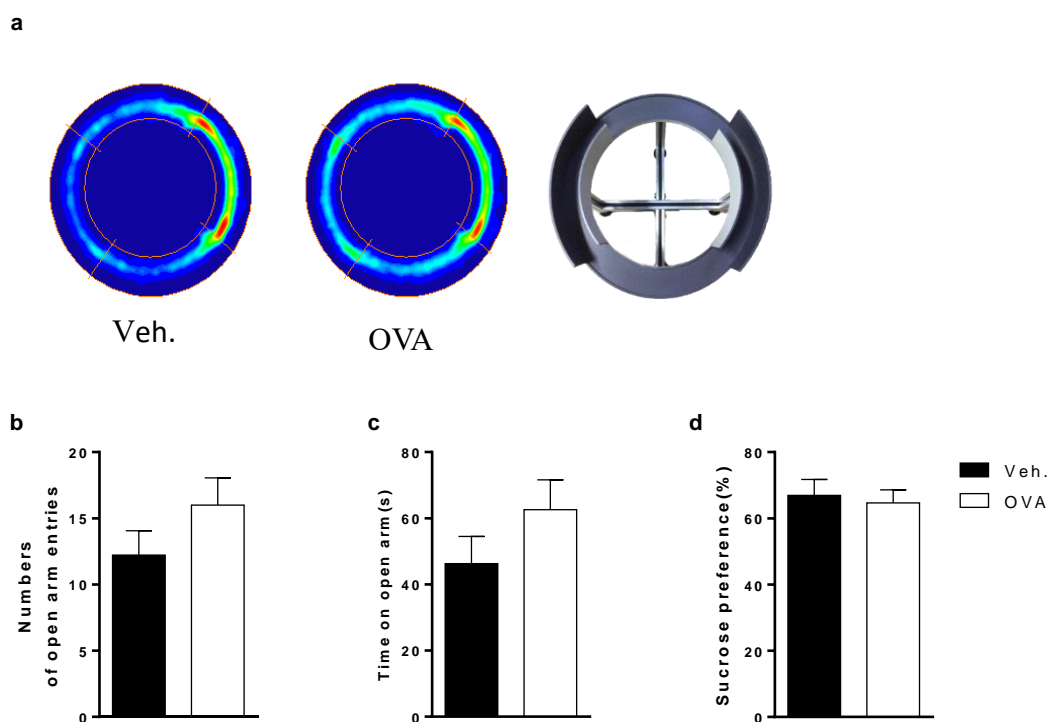


Fig.1.18 Elevated zero maze and sucrose preference tests of Experiment 3. (a) Group occupancy plot of the animals' center position for EZM test. (b) Numbers of entries in the open arms. (c) Time spent on open arms. (d) The index of sucrose preference. Student t test was conducted and data are presented as means \pm SEM. N=17~18.

图 1.18 实验三，高架 O 迷宫和糖水偏好实验。小鼠在高架 O 迷宫中 (a) 运动的热点图，(b) 进入开臂的次数和 (c) 时间。(d) 糖水偏好实验中小鼠对糖水的偏好比率。采用 Student t 检验进行数据分析，以“平均值 \pm 标准误”展示数据。N=17~18。

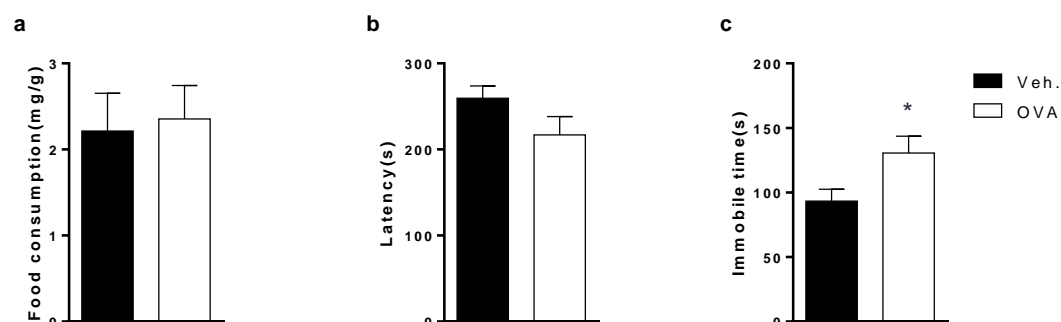


Fig.1.19 Tail suspension and novelty-suppressed feeding tests of Experiment 3. (a) The food consumption index. (b) Latency to bite the food pellet at the first time. (c) Immobile time in the tail suspension test. Student t test and Log-rank tests were conducted and data are presented as means \pm SEM. N=17~18. *p<0.05

图 1.19 实验三，悬尾实验和新环境抑制进食实验。小鼠在新环境抑制进食实验中的（a）食物消耗指数，（b）摄取到食物的潜伏期。（c）小鼠在悬尾实验中的不动时间。采用 Student t 和 Log-rank 检验进行数据分析，以“平均值 \pm 标准误”展示数据。N=17~18。*p<0.05。

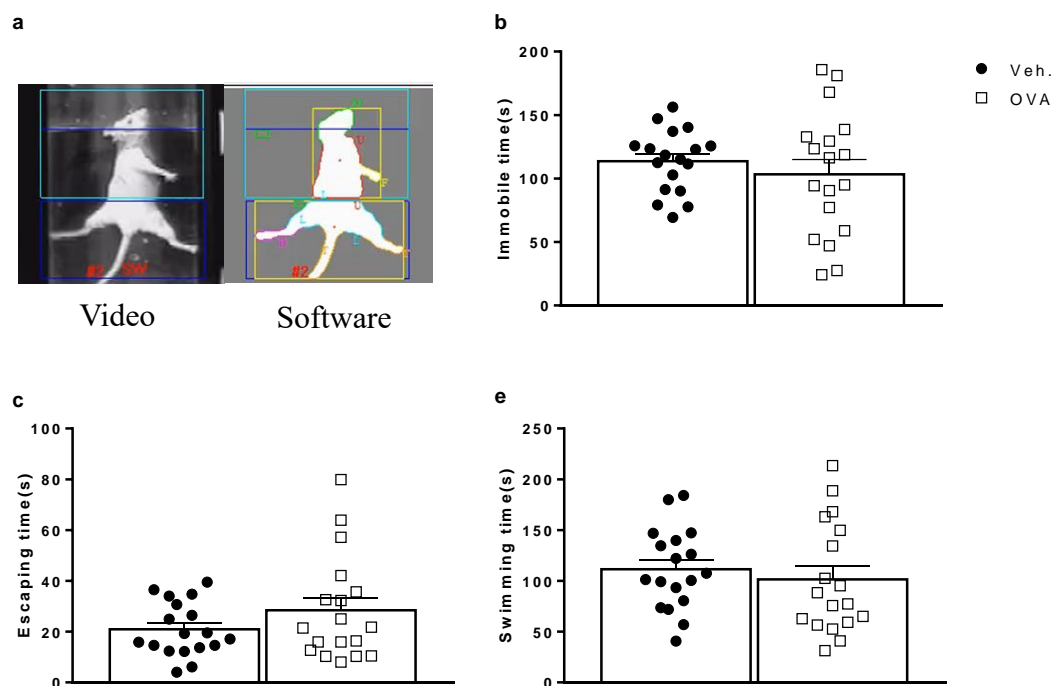


Fig.1.20 Forced swimming test of Experiment 3. (a) Mice behaviors recognition by software. (b) Immobile time, (c) time of escaping behavior, (d) time of swimming behavior of the mice. Student t test was conducted and data are presented as means \pm SEM. N=18.

图 1.20 实验三，强迫游泳实验。小鼠在强迫游泳试验中（a）被软件所识别的图例，（b）不动时间，（c）逃跑行为所用时间，（d）游泳所用时间。采用 Student t 检验进行数据分析，以“平均值 \pm 标准误”展示数据。N=18。

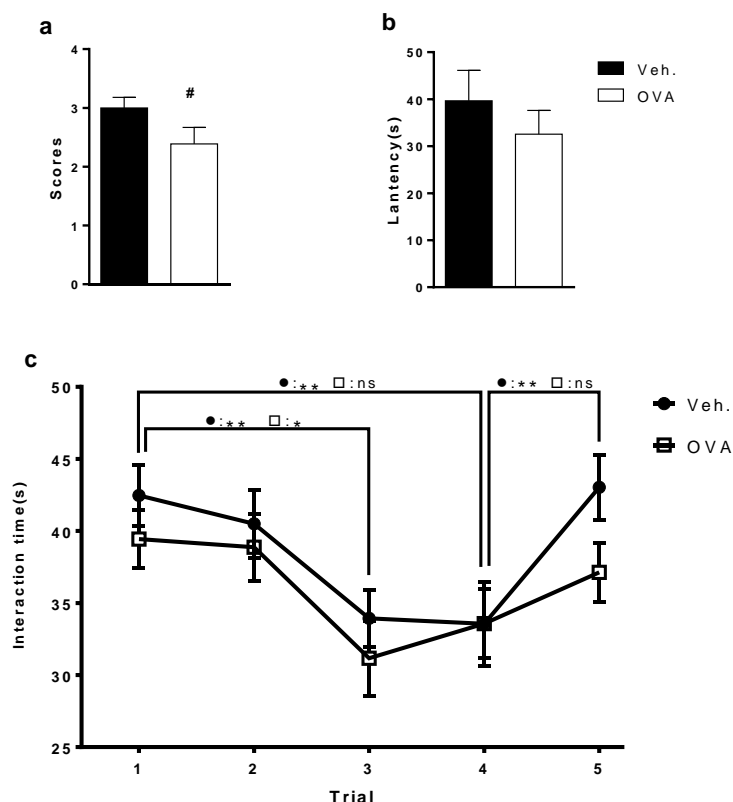


Fig.1.21 Social memory and nest building test of Experiment 3. (a) Average scores of nest building. (b) Latency to bite to the food pellet at the first time. (c) Time spent of social interaction from subjects mice to stimulus mice. Student t test, Two-way RM ANOVA and Sidak's multiple comparisons tests test were conducted and data are presented as means \pm SEM. N=15~18, # $p=0.0748$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, ns=no significant difference.

图 1.21 实验三，社交记忆、嗅探能力和做窝实验。 (a) 小鼠做窝的平局得分。 (b) 嗅探能力检测实验中，小鼠摄取到食物的潜伏期。 (c) 社交记忆实验中，实验鼠主动嗅探刺激鼠的时间。采用 Student t 和 Two-way RM ANOVA 检验进行数据分析，以“平均值 \pm 标准误”展示数据。N=15~18, # $p=0.0748$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, ns=没有明显统计学差异。

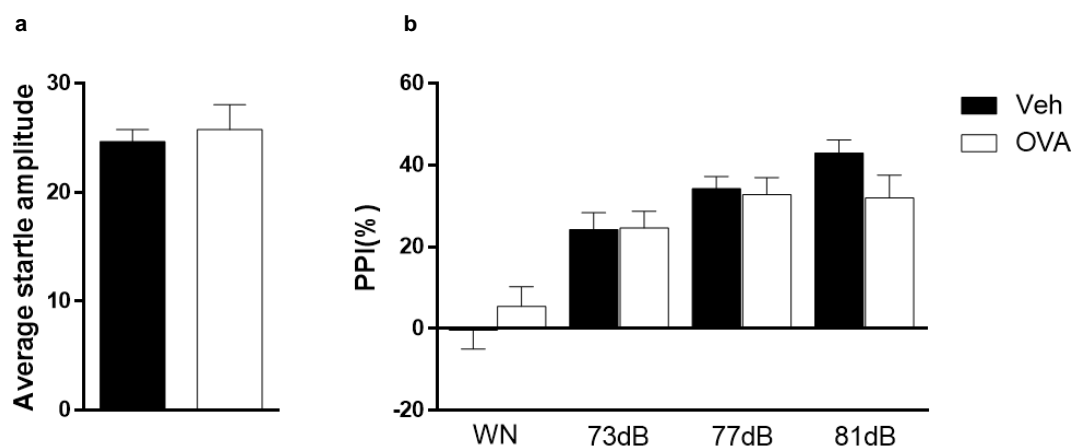


Fig.1.22 Pre-pulse inhibition test of Experiment 3. (a) Mice Average responds of the first 6 startle stimulus. (b) The index of pre-pulse inhibition of white noise, 73dB, 77dB, 81dB acoustic responds. Student t test, Two-way RM ANOVA and Sidak's post-hoc test were conducted and data are presented as means \pm SEM. N=18.

图 1.22 实验三，前脉冲抑制实验。（a）小鼠对惊吓声音刺激的平局反应强度。（b）小鼠在 73dB，77dB，81dB 前脉冲声音下对惊险声音刺激的抑制率。采用 Student t 和 Two-way RM ANOVA 以及 Sidak's 事件后检验进行数据分析，以“平均值 \pm 标准误”展示数据。N=18。

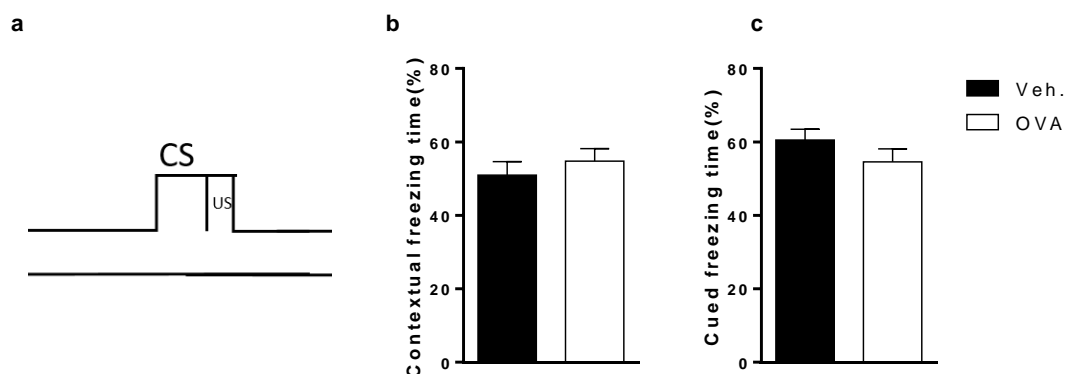


Fig.1.23 Fear conditioning test of Experiment 3. (a) Fear conditioning training procedure, CS, Audio stimulus (20s); US, foot shock (2s). (b) The percentage of freezing time in contextual memory test. (c) The percentage of freezing time in cued memory test. Student t test was conducted and data are presented as means \pm SEM. N=18.

图 1.23 实验三，条件恐惧实验。（a）训练阶段中给予小鼠电刺激与声音提示的配对方式，US，足底电刺激 2 秒，CS，声音提示 20s。检测阶段（b）小鼠在相同环境中的僵直时间，（c）在新环境中声音提示下的僵直时间。采用 Student t 检验进行数据分析，以“平均值 \pm 标准误”展示数据。N=18。

第二章 过敏性鼻炎小鼠模型行为异常的细胞和分子机制

摘要

过敏性疾病是由自身免疫系统对外界无危害物质的过度反应而造成的疾病，严重影响着人类的健康。其中过敏性鼻炎（allergic rhinitis, AR）作为发病率最高的过敏性疾病正受到越来越多的重视。并且 AR 与焦虑和抑郁情绪障碍具有相关性，而少年时期被诊断为 AR 但无精神疾病的患者与无精神疾病和无 AR 的人相比，AR 患者在成年后被诊断为抑郁症的几率要高。为了进一步探究 BALB/c AR 少年小鼠短期隔离过敏原后出现的部分抑郁样行为和部分社交记忆下降的分子机制。我们研究了 AR 小鼠脑内小胶质细胞的激活状态、神经细胞的激活状态和脑内分子水平的表达情况。

c-fos 免疫组化结果显示，过敏性鼻炎少年小鼠在末次激发 12 小时后，外侧中隔背侧区（LSd）和下丘脑室旁核区（PVN）域内的 c-fos 表达明显下降，而眼眶前额叶外侧和腹侧区、内侧杏仁核内的 c-fos 表达情况与对照小鼠没有明显统计学差异。然而，经过短期隔离过敏原，行为学检测完后，AR 小鼠的外侧中隔背侧区、眼眶前额叶外侧和腹侧区、内侧杏仁核内的 c-fos 表达情况与对照小鼠没有明显统计学差异，但前扣带回皮层的小胶质细胞处于激活状态。这似乎说明 AR 少年小鼠在短期隔离过敏原后出现的行为异常很可能是由于其早期脑内 LSd 和 PVN 脑区神经细胞异常抑制以及前扣带皮层小胶质细胞的活跃而导致 AR 小鼠短期隔离过敏原后部分抑郁样行为和轻微社交记忆能力下降。荧光定量 PCR 结果显示，短期隔离过敏原后 AR 小鼠皮层和纹状体中 BDNF、CRF、LTR-9，以及前额叶中 IL-4 和 NGF 的 mRNA 的表达量与对照小鼠没有明显统计学差异，也许存在其他异常的分子机制还需要进一步分析。当然，也有可能是在本实验条件下，以 BALB/c 少年小鼠为 AR 模型并不能完全模拟出人类 AR 的所有疾病症状。

关键词：过敏性鼻炎，LSd，PVN，BDNF，CRF，LTR-9，c-fos，microglia

前言

过敏性疾病是由自身免疫系统对一些花粉、动物皮毛等非传染性环境物质的过度敏感,进而产生的炎症反应^[1]。在所有过敏性疾病中,AR 的患病率是最普遍的^[5-7; 95],并且 AR 与焦虑和抑郁情绪障碍具有相关性^[15-18]。科研人员已经发现炎症与情绪障碍之间可以相互影响,例如外周炎症信号或分子可能通过“体液途径”、“神经途径”、“细胞途径”的方式进入中枢系统,进而引发脑内炎症而产生抑郁样行为^[27-29]。社会应激可以引起抑郁和焦虑样情绪障碍的同时激发机体的免疫系统,进而产生炎症反应^[30; 31]。但是关于过敏性鼻炎与抑郁症之间的因果关系及其机制并不明朗。

研究发现过敏性鼻炎的敏感型个体在暴露过敏原 30min 内会产生早期反应,而暴露过敏原 6~12 小时后则会产生晚期反应^[1]。早期反应是由巨噬细胞脱颗粒产生炎症介质如蛋白酶、组胺和白介素,进而影响血管通透性和黏液的产生^[1]。趋化因子和炎症细胞的在鼻粘膜的募集引起了晚期反应,导致嗜酸性粒细胞浸润和 Th2 型淋巴细胞产生如 IL-4 等细胞因子^[1]。但是并不清楚这些炎症反应是否会对大脑造成长期影响,以及会以什么方式造成影响。

不仅如此,在 AR 患者中,神经营养因子 BDNF 和 NGF 分别在鼻粘膜细胞和鼻腔灌洗液中高表达,并且其受体在外周血液中也高表达^[96]。另外,BDNF 单核苷酸的突变会增加 AR 患者疾病程度加重的风险^[97]。而抑郁症病患中不同脑区 BDNF 的表达情况不一样,海马和前额叶表达下降,伏隔核和基底外侧杏仁核表达上升^[98; 99]。另外,在抑郁症病患的血液中成熟的 BDNF (而不是其前体)的表达量下降了^[100],突变的 BDNF (Val66Met) 的表达量却升高^[100]。似乎 BDNF 以某种方式联系着 AR 与抑郁症,但是没有人知道它们会以何种方式建立何种联系。

再者,AR 患者的鼻腔上皮细胞中 LTR-9 的表达受到抑制,而铎受体 (Toll-like receptor, TLR) 作为主要的模式识别受体用于识别自身和外来蛋白的作用,它的激活可以促进一系列的炎症反应,其中 LTR-9 的表达可以抑制 Th2 型细胞因子的表达^[101; 102]。而尸检发现,因抑郁症而自杀的患者前额叶等皮层中 TLR 表达量升高^[103]。由于外周炎症信号或分子可以进入中枢系统^[27-29],推测大脑中的

LTR 可能会将这些外周炎症因子作为外来蛋白来识别而大量表达,从而促进脑内的炎症反应。

另外,下丘脑-垂体-肾上腺轴被认为是中枢神经系统调控外周炎症的途径之一,并且应激状态也会促使促肾上腺皮质激素释放因子的表达和释放^[104]。动物实验发现,促肾上腺皮质激素释放因子(Corticotropin-releasing factor, CRF)的 mRNA 水平在成年 AR 啮齿类动物的前额叶皮层中高表达,同时伴随着焦虑样行为^[47]。但是,不清楚的是少年期致敏的小鼠短期隔离过敏原后是否也同样高表达 CRF。

脑区活动的研究发现,哮喘患者暴露在过敏原中而引起气道阻塞与前扣带回的活动相关联^[105]。前扣带回皮层功能紊乱被认为是情绪障碍的原因之一^[106]。因抑郁症而自杀的病患中前扣带回皮层中的促炎症细胞因子增加、小胶质细胞被激活、单核细胞被募集^[106]。但是,不清楚的是 AR 少年小鼠的前扣带回皮质(ACC)的小胶质细胞是否也被激活。在小鼠中发现,哮喘和食物过敏小鼠模型在 OVA 激发 90 分钟后下丘脑室旁核(PVN)和杏仁核(Amygdala)被激活^[107],但是另外的实验发现食物过敏性小鼠模型被乳清蛋白激发 3 天后,其前额叶(PFC)激活, PVN 则被抑制^[45]。结果似乎存在矛盾之处,然而有关 AR 少年小鼠的 PFC、PVN、杏仁核的神经细胞活动状态目前尚无相关报道。

研究发现 PVN 神经元被认为调控着应激、代谢、生长、繁殖、免疫以及其他自主神经系统功能^[108]。PVN 神经元释放催产素,即是作为身体外周的激素,又是作为的中枢神经系统的调质。当个体接受正向社交刺激时(如性奖赏刺激^[109]),催产素就会释放,并促使个体克服先天的社交回避^[110]。催产素的释放不足可能是导致社交缺陷的原因^[111]。相反的是,社会应激诱导的抑郁症模型鼠中, PVN 的血管加压素的释放增加^[112],并且 PVN 处的 c-fos 阳性细胞数量增加^[113]。另外,外侧中隔核(LS)在调控情绪、动机和社交行为中具有关键作用^[114; 115]。这可能是因为 LS 与其它脑区有广泛的连接。例如,LS 连接了与社交信息编码中起重要作用的终纹床核和内侧杏仁核,还连接着与奖赏和动机有关的腹侧被盖区和伏隔核^[114]。同时,在动物社交记忆的提取阶段会大量释放催产素到 LS 脑区

[92], 给予奖赏刺激 6 小时后, LS 的 c-fos 阳性细胞数量增加^[116]。而抗抑郁药可以激活 LS 神经细胞, 并且习得性无助诱导的抑郁症模型鼠中, LS 神经细胞则被抑制^[114; 117; 118], 损毁 LS 会则增加在动物在 TST 和 FST 中的不动时间^[119; 120]。那么, 是否因为 LS 神经元的活动异常而导致 AR 少年小鼠在短期隔离过敏原后表现出部分抑郁样行为和部分社交记忆下降, 则需要进一步检测。

本实验以 BALB/c 少年期暴露于过敏原的 AR 小鼠模型为研究对象, 利用荧光定量 PCR 技术检测了其脑内 BDNF、CRF、LTP-9 基因的表达水平; 利用免疫组织化学手段检测了 c-fos 蛋白的表达量来研究 AR 小鼠前额叶、外侧中隔背侧区、下丘脑室旁核、内侧杏仁核神经细胞的激活状态; 利用免疫组织化学手段还检测了 Iba-1 标记的小胶质细胞, 以观察小鼠扣带回皮质中小胶质细胞的形态结构。

1. 材料与方法

1.1. 实验动物及分组

将 3 周龄的雄性 BALB/c 小鼠按体重随机分成 2 组。对照 Veh 组 (21 只), 过敏性鼻炎 OVA 组 (21 只)。小鼠 3 周龄开始致敏, 末次激发 12 小时每组随机选择 3 只小鼠取血清和脑组织。8 周龄开始进行行为学检测, 行为学检测后每组随机选择 6 只小鼠取血清和脑组织。

1.2. 主要试剂和药品

名称	来源 (公司)
Iba-1 一抗, cat:01919741	Wako
Iba-1 二抗, cat:PV-9001	中山金桥
Iba-1 荧光二抗, cat:SA00009-2	ProteinTech.
c-fos 一抗, cat:PC38	CALBIOCHEM
c-fos 二抗, cat:BA-1000	VECTORSTAIN
c-fos ABC kit, cat:PK-6100	VECTORSTAIN
RNA 反转录试剂盒	天根
cDNA 荧光定量试剂盒	天根
DAPI	碧云天
DAB	中山金桥
抗冻液	Fluka

1.3. 主要仪器和设备

实验设备	来源 (公司)
冰冻切片机	Leica
烤片机	益迪医疗
荧光显微镜	Leica

实验设备	来源（公司）
实时定量 PCR 仪	Bio-Rad
离心机	Eppendorf

1.4. 实验方法

1.4.1. 免疫组织化学（免疫荧光）

溶液配制

- (1) 载玻片处理。将玻片浸泡于 0.5%的明胶硫酸铬钾溶液（2g 明胶+0.2g 硫酸铬钾溶于 400ml 水中）2 分钟，拿出晾干，重复 3 次，待完全晾干后于室温存储；
- (2) PBS 配置。

Table 2-1 Phosphate Buffered Saline （PBS）
表 2-1 磷酸盐缓冲液

Reagent	Final concentration	Amount to add (10×)
NaCl	1.37M	80g
KCl	27mM	2g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	100mM	35.8g
KH ₂ PO ₄	18mM	2.4g
H ₂ O		1000ml

调节 pH 至 7.4，使用时取 10×PBS 100ml 加 900ml 超纯水配置成 1×PBS，存储于 4℃冰箱；

- (3) 多聚甲醛配置（4%）。将 40g PFA 溶于 1000ml 1×PBS，55℃过夜，期间摇晃几次，后存储于 4℃冰箱；
- (4) 蔗糖溶液配置（30%）。称量 30g 蔗糖，溶于 100ml 1×PBS；
- (5) 抗冻液配置。将 150g 蔗糖和 300ml 乙二醇溶于 500ml 1×PBS；
- (6) EDTA 溶液配制（10%）称量 10g EDTA 溶于 1×PBS 溶液，55℃过夜，期间摇晃几次；

- (7) 柠檬酸抗原修复液 (0.01mol/L)。称量柠檬酸三钠 3g, 柠檬酸 0.4g, 溶解于 1000ml 超纯水, pH = 6.0 ;
- (8) 3%双氧水。取 1ml 30% 双氧水于 9ml 1×PBS。

组织处理

- (1) 心脏灌流。将 20~40ml PBS 注入小鼠左心室, 剪破右心耳, 肺部发白后将 20~40ml 4% PFA 从左心室注入, 待小鼠僵硬。实验在通风橱内进行;
- (2) 取小鼠大脑和鼻腔后以大约 1:20 (组织体积: PFA 体积) 放入 4% PFA 中, 4℃过夜;
- (3) 大脑脱水。将小鼠大脑放入 30%蔗糖溶液, 4℃过夜, 第二天换上新的 30% 蔗糖溶液, 待大脑沉底, 取出放置于-20℃冰箱。鼻腔脱钙。将浸泡于 4% PFA 的小鼠鼻腔放入 10% EDTA 溶液, 每星期更换一次 EDTA 溶液, 第三周取出放置于-20℃;
- (4) 冰冻切片 (贴片法)。大脑速冻于冰冻切片机-25℃, 大致 30min。切片厚度 30μm, 直接贴片于载玻片上。将片子于烤片机上 55℃干燥 30min。存放于-20℃冰箱, 待用时取出;
- (5) 冰冻切片 (漂片法) 大脑速冻于冰冻切片机-25℃, 大约 30min。切片厚度 40μm, 将片子放在装有抗冻液的孔板内, 每个大脑根据切片顺序依次存放在 4 个孔内。存放于-20℃冰箱, 待用时取出。

免疫组织化学染色 (Iba-1)

- (1) 清洗。将存放于-20℃的脑片取出, 用 PBS 洗 3×5min;
- (2) 抗原修复。将片子浸泡于抗原修复液中, 99℃水浴 10min, 取出直至冷却到室温;
- (3) 清洗。PBS 洗 3×5min;
- (4) 双氧水浸泡。将脑片浸泡于 3% H₂O₂ 10min;
- (5) 清洗。PBS 洗 3×5min;
- (6) 孵育 1 抗 (Wako 公司)。将脑片浸泡于一抗混合液中于 4℃冰箱过夜。一抗混合液成分 (0.3% Triton×100, 2% 山羊血清, 1 抗稀释比 1:500, 稀释液

1×PBS);

- (7) 清洗。PBS 洗 3×5min;
- (8) 孵育二抗 (AB kit, 中杉金桥公司)。室温浸泡 20min;
- (9) 清洗。PBS 洗 3×5min;
- (10) 孵育三抗 (AB kit, 中杉金桥公司)。室温浸泡 20min;
- (11) 清洗。PBS 洗 3×5min;
- (12) DAB 显色 (中杉金桥公司)。浸泡约 10s~60s;
- (13) 浸泡 PBS, 终止反应;
- (14) 干燥。烤片机上, 55℃烤干, 约 30min;
- (15) 脱水和封片。70%乙醇浸泡 5h 或者过夜。95%乙醇浸泡 2×3min, 100%乙醇 2×3min, 二甲苯浸泡 2×3min, 树脂封片。(此过程在通风厨内进行)
- (16) 每组 3 只小鼠, 每只小鼠随机挑选 3 片所关注脑区进行拍摄, 每个区域随机选取 4 个小胶质细胞进行斑块分维分析 (Fractal analysis)。每组小鼠分别分析 $3 \times 3 \times 4 = 36$ 个小胶质细胞。

免疫组织化学染色 (c-fos)

方法与 Iba-1 免疫组织化学染色相似。不同的是 1) 没有进行抗原修复; 2) 一抗稀释比为 1:10000 (4℃孵育 24~36h), 二抗稀释比为 1:200 (室温孵育 1.5~2h), 三抗稀释比, A 液和 B 液都是 1:200 (室温孵育 1.5~2h); 3) PBS 清洗 5×6min。

1.4.2 RNA 的提取和反转

总 mRNA 的提取

- (1) 小鼠麻醉后断头处死, 在冰上剥离前额叶 (运动) 皮层、躯体感觉皮层、视觉 (听觉) 皮层 (Fig.2.1)、海马、下丘脑, 并迅速放入液氮, 存储于 -80℃ 冰箱;
- (2) 将脑区放入装有 500μl Trizol 和研磨珠的 2ml EP 管内, 60Hz 研磨 10~15s, 室温静置 5min;
- (3) 加入 1/5 体积 (200μl) 的氯仿, 用力震荡 15s, 室温放置 3~15min;
- (4) 12,000g 离心, 15min, 4 摄氏度, 离心 15min;

- (5) 取上层相液体于一新 1.5ml EP 管,加入等体积的异丙醇,室温静置 10min。如果觉得 RNA 少,可放置过夜;
- (6) 12,000g 离心, 10min,4 摄氏度;
- (7) 弃掉上清, 加入 1ml 75%乙醇;
- (8) 7.500g 离心, 5min, 4 摄氏度;
- (9) 弃掉上清, 尽量吸去乙醇。室温干燥 5~10min, (不要完全干燥);
- (10) 加入 30 μ l~50 μ l 无 RNA 酶的去离子水 (DEPC 水) 溶解 RNA;
- (11) 用分光光度计测定浓度, 取 2 μ l RNA 溶液于仪器中检测。记录 A260/A280 的比值。
- (12) RNA 溶液存放于-20℃冰箱, 长期保存补加 NaAc (pH4.0) 至 0.25M, 再加 2.5 倍体积乙醇, -80℃保存;
- (13) 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 纯度。配制 1%浓度的琼脂糖凝胶, 添加 1%甲醛, 电泳约 20min。

mRNA 反转录成 cDNA

质量合格的总 RNA 按照天根 Fast Quant RT kit cDNA 第一链合成试剂盒说明书进行反转, 以反转 8 μ l RNA 为例:

- (1) 去除基因组 DNA。按照表 2-4 混合液, 彻底混匀。短暂离心, 42℃, 3min。

Table 2-2 gDNA removal system

表 2-2 gDNA 去除体系

Ingredient	Amount to add
5 \times gDNA Buffer	2 μ l
Total RNA	8 μ l
Rnase-Free ddH ₂ O	0 μ l

- (2) 按照表 2-5 配置体系。混匀, 加入到已去 DNA 的溶液中, 42℃孵育 15min, 95℃孵育 3min,至于冰上,-20℃保存。

Table 2-3 reverse transcription system**表 2-3 反转录体系**

组分	使用量
10×Fast RT Buffer	2μl
RT Enzyme Mix	1μl
FQ-RT Primer Mix	2μl
Rnase-Free ddH ₂ O	5μl

1.4.3 荧光定量 PCR

以上述 cDNA 为模板来进行实时荧光定量 PCR，以 GAPDH 为内参。目的基因和内参的引物序列见 Table 2-5；反应体系见 Table2-6；PCR 程序见 Table2-7。实时定量分析仪器 Bio-Rad 获取 Ct 值，并计算 $2^{-\Delta Ct}$ 的值作为相对表达量。

Table 2-4 Sequences of Primers**表 2-4 引物序列**

Gene	Primer-Forward	Primer-Reverse
GAPDH	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
β-actin	AGGGAAATCGTGCGTGACA	CCACAGGATTCCATACCCAAGA
BDNF	GAGGTCTGACGACGACATCAC	CCTCCAGCAGAAAGAGTAGAGG
CRF	GGATCTCACCTTCCACCTTC	CCGATAATCTCCATCAGTTTCC
IL-4	AGAACACCACAGAGAGTGAG	TGAATCCAGGCATCGAAAAG
NGF	CCCGAATCCTGTAGAGAGTG	GACAAAGGTGTGAGTCGTGG
LTR-9	ATGGTTCTCCGTCGAAGGACT	GAGGCTTCAGCTCACAGGG

Table 2-5 Reaction of Real Time PCR**表 2-5 实时定量 PCR 反应体系**

Ingredient	Amount to add
2×SuperReal PreMix Plus	10μl
Primer-Forward (10μM)	0.6μl
Primer-Reverse (10μM)	0.6μl

Ingredient	Amount to add
cDNA temple	1 μ l
ddH ₂ O	7.8 μ l

Table 2-6 Protocol of Realtime PCR
表 2-6 实时定量 PCR 反应流程

Procedure	Temperature	Time
1 st Incubation	95℃	15min
2 nd Melting	95℃	10s
3 rd Annealing	58℃	30s
4 th Elongation	72℃	10s
5 th Plate read		
6 th go to 2 nd step for 39 more times		
7 th Incubation	95℃	10s
8 th Meltcurve	65℃ to 95℃, increment 0.5℃	5s
9 th Plate read		
End		

1.5. 实验数据处理和分析

数据用 GraphPad Prism 6 进行统计，以 unpaired two-tailed t-test 方法进行分析，用平均值 \pm 标准误显示数据。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义； $P<0.01$ 为统计学上具有显著差异； $P<0.001$ 为统计学上具有极显著差异。

2. 结果

2.1. 短期隔离过敏原的 AR 少年小鼠在行为学检测后脑内分子表达水平

行为学检测结束，小鼠继续饲养 3 天后进行取样，每组 3 只小鼠。实时定量 PCR 实验结果显示，OVA 组小鼠脑内 BDNF 的 mRNA 水平在前额叶/运动皮层 ($p=0.8781$) (Fig.2.2)、躯体感觉皮层 ($p=0.4539$) (Fig.2.3a)、视觉/听觉皮层

($p=0.3830$) (Fig.2.4a)、纹状体 ($p=0.3846$) (Fig.2.5) 的相对表达量与 Veh 组小鼠相比没有明显统计学差异。

OVA 组小鼠脑内 CRF 的 mRNA 水平在前额叶/运动皮层 ($p=0.7945$) (Fig.2.2)、躯体感觉皮层 ($p=0.9507$) (Fig.2.3b)、视觉/听觉皮层 ($p=0.8512$) (Fig.2.4b)、纹状体 ($p=0.6458$) (Fig.2.5) 的相对表达量与 Veh 组小鼠相比没有明显统计学差异。

OVA 组小鼠脑内 LTR-9 的 mRNA 水平在前额叶/运动皮层 ($p=0.9838$) (Fig.2.2)、躯体感觉皮层 ($p=0.5834$) (Fig.2.3c)、视觉/听觉皮层 ($p=0.3638$) (Fig.2.4c)、纹状体 ($p=0.2574$) (Fig.2.5) 的相对表达量与 Veh 组小鼠相比没有明显统计学差异。

另外, IL-4 ($p=0.2706$) (Fig.2.2) 和 NGF ($p=0.4522$) (Fig.2.2) 在前额叶/运动皮层的 mRNA 相对表达量也没有出现异常。

小结: 行为学检测结束后, AR 小鼠的前额叶/运动皮层、躯体感觉皮层、视觉/听觉皮层和纹状体中的 BDNF、CRF、LTR-9 的 mRNA 表达水平没有发现明显异常。另外, 白细胞介素-4 (IL-4) 和神经生长因子 (NGF) 在前额叶/运动皮层的表达量也没有明显异常。

2.2. 短期隔离过敏原的 AR 少年小鼠在行为学检测后脑小胶质细胞激活状态

行为学检测结束, 小鼠继续饲养 3 天后进行取样, 每组 3 只小鼠。实验通过 Iba-1 免疫组织化学进行标记小鼠脑内小胶质细胞, 以观察其形态。通过 ImageJ 进行分维分析 (Fractal analysis), 利用 $\log N$ 小框计数 (box counts) 和 $\log e$ 小框数量/图形数量 (box scale/image scale) 进行绘图, 得出与图形复杂度相关的斜率 $D_B = -\lim[\log N_i * e / \log e]$, $N_i = i^{\text{th}}$, e = 小框数量/图形数量。 D_B 值 (分形维数) 越高, 小胶质细胞分支数量越多, 复杂程度越高。实验结果显示, OVA 组小鼠前扣带回皮层中小胶质细胞形态的复杂程度 ($D_B = 1.522 \pm 0.005337$) 比 Veh 组小鼠 ($D_B = 1.501 \pm 0.004966$) 的复杂程度明显增高 ($p=0.0055$) (Fig.2.6c); OVA 组小鼠前扣带回皮层中小胶质细胞的半径 ($710.0 \pm 18.61 \mu\text{m}$) 比 Veh 组小鼠 ($612.9 \pm 19.47 \mu\text{m}$) 的半径明显增长 ($p=0.0006$) (Fig.2.6b)。但是, OVA 组小鼠前扣

带皮层的小胶质细胞数量 160.0 ± 8.000 与 Veh 组小鼠前扣带皮层的小胶质细胞数量 154.0 ± 5.132 无明显统计学差异 ($p = 0.5621$) (Fig.2.6a); OVA 组小鼠小胶质细胞的胞体大小 ($90.76 \pm 3.805 \mu\text{m}^2$) 与 Veh 组小鼠前扣带回皮层中的小胶质细胞胞体大小 ($89.33 \pm 4.928 \mu\text{m}^2$) 无明显统计学差异 ($p = 0.8199$) (Fig.2.6d)。这表明, 行为学结束后的 AR 小鼠前扣带回皮层内的小胶质细胞处于激活状态。

2.3. 短期隔离过敏原的 AR 少年小鼠在行为学检测后神经细胞的活动状态

行为学检测结束后, 小鼠继续饲养 3 天, 然后进行取样。实验进行 c-fos 免疫组织化学染色, 结果发现 OVA 组小鼠脑内 c-fos 阳性细胞数量在外侧中隔背侧区 ($p = 0.0761$)、眼眶前额叶外侧 ($p = 0.1919$) 和腹侧区 ($p = 0.9910$)、内侧杏仁核 ($p = 0.8556$) 区域内与 Veh 组小鼠没有明显统计学差异 (Fig.2.7)。

小结: 外侧中隔背侧区、眼眶前额叶外侧和腹侧区、内侧杏仁核内的神经细胞激活状态与对照小鼠没有明显统计学差异。

2.4. AR 少年小鼠在末次激发 12 小时后神经细胞的活动状态

由于过敏性鼻炎晚期的炎症反应发生在激发 6~12 小时后, 因此我们在末次鼻腔激发 12 小时后, 随机每组选取 3 只小鼠进行取样。结果显示, OVA 组小鼠外侧中隔背侧区的 c-fos 阳性细胞数量 105.0 ± 43.73 比 Veh 组小鼠的阳性细胞数量 284.7 ± 42.71 明显减少 ($p = 0.0424$) (Fig.2.8b); OVA 组小鼠下丘脑室旁核的 c-fos 阳性细胞数量 43.67 ± 15.30 比 Veh 组小鼠的阳性细胞数量 129.7 ± 19.22 明显减少 ($p = 0.0249$) (Fig.2.8c); 而在眼眶前额叶的外侧区 ($p = 0.3869$) 和腹侧区 ($p = 0.1534$), 以及内侧杏仁核中 ($p = 0.3124$) 的 c-fos 阳性细胞数量中 OVA 组与 Veh 组小鼠之间没有明显统计学差异 (Fig.2.8a)。

小结: AR 少年小鼠在末次激发 12 小时后, 外侧中隔背侧区和下视丘脑室旁核区域内的神经细胞活动受到抑制, 但是眼眶前额叶外侧和腹侧区、内侧杏仁核内神经细胞活跃程度与对照没有明显差异。

3. 讨论

实验结果发现, 末次过敏原激发后 AR 少年小鼠的 PVN 和 LSd 神经细胞活动受到了抑制。由于个体接受正向社交刺激时(如性奖赏刺激^[109]), PVN 神经元会大量释放催产素, 并促使个体克服先天的社交回避^[110], 而当 PVN 神经细胞被抑制后, AR 小鼠的 PVN 神经元不能大量释放催产素, 从而使得短期隔离过敏原后的少年 AR 小鼠出现了部分社交记忆下降^[111]。当然, 似乎 PVN 中的催产素更多涉及的是社交动机行为。那么, 当 AR 小鼠的 LSd 脑区神经细胞活动受到抑制, 很有可能会引起 LSd 处的催产素受体表达下降, 使得在 LSd 脑区在社交记忆的提取阶段释放到 LS 脑区的催产素不能有效的结合 LS 神经元上^[92], 进而导致 AR 小鼠在社交记忆提取阶段出现紊乱。有趣的是社会应激诱导的抑郁症模型鼠型中 PVN 神经细胞被激活^[113], 而习得性抑郁样行为中小鼠 LS 神经细胞则被抑制^[117], 我们的实验结果显示 AR 少年小鼠末次激发后的 PVN 和 LSd 神经细胞的活动都被抑制。也许存在更加复杂的神经回路和分子机制而导致 AR 少年小鼠短期隔离过敏原后表现出部分抑郁样行为。因为抑制 LS 神经细胞则会增加小鼠糖水进食量(小鼠欣快感没有缺失)^[121]; 敲除 GABA_B 受体的小鼠在 FST 中表现出明显的抗抑郁样行为, 但是 TST 中则没有表现出抗抑郁样行为^[79]。

AR 小鼠行为学检测结束后, 我们并没有发现其 PFC、LSd、PVN、MeA 脑区中 c-fos 表达有异常, 可能是因为小鼠经过 3 天恢复后, 其神经细胞的活动处于平稳状态, 没有因为外界强烈刺激而产生异常反应, 因此没有表现出明显的差异。当然, 不排除当 AR 小鼠进行社交活动以及对于应激时的反应过程中其神经系统的活动依旧会出现异常。我们需要进一步的实验进行验证。

关于小胶质细胞的形态和功能的研究存在多种理论^[122], 一般认为处于静息状态的小胶质细胞具有较多的分支, 并与神经细胞进行交流或者监控神经细胞^[123; 124]; 具有强烈的炎症反应和吞噬功能的小胶质细胞则几乎没有分支并且胞体扩大, 其形态类似于阿米巴虫^[124-127]; 而处于激活并且具有炎症反应特性(例如释放 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等炎症因子)的小胶质细胞的胞体扩大, 分支减少并变粗^[124; 128-130]; 另外还有一种激活形态的小胶质细胞, 其分支过度增多但却没有炎

症反应（或者是抗炎症状态，但会释放 IL-4、IL-10、TGF- β 等抗炎症因子）^[124; 130-132]。我们发现短期隔离过敏原后 AR 小鼠前扣带回皮层的小胶质细胞的分支过度增多，并且延长。这种变化提示着 AR 会导致大脑小胶质细胞的形态的改变，并且增加小胶质细胞与神经细胞的交流或者更有效地监控神经细胞。短期隔离过敏原后 AR 小鼠表现出部分抑郁样行为则可能与小胶质细胞的这种活动有关。但是 AR 小鼠脑内的小胶质细胞是如何被激活的，是处于炎症状态还是抗炎状态，以及这种激活状态的小胶质细胞会通过什么样的方式来进而与神经细胞相互作用，从而导致抑郁样情绪的机制需要进一步研究。

由于抑郁症患者的前额叶中 BDNF 表达量下降，伏隔核中则表达量上升^[98; 99]，因此我们检测了 AR 小鼠前额叶皮层和纹状体的 BDNF 表达量，结果 BDNF 的表达量并没有异常。有可能 AR 小鼠中 BDNF 的作用机制与 AR 病患存在差异。下丘脑-垂体-肾上腺轴被认为是中枢神经系统调控外周炎症的途径之一，并且应激状态也会促使促肾上腺皮质激素释放因子的表达和释放^[104]。但是，短期隔离过敏原后 AR 小鼠脑内皮层和纹状体中 CRF 并没有异常表达。这与 Tonelli^[47]等人的报道中过敏性鼻炎模型鼠中前额叶皮层的 CRF 表达量升高并不一致。值得注意的是他们的 AR 模型鼠是在成年后致敏，并在末次激发 3 天后就进行检测的结果，同时表现出高焦虑样行为。而我们的实验是在小鼠刚离奶时致敏，到成年后进行行为学检测，AR 小鼠并没有表现出异常的焦虑样行为。似乎与 CRF 有关的焦虑情绪只是 AR 引起的短期效应，并不会导致长期影响。

总的来说，少年期 AR 小鼠在短期隔离过敏原后出现的部分抑郁样行为和部分社交记忆下降可能与 LS 以及 PVN 神经元的活动受到抑制、以及脑内炎症小胶质细胞的异常激活有关。但是，也有可能是在本实验条件下，以 BALB/c 少年小鼠为 AR 模型并不能完全模拟出人类青少年时 AR 的所有疾病症状，进而只能部分反映出 AR 引起的精神疾病特征。

4. 版图说明

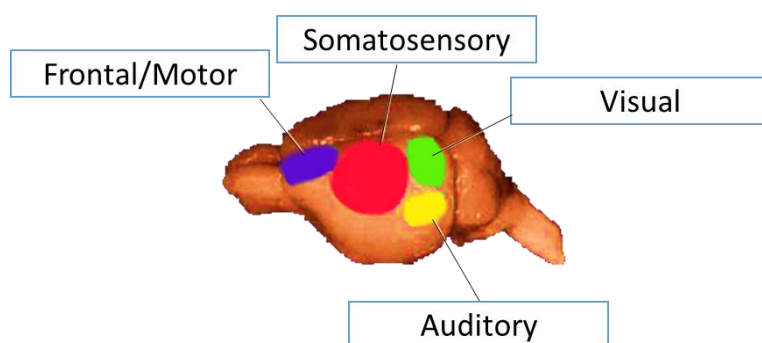


Fig.2.1 Map of mice cortex. Human cortical regionalization is similar to patterns found in rodents [133; 134].

图 2.1 小鼠皮层图谱。人类大脑皮层区分与啮齿类动物大脑皮层的区分是相似的。

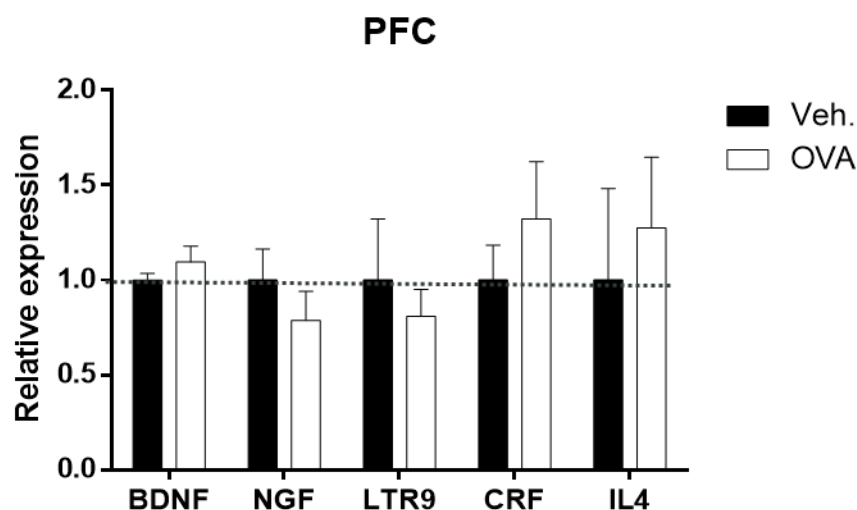


Fig.2.2 mRNA levels in prefrontal cortex of allergic rhinitis mice after a short time allergen isolation. The relative mRNA expression level of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), nerve growth factor (NGF), corticotrophin-releasing factor (CRF), interleukin 4 (IL4), Toll-like receptor 9 (LTR9). Student t test was conducted and data are presented as means \pm SEM. N=3. $p>0.05$.

图 2.2 小鼠前额叶皮层中相关分子 mRNA 表达量。BDNF，脑源性神经营养因子。NGF，神经生长因子。LTR9，铯受体 9。CRF，促肾上腺皮质激素释放因子。IL4，白介素 4。采用 Student t 检验进行数据分析，以“平均值 \pm 标准误”展示数据。N=3。 $p>0.05$ 。

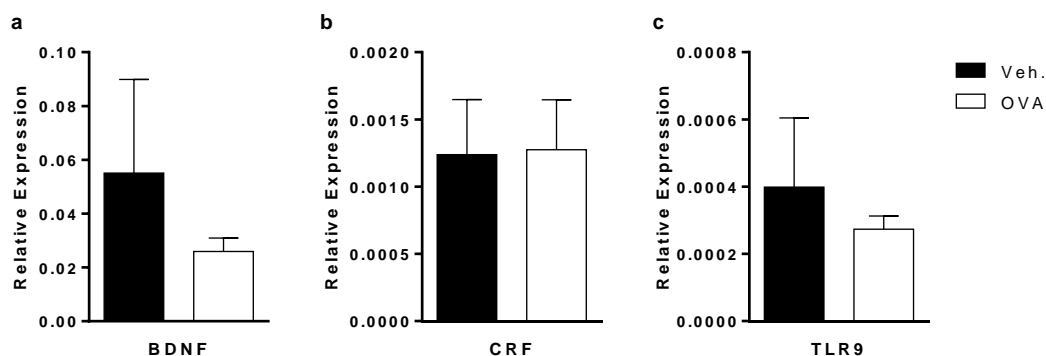


Fig.2.3 mRNA levels in somatosensory cortex of allergic rhinitis mice after a short time allergen isolation. The relative mRNA expression level of (a) brain-derived neurotrophic factor, (b) corticotrophin-releasing factor, (c) Toll-like receptor 9. Student t test was conducted and data are presented as means \pm SEM. N=3. $p>0.05$.

图 2.3 小鼠感觉运动皮层中相关分子 mRNA 表达量。(a) BDNF, 脑源性神经营养因子。(b) CRF, 促肾上腺皮质激素释放因子。(c) LTR9, 铎受体 9。采用 Student t 检验进行数据分析, 以“平均值 \pm 标准误”展示数据。N=3。 $p>0.05$ 。

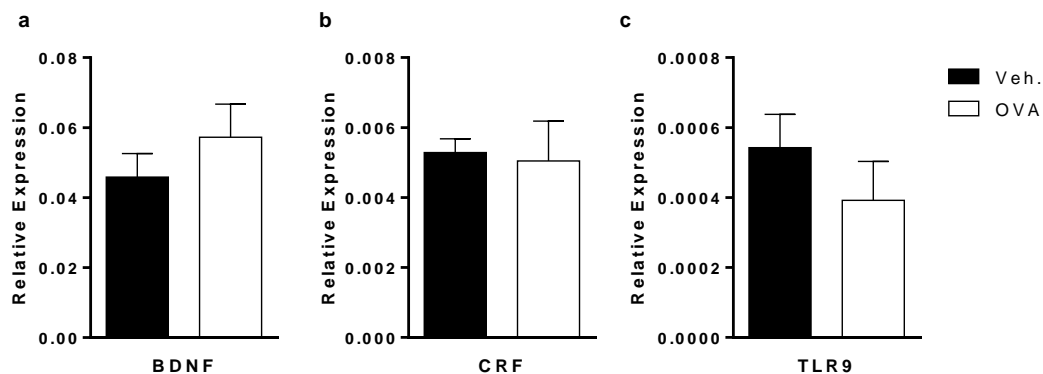


Fig.2.4 mRNA levels in visual and auditory cortex of allergic rhinitis mice after a short time allergen isolation. The relative mRNA expression level of (a) brain-derived neurotrophic factor, (b) corticotrophin-releasing factor, (c) Toll-like receptor 9. Student t test was conducted and data are presented as means \pm SEM. N=3. $p>0.05$.

图 2.4 小鼠视听皮层中相关分子 mRNA 表达量。(a) BDNF, 脑源性神经营养因子。(b) CRF, 促肾上腺皮质激素释放因子。(c) LTR9, 铎受体 9。采用 Student t 检验进行数据分析, 以“平均值 \pm 标准误”展示数据。N=3。 $p>0.05$ 。

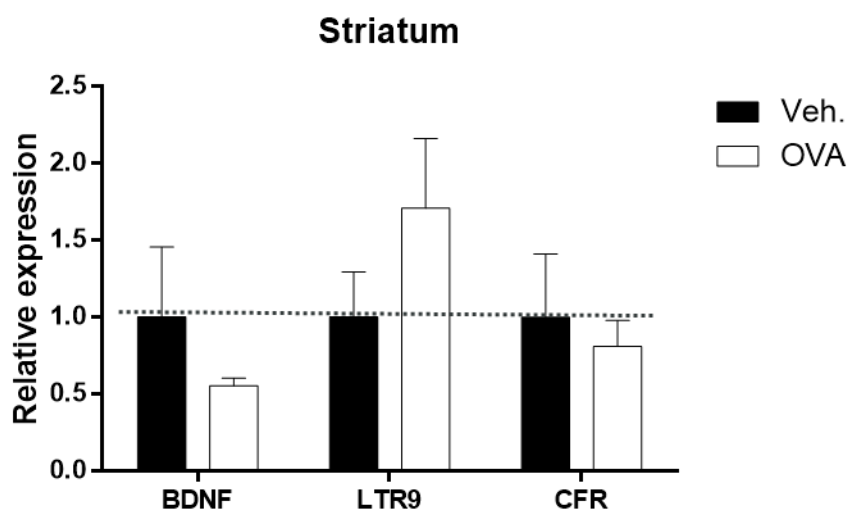


Fig.2.5 mRNA levels in striatum of allergic rhinitis mice after a short time allergen isolation. The relative mRNA expression level of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), corticotrophin-releasing factor (CRF), Toll-like receptor 9 (TLR9). Student t test was conducted and data are presented as means \pm SEM. N=3. $p>0.05$.

图 2.5 小鼠视听皮纹状体层中相关分子 mRNA 表达量。(a) BDNF, 脑源性神经营养因子。(b) CRF, 促肾上腺皮质激素释放因子。(c) LTR9, 铎受体 9。采用 Student t 检验进行数据分析, 以“平均值 \pm 标准误”展示数据。N=3。 $p>0.05$ 。

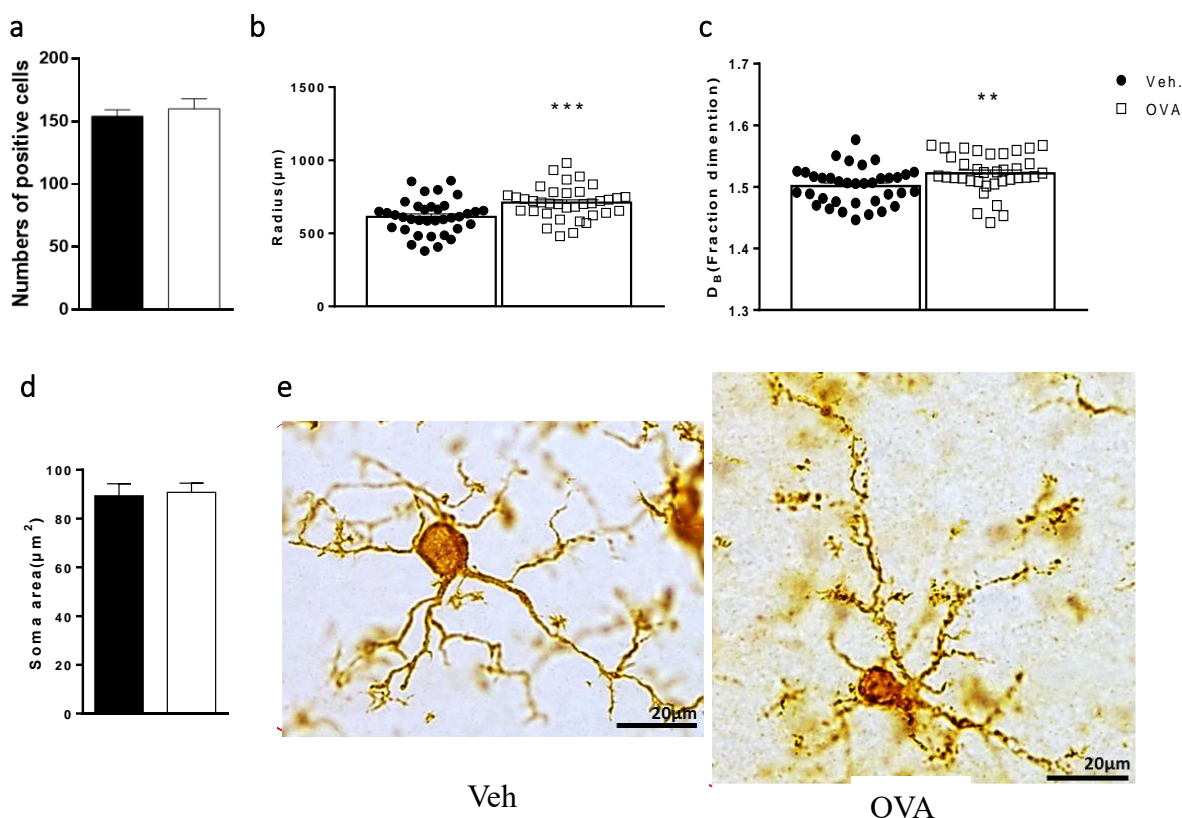


Fig.2.6 Analyses of immunohistochemistry of Iba-1 positive cells in sections of Cingulate cortex 2 area in allergic rhinitis mice after a short term allergen isolation. (a) Numbers of Iba-1 positive cells. (b) Radius of Iba-1 positive cells. (c) Fractal dimension (D_B) of Iba-1 positive cells. (d) Soma area of Iba-1 positive cells. (e) Representative of positive cells in OVA and Veh group mice. Student t test was conducted and data are presented as means \pm SEM. N=3, 36. $**p<0.01$ $***p<0.001$.

图 2.6 小鼠扣带回 2 脑区中 Iba-1 阳性细胞分析。(a) Iba-1 阳性细胞数量。(b) Iba-1 阳性细胞半径。(c) Iba-1 阳性细胞分形维数只 (D_B)。(d) Iba-1 阳性细胞胞体面积。(e) Iba-1 阳性细胞代表。采用 Student t 检验进行数据分析，以“平均值 \pm 标准误”展示数据。N=3, 36. $**p<0.01$ $***p<0.001$ 。

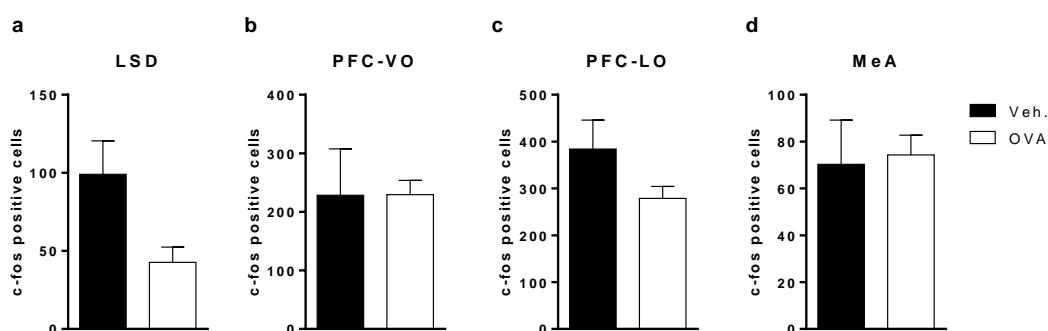
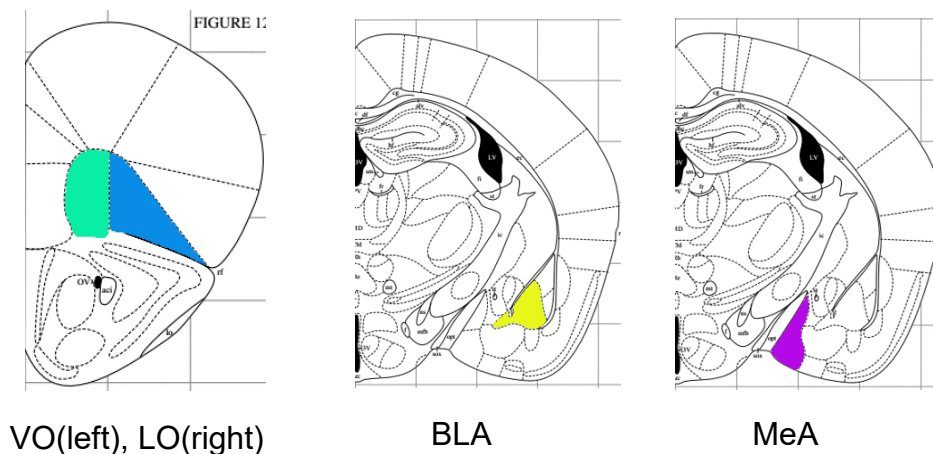
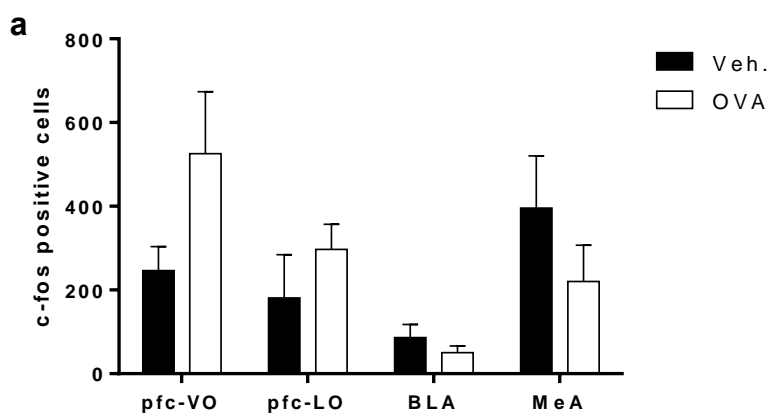


Fig.2.7 Neural activity of allergic rhinitis mice after a short term allergen isolation.

Expression of c-fos in the (a) lateral septum dorsal part, (b) ventral and (c) lateral orbital prefrontal cortex, (d) medial Amygdala. Student t test was conducted and data are presented as means \pm SEM. N=3. $p>0.05$.

图 2.7 短期隔离过敏原后小鼠脑内 c-fos 阳性细胞表达情况。(a) 外侧中隔背侧区, 眶额叶皮层 (b) 腹侧区和 (c) 内侧杏仁核区。采用 Student t 检验进行数据分析, 以“平均值 \pm 标准误”展示数据。N=3。 $p>0.05$ 。



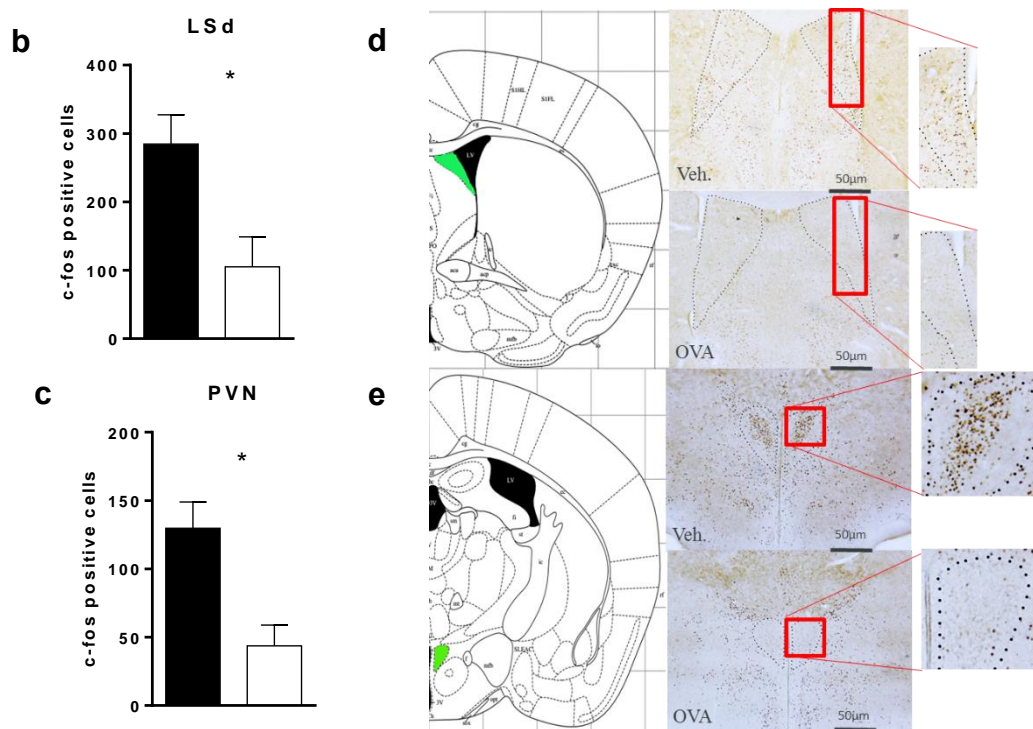


Fig.2.8 Neural activation of allergic rhinitis mice, 12h after the last nasal challenge. Expression of c-fos in the (a) ventral and lateral orbital prefrontal cortex (PFC-VO, PFC-LO), bilateral amygdala (BLA), medial Amygdala (MeA). (b) Lateral septum dorsal part (LSd), (c) hypothalamic paraventricular nucleus (PVN). Representative of neuronal activities in (d) LSd and (f) PVN. Student t test was conducted and data are presented as means \pm SEM. N=3. * $p < 0.05$. Bar=50 μ m.

图 2.8 末次激发 12 小时后小鼠脑内 c-fos 阳性细胞表达情况。(a) 眶额叶皮层腹侧区和外侧区外侧中隔背侧区、外侧杏仁核、内侧杏仁核。(b) (d) 外侧中隔背侧区。(c) (e) 下丘脑室旁核。采用 Student t 检验进行数据分析，以“平均值 \pm 标准误”展示数据。N=3。p>0.05。

第三章 综述

炎症与抑郁症

抑郁症是一种非常严重的精神紊乱，在中国有高达 3.5%，美国高达 10% 的人口遭受着抑郁症带来的困扰^[135]。从全世界范围来看，依据劳力丧失寿命年，抑郁症是排名第二的疾病^[136; 137]。虽然有些治疗方式对部分病患来说是有效的，但是传统的抗抑郁疗法对于大约三分之一的病患来说是无效的^[138]，这会进一步加剧全球社会负担。越来越多的数据显示，炎症反应被认为是导致抑郁症疾病的重要因素之一。

应激转化为炎症。暴露于心理社会应激环境可以使得一个人会发展成抑郁症。这同时这也是建立抑郁症动物模型的主要途径之一。在实验条件下观察到，暴露于社会心理应激的人，激活了其体内的炎症反应，这可能是联系炎症与抑郁症的一个窗口^[30; 31]。应激转化成炎症的机制被认为是通过以下两种途径发生的。一是应激所导致的神经内分泌途径，包括下丘脑-垂体-肾上腺轴和交感神经系统，而这两个系统同时具备有免疫调节功能^[104]。另一个是免疫体（*inflammasomes*）途径^[139]。这是一个可以对病原微生物和环境应激都做出响应的蛋白复合体，其在骨髓细胞中形成。因此，抑郁症本身就会使机体产生炎症信号分子。

炎症信号传递到大脑。尸检因抑郁症自杀的病患发现，其脑内自身免疫细胞因子和铰受体（*Toll-like receptor, TLR*）表达升高，并且小胶质细胞和星形胶质细胞在脑内也被激活了，包括前额叶、前扣带皮层和丘脑^[103; 140-142]。一项结合追踪易位蛋白的正电子发射断层扫描技术的实验，证实了抑郁症患者脑内的小胶质细胞、星形胶质细胞、巨噬细胞高度激活^[143]。动物实验的研究也阐述了一些炎症信号从外周扩散到中枢神经系统的通路机制。研究主要集中在炎症细胞因子（大分子）是如何穿过血脑屏障而影响大脑功能的^[27]。主要包括三个途径，一个是“体液途径”，这涉及细胞因子通过血脑屏障的漏区如室周器官（*circumventricular organs*）进入脑内；还有结合到血脑屏障上的转运蛋白。另一个是“神经途径”，这个涉及到细胞因子结合到外周传入神经纤维上如迷走神经，

刺激脑内上行儿茶酚胺能神经纤维,或者转化成中枢细胞因子^[28]。第三个途径被称为“细胞途径”,这是主要是被激活的免疫细胞(如单核细胞)会转运到脑血管和渗透到脑实质^[29]。通过阻断单核细胞渗透到脑内可以消除抑郁症动物模型的抑郁样行为^[29]。这些实验数据都支持的一个观点是外周组织的炎症反应可能引起了脑内的炎症反应从而导致抑郁症。

细胞因子和神经递质。神经递质的传递对于调控情绪起到重要的作用,因此炎症以及炎症因子对于单胺类神经递质如 5-羟色胺、去甲肾上腺素和多巴胺,以及兴奋性氨基酸谷氨酸的影响受到了越来越多的关注。炎症因子可以通过多种信号通路来降低突触对单胺类神经递质的可用性,从而导致抑郁症^[144]。例如因抑郁症而自杀的病患脑内前额叶扣带回的小胶质细胞中高表达喹啉酸^[145]。喹啉酸直接激活谷氨酸受体(NMDAR),同时刺激谷氨酸的释放以及阻断星形胶质细胞重吸收谷氨酸^[146],最后导致谷氨酸在突触内外的富集。谷氨酸结合突触外的 NMDA 受体导致兴奋性毒性的增加以及减少 BDNF 的产生^[147]。BDNF 促进神经新生,这是一个抗抑郁反应的重要先决条件。并且已有研究证明 IL-1 β 和 TNF 以及它们的下游信号通路包括 NF- κ B 可以下调 BDNF 的产生而阻碍神经新生^[148; 149]。这些结果提示由谷氨酸或者喹啉酸过度激活谷氨酸受体可能是炎症导致抑郁样行为的主要的通路。

炎症对神经回路的影响。大脑成像研究揭示了,细胞因子会改变一些脑区的活动。这些细胞因子的靶向脑区参与了调控动机和运动功能(可促进社交回避与节约能量);涉及了觉醒、焦虑和警觉状态(可提升警觉状态和保护自身以免受攻击)。例如,多巴胺在动机和肌肉运动中具有重要的作用,而细胞因子被证明可以减少基底核多巴胺的释放,同时会降低基于努力的动机行为和抑制基底核中(特别是腹侧纹状体)有关奖赏的神经回路的活动^[150-152]。多种不同的脑成像实验都揭示了炎症的激活与在纹状体中奖赏反应的下降具有相关性,这意味着细胞因子介导对大脑活动影响的结果可靠性高^[150; 153; 154]。最近的 fMRI 的研究发现炎症导致正向奖赏反应的下降会伴随着对负性刺激的敏感性增强,以及降低黑质(基底核中富集多巴胺的一个脑区)对新颖事物的反应^[154; 155]。伤寒疫苗也被证

明会激活亚属前扣带回皮质 (subgenual ACC, sgACC)，这是一个与抑郁症关联的脑区，还会降低 sgACC 与腹侧纹状体的连接性，同时可以被血清中炎症因子 IL-6 所调控^[156]。而抑郁症病患中与奖赏有关的脑区的连接程度降低了，这包括腹侧纹状体和腹内侧前额叶皮质^[157]。这些数据表明细胞因子对大脑，特别是多巴胺能系统影响会导致个体处于，动机下降或者快感缺乏的状态，这一种抑郁症的核心症状中^[60]。

总的来说，外周炎症可以影响中枢系统的炎症反应，而中枢系统也会影响外周炎症反应。通过不同的途径和方式，炎症影响了特定的脑区、神经元、分子，进而诱发抑郁症，而抑郁症本身又会对免疫系统产生影响。

僵核与抑郁症

生物体的一个显著特征就是以恰当的行为来应对外界刺激，这样可以最大化其生存几率，同时可以避免受到威胁和经历不愉快的事件。大脑奖赏系统的主要作用则是控制这些行为，具体就是受到奖赏的行为会被加强；受到惩罚的行为会被阻止。这个奖赏系统有一个复杂的神经网络，包括前脑边缘系统和及其与中脑单胺能系统（如多巴胺能系统和五羟色胺能系统）的联系^[158-160]。而近期的研究发现，外侧僵核在奖赏系统的价值评估中具有重要作用。研究发现外侧僵功能紊乱还与多种精神疾病相关，其中包括抑郁症。

僵核被认为由两个比较明确的核团组成：外侧僵核 (lateral habenula, LHb) 以及内侧僵核 (medial habenula, MH)。LHb 接收来自基底核的投射，参与了许多功能如行为的选择 (selection of action)；LHb 还接收来自边缘系统的投射，具有控制情绪的功能^[161; 162]。LHb 的神经元会投射到多巴胺能系统的中心^[163]和五羟色胺的中心^[164]，而投射到前内侧被盖核 (rostromedial tegmental nucleus, RMTg) 的 GABA 能区域又会抑制多巴胺能中心^[165; 166]。然后这些单胺能系统又会反馈回 LHb^[167; 168]。因此，LHb 具有情绪整合和行为选择 (selection of behavior) 的功能。而由于 LHb 编码了奖赏相关的信号，又对于负性刺激的响应，还调控单胺能中心，所以 LHb 功能的紊乱与精神分裂、药物成瘾、抑郁症密切相关^[169; 170]。

另外，单胺能神经系统的紊乱被认为是抑郁症主要特征^[159; 171]。

正常情况下 LHb 编码了奖赏和惩罚的信息，当对预期感到失望和感觉要被惩罚的时候，LHb 就会被激活^[172]。

在抑郁症病患和抑郁症模型鼠上都发现，LHb 活跃程度加强^[173; 174]，而损毁 LHb 会降低模型鼠的抑郁样行为^[175; 176]。对一难治性抑郁症病患使用脑部深层刺激技术进行治疗发现，抑制僵核活动可以使病患恢复正常并维持几个星期的时间^[169]。相反，LHb 的高度活跃可能会导致抑郁症。强化刺激投射到 VTA 的 LHb 神经元会导致大鼠表现出抑郁样行为^[177]。而这些 LHb 神经元可能会选择性的兴奋 mPFC 投射到 VTA 的多巴胺能神经元，从而使鼠产生厌恶情绪行为^[178]。同时这可能涉及抑郁症中的认知紊乱^[179]。将小鼠暴露在社会应激交互环境中时可以观察到 LHb 会兴奋性的驱动 RMTg 中的神经元^[180]，这可能会降低多巴胺能神经元的活动^[181]，因此可能导致抑郁症^[159]。

LHb 与抑郁症有关的分子机制。抑郁症模型鼠 LHb 的 CaMKII β 升高^[182]。下调 LHb 的 CaMKII β 会减少抑郁症模型鼠的抑郁样行为^[183]。脚内核（entopeduncular nucleus, EP）终端可以同时释放 GABA 和谷氨酸从而控制 LHb 神经元的活动，抑郁症模型鼠中，GABA 释放减少，而接收抗抑郁药物治疗后，GABA 释放增加^[184]。

总的来说，能对环境刺激做出正向和负向反应，这对于物种的生存来说是至关重要的。而僵核在应对外界正向和负向刺激时，调控着机体做出反应的“强度”而不是单一的正或负“值”。

已\待刊文章

1. 郭超, 孟博, 梅兵. 阿尔茨海默症伴性行为紊乱的相关研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2016, (03): 720-724.
2. Behavioral traits in a juvenile mouse model of allergic rhinitis during allergen exposure and after a long-term allergen isolation. (paper preparing)
3. Depression-like behavioral and neural changes in a juvenile mouse model of allergic rhinitis. (paper preparing)

参考文献

- [1]Galli S J, Tsai M, Piliponsky A M. The development of allergic inflammation[J]. *Nature*, 2008, 454(7203): 445-54.
- [2]Akdis C A, Agache I. Global Atlas of allergy[M]. European Academy of Allergy and Clinical Immunology, 2014.
- [3]Ng M L, Warlow R S, Chrishanthan N, et al. Preliminary criteria for the definition of allergic rhinitis: a systematic evaluation of clinical parameters in a disease cohort (I)[J]. *Clin Exp Allergy*, 2000, 30(9): 1314-31.
- [4]Ng M L, Warlow R S, Chrishanthan N, et al. Preliminary criteria for the definition of allergic rhinitis: a systematic evaluation of clinical parameters in a disease cohort (II)[J]. *Clin Exp Allergy*, 2000, 30(10): 1417-22.
- [5]Izquierdo-Dominguez A, Valero A L, Mullol J. Comparative analysis of allergic rhinitis in children and adults[J]. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2013, 13(2): 142-51.
- [6]Pawankar R. Allergic diseases and asthma: a global public health concern and a call to action[J]. *The World Allergy Organization Journal*, 2014, 7(1): 12-12.
- [7]Zhang Y, Zhang L. Prevalence of Allergic Rhinitis in China[J]. *Allergy, Asthma & Immunology Research*, 2014, 6(2): 105-113.
- [8]Chen W, Mempel M, Schober W, et al. Gender difference, sex hormones, and immediate type hypersensitivity reactions[J]. *Allergy*, 2008, 63(11): 1418-1427.
- [9]Govaere E, Van Gysel D, Massa G, et al. The influence of age and gender on sensitization to aero-allergens[J]. *Pediatr Allergy Immunol*, 2007, 18(8): 671-8.
- [10]Bousquet J, Van Cauwenberge P, Khaltayev N, et al. Allergic rhinitis and its impact on asthma[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2001, 108(5 Suppl): S147-334.
- [11]Nayak A S. The asthma and allergic rhinitis link[J]. *Allergy Asthma Proc*, 2003, 24(6): 395-402.
- [12]Marcus M, Yasamy M T, Van Ommeren M, et al. Depression: A global public health concern[J]. *WHO Department of Mental Health and Substance Abuse*, 2012, 1: 6-8.
- [13]Reddy M S. Depression: The Disorder and the Burden[J]. *Indian Journal of Psychological Medicine*, 2010, 32(1): 1-2.
- [14]Hedden S L, Kennet J, Lipari R, et al.: Center for behavioral health statistics and quality, Behavioral health trends in the United States: Results from the 2014 National Survey on Drug Use and Health, 2012.
- [15]Sansone R A, Sansone L A. Allergic Rhinitis: Relationships with Anxiety and Mood Syndromes[J]. *Innovations in Clinical Neuroscience*, 2011, 8(7): 12-17.
- [16]Postolache T, Komarow H, Tonelli L. Allergy: A risk factor for suicide?[J]. *Current Treatment Options in Neurology*, 2008, 10(5): 363-376.
- [17]Chen M-H, Su T-P, Chen Y-S, et al. Allergic rhinitis in adolescence increases the risk of depression in later life: A nationwide population-based prospective cohort study[J]. *Journal of Affective Disorders*, 2013, 145(1): 49-53.
- [18]Audino P, La Grutta S, Cibella F, et al. Rhinitis as a risk factor for depressive mood in pre-adolescents: a new approach to this relationship[J]. *Pediatric Allergy and Immunology*, 2014, 25(4): 360-365.

- [19]Cuffel B, Wamboldt M, Borish L, et al. Economic consequences of comorbid depression, anxiety, and allergic rhinitis[J]. *Psychosomatics*, 1999, 40(6): 491-6.
- [20]Brawley A, Silverman B, Kearney S, et al. Allergic rhinitis in children with attention-deficit/hyperactivity disorder[J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2004, 92(6): 663-7.
- [21]Chou P H, Lin C C, Lin C H, et al. Prevalence of allergic rhinitis in patients with attention-deficit/hyperactivity disorder: a population-based study[J]. *Eur Child Adolesc Psychiatry*, 2013, 22(5): 301-7.
- [22]Yang M-T, Lee W-T, Liang J-S, et al. Hyperactivity and Impulsivity in Children with Untreated Allergic Rhinitis: Corroborated by Rating Scale and Continuous Performance Test[J]. *Pediatrics & Neonatology*, 2014, 55(3): 168-174.
- [23]Meltzer E O. Quality of life in adults and children with allergic rhinitis[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2001, 108(1 Suppl): S45-53.
- [24]Lin T-Y, Lin P-Y, Su T-P, et al. Autistic spectrum disorder, attention deficit hyperactivity disorder, and allergy: Is there a link? A nationwide study[J]. *Research in Autism Spectrum Disorders*, 2014, 8(10): 1333-1338.
- [25]Zerbo O, Leong A, Barcellos L, et al. Immune mediated conditions in autism spectrum disorders[J]. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2015, 46: 232-236.
- [26]Shanahan L, Zucker N, Copeland W E, et al. Are children and adolescents with food allergies at increased risk for psychopathology?[J]. *J Psychosom Res*, 2014, 77(6): 468-73.
- [27]Quan N, Banks W A. Brain-immune communication pathways[J]. *Brain Behav Immun*, 2007, 21(6): 727-35.
- [28]Miller A H, Maletic V, Raison C L. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression[J]. *Biol Psychiatry*, 2009, 65(9): 732-41.
- [29]D'mello C, Le T, Swain M G. Cerebral microglia recruit monocytes into the brain in response to tumor necrosis factor α signaling during peripheral organ inflammation[J]. *J Neurosci*, 2009, 29(7): 2089-102.
- [30]Pace T W, Mletzko T C, Alagbe O, et al. Increased stress-induced inflammatory responses in male patients with major depression and increased early life stress[J]. *Am J Psychiatry*, 2006, 163(9): 1630-3.
- [31]Bierhaus A, Wolf J, Andrassy M, et al. A mechanism converting psychosocial stress into mononuclear cell activation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(4): 1920-5.
- [32]Hodes G E, Kana V, Menard C, et al. Neuroimmune mechanisms of depression[J]. *Nat Neurosci*, 2015, 18(10): 1386-1393.
- [33]Hodes G E, Pfau M L, Leboeuf M, et al. Individual differences in the peripheral immune system promote resilience versus susceptibility to social stress[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(45): 16136-16141.
- [34]Nisbet A D, Saundry R H, Moir A J, et al. The complete amino-acid sequence of hen ovalbumin[J]. *Eur J Biochem*, 1981, 115(2): 335-45.
- [35]Tsunematsu M, Yamaji T, Kozutsumi D, et al. Establishment of an allergic rhinitis model in mice for the evaluation of nasal symptoms[J]. *Life Sci*, 2007, 80(15): 1388-94.
- [36]Labonte I, Hassan M, Risse P A, et al. The effects of repeated allergen challenge on airway smooth muscle structural and molecular remodeling in a rat model of allergic asthma[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2009, 297(4): L698-705.
- [37]Xi L, Fan E, Zhao Y, et al. Role of aluminum adjuvant in producing an allergic rhinitis animal

- model[J]. *Genet Mol Res*, 2014, 13(3): 5173-81.
- [38]Okano M, Nishizaki K, Abe M, et al. Strain-dependent induction of allergic rhinitis without adjuvant in mice[J]. *Allergy*, 1999, 54(6): 593-601.
- [39]Holt P G, Britten D, Sedgwick J D. Suppression of IgE responses by antigen inhalation: studies on the role of genetic and environmental factors[J]. *Immunology*, 1987, 60(1): 97-102.
- [40]Guibas G V, Makris M, Spandou E, et al. Exposure of immunologically naive laboratory rodents to antigen via the airways. Where does tolerance stop and sensitization begin?[J]. *Clin Exp Allergy*, 2012, 42(11): 1552-65.
- [41]Ohki Y, Tokuyama K, Mayuzumi H, et al. Characteristic Features of Allergic Airway Inflammation in a Murine Model of Infantile Asthma[J]. *International Archives of Allergy and Immunology*, 2005, 138(1): 51-8.
- [42]Victor J R, Muniz B P, Fusaro A E, et al. Maternal immunization with ovalbumin prevents neonatal allergy development and up-regulates inhibitory receptor FcγRIIB expression on B cells[J]. *BMC Immunology*, 2010, 11: 11-11.
- [43]Verhasselt V, Milcent V, Cazareth J, et al. Breast milk-mediated transfer of an antigen induces tolerance and protection from allergic asthma[J]. *Nat Med*, 2008, 14(2): 170-175.
- [44]Palermo-Neto J, Guimaraes R K. Pavlovian conditioning of lung anaphylactic response in rats[J]. *Life Sci*, 2000, 68(6): 611-23.
- [45]De Theije C G M, Wu J, Koelink P J, et al. Autistic-like behavioural and neurochemical changes in a mouse model of food allergy[J]. *Behavioural Brain Research*, 2014, 261: 265-274.
- [46]Wu J, De Theije C G M, Da Silva S L, et al. mTOR plays an important role in cow's milk allergy-associated behavioral and immunological deficits[J]. *Neuropharmacology*, 2015, 97: 220-232.
- [47]Tonelli L H, Katz M, Kovacsics C E, et al. Allergic rhinitis induces anxiety-like behavior and altered social interaction in rodents[J]. *Brain Behav Immun*, 2009, 23(6): 784-93.
- [48]Davis M, Williams R, Chakraborty J, et al. Prednisone or prednisolone for the treatment of chronic active hepatitis? A comparison of plasma availability[J]. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 1978, 5(6): 501-505.
- [49]Gupta S K, Fitzgerald J F, Davis M M, et al. Treatment of allergic eosinophilic esophagitis (AEE) with oral prednisone (P) and swallowed fluticasone (F): A randomized, prospective study in children[J]. *Gastroenterology*, 2003, 124(4): A19-A19.
- [50]崔鲁佳, 阮岩, 李婵娟, et al. 变应性鼻炎小鼠模型的建立与 IL-4、IFN-γ 水平检测[J]. *中国新技术新产品*, 2012, (8): 254-254.
- [51]温立婷, 陈福权, 王洁, et al. 变应性鼻炎模型小鼠鼻黏膜的形态学观察[J]. *现代生物医学进展*, 2014, 14(22): 4210-4214.
- [52]Braga F, Mota I. Homologous passive cutaneous anaphylaxis (PCA) in mice and heterologous PCA induced in rats with mouse IgE[J]. *Immunology*, 1976, 30(5): 655-69.
- [53]Sugimoto Y, Kawamoto E, Chen Z, et al. A new model of allergic rhinitis in rats by topical sensitization and evaluation of H1-receptor antagonists[J]. *Immunopharmacology*, 2000, 48(1): 1-7.
- [54]王维刚, 刘震泽, 吴文婷, et al. 小鼠动物实验方法系列专题(七)旷场实验在小鼠行为分析中的应用[J]. *中国细胞生物学学报*, 2011, (11): 1191-1196.
- [55]Mandillo S, Tucci V, Holter S M, et al. Reliability, robustness, and reproducibility in mouse behavioral phenotyping: a cross-laboratory study[J]. *Physiol Genomics*, 2008, 34(3): 243-55.

- [56]Bouwknicht J A, Spiga F, Staub D R, et al. Differential effects of exposure to low-light or high-light open-field on anxiety-related behaviors: relationship to c-Fos expression in serotonergic and non-serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus[J]. *Brain Res Bull*, 2007, 72(1): 32-43.
- [57]Komada M, Takao K, Miyakawa T. Elevated Plus Maze for Mice[J]. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 2008, (22): 1088.
- [58]Samuels B A, Hen R. Novelty-Suppressed Feeding in the Mouse[M]. Humana Press, 2011: 107-121.
- [59]Trullas R, Jackson B, Skolnick P. Genetic differences in a tail suspension test for evaluating antidepressant activity[J]. *Psychopharmacology*, 1989, 99(2): 287-288.
- [60]Association A P. Diagnostic and statistical manual of mental disorders, (DSM-5®)[M]. American Psychiatric Pub, 2013.
- [61]Yang M, Crawley J N. Simple behavioral assessment of mouse olfaction[J]. *Curr Protoc Neurosci*, 2009, Chapter 8: Unit 8 24.
- [62]Lisk R D, Pretlow R A, 3rd, Friedman S M. Hormonal stimulation necessary for elicitation of maternal nest-building in the mouse (*Mus musculus*)[J]. *Anim Behav*, 1969, 17(4): 730-7.
- [63]Yan L, Li L, Han W, et al. Age-related neuropsychiatric symptoms in presenilins conditional double knockout mice[J]. *Brain Research Bulletin*, 2013, 97: 104-111.
- [64]El-Kordi A, Winkler D, Hammerschmidt K, et al. Development of an autism severity score for mice using *Nlgn4* null mutants as a construct-valid model of heritable monogenic autism[J]. *Behav Brain Res*, 2013, 251: 41-9.
- [65]Otabi H, Goto T, Okayama T, et al. Subchronic and mild social defeat stress alter mouse nest building behavior[J]. *Behav Processes*, 2016, 122: 21-5.
- [66]Baarendse P J, Van Grootheest G, Jansen R F, et al. Differential involvement of the dorsal hippocampus in passive avoidance in C57bl/6J and DBA/2J mice[J]. *Hippocampus*, 2008, 18(1): 11-9.
- [67]Curzon P, Rustay N R, Browman K E: *Frontiers in Neuroscience Cued and Contextual Fear Conditioning for Rodents*, Buccafusco J J, editor, *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*, Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis Taylor & Francis Group, LLC., 2009.
- [68]Anagnostaras S G, Gale G D, Fanselow M S. Hippocampus and contextual fear conditioning: recent controversies and advances[J]. *Hippocampus*, 2001, 11(1): 8-17.
- [69]Cadenhead K S, Carasso B S, Swerdlow N R, et al. Prepulse inhibition and habituation of the startle response are stable neurobiological measures in a normal male population[J]. *Biol Psychiatry*, 1999, 45(3): 360-4.
- [70]Valsamis B, Schmid S. Habituation and prepulse inhibition of acoustic startle in rodents[J]. *J Vis Exp*, 2011, (55): e3446.
- [71]Parwani A, Duncan E J, Bartlett E, et al. Impaired prepulse inhibition of acoustic startle in schizophrenia[J]. *Biological Psychiatry*, 2000, 47(7): 662-669.
- [72]Perry W, Minassian A, Feifel D, et al. Sensorimotor gating deficits in bipolar disorder patients with acute psychotic mania[J]. *Biological Psychiatry*, 2001, 50(6): 418-424.
- [73]Sakai K, Yokoyama A, Kohno N, et al. Effect of different sensitizing doses of antigen in a murine model of atopic asthma[J]. *Clin Exp Immunol*, 1999, 118(1): 9-15.
- [74]Karakaki M, Akiyama K, Mori N. Efficacy of intranasal steroid spray (mometasone furoate) on treatment of patients with seasonal allergic rhinitis: comparison with oral corticosteroids[J]. *Auris*

- Nasus Larynx, 2013, 40(3): 277-81.
- [75]Fureix C, Walker M, Harper L, et al. Stereotypic behaviour in standard non-enriched cages is an alternative to depression-like responses in C57BL/6 mice[J]. Behav Brain Res, 2016, 305: 186-90.
- [76]Thierry B, Steru L, Simon P, et al. The Tail Suspension Test - Ethical Considerations[J]. Psychopharmacology, 1986, 90(2): 284-285.
- [77]Can A, Dao D T, Terrillion C E, et al. The tail suspension test[J]. J Vis Exp, 2012, (59): e3769.
- [78]Bai F, Li X, Clay M, et al. Intra- and interstrain differences in models of “behavioral despair”[J]. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 2001, 70(2-3): 187-192.
- [79]Mombereau C, Kaupmann K, Froestl W, et al. Genetic and pharmacological evidence of a role for GABA(B) receptors in the modulation of anxiety- and antidepressant-like behavior[J]. Neuropsychopharmacology, 2004, 29(6): 1050-62.
- [80]Sansone R A, Sansone L A. Allergic rhinitis: relationships with anxiety and mood syndromes[J]. Innov Clin Neurosci, 2011, 8(7): 12-7.
- [81]Petrik M, Wong M, Tabata R, et al. Aluminum adjuvant linked to gulf war illness induces motor neuron death in mice[J]. NeuroMolecular Medicine, 2007, 9(1): 83-100.
- [82]Shaw C A, Petrik M S. Aluminum hydroxide injections lead to motor deficits and motor neuron degeneration[J]. Journal of inorganic biochemistry, 2009, 103(11): 1555.
- [83]Cannon C M, Palmiter R D. Reward without dopamine[J]. Journal of Neuroscience, 2003, 23(34): 10827-10831.
- [84]Powell T R, Fernandes C, Schalkwyk L C. Depression-Related Behavioral Tests[J], 2012.
- [85]Okayama T, Goto T, Toyoda A. Assessing nest-building behavior of mice using a 3D depth camera[J]. Journal of Neuroscience Methods, 2015, 251: 151-157.
- [86]Fendt M, Li L, Yeomans J S. Brain stem circuits mediating prepulse inhibition of the startle reflex[J]. Psychopharmacology (Berl), 2001, 156(2-3): 216-24.
- [87]Marvel C L, Paradiso S. Cognitive and neurological impairment in mood disorders[J]. The Psychiatric clinics of North America, 2004, 27(1): 19-viii.
- [88]Kaidanovich-Beilin O, Lipina T, Vukobradovic I, et al. Assessment of social interaction behaviors[J]. J Vis Exp, 2011, (48).
- [89]Silverman J L, Yang M, Lord C, et al. Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism[J]. Nat Rev Neurosci, 2010, 11(7): 490-502.
- [90]Cooke B, Hegstrom C D, Villeneuve L S, et al. Sexual differentiation of the vertebrate brain: principles and mechanisms[J]. Front Neuroendocrinol, 1998, 19(4): 323-62.
- [91]Richter K, Wolf G, Engelmann M. Social recognition memory requires two stages of protein synthesis in mice[J]. Learn Mem, 2005, 12(4): 407-13.
- [92]Lukas M, Toth I, Veenema A H, et al. Oxytocin mediates rodent social memory within the lateral septum and the medial amygdala depending on the relevance of the social stimulus: male juvenile versus female adult conspecifics[J]. Psychoneuroendocrinology, 2013, 38(6): 916-26.
- [93]Ferguson J N, Aldag J M, Insel T R, et al. Oxytocin in the Medial Amygdala is Essential for Social Recognition in the Mouse[J]. The Journal of Neuroscience, 2001, 21(20): 8278-8285.
- [94]Camats Perna J, Engelmann M. Recognizing Others: Rodent's Social Memories[J]. Curr Top Behav Neurosci, 2015.
- [95]Pawankar R, Holgate S T, Canonica G W, et al. The WAO White Book on Allergy (Update. 2013)[M]. 2013.

- [96]Raap U, Braunstahl G J. The role of neurotrophins in the pathophysiology of allergic rhinitis[J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2010, 10(1): 8-13.
- [97]Jin P, Andiappan A K, Quek J M, et al. A functional brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene variant increases the risk of moderate-to-severe allergic rhinitis[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2015, 135(6): 1486-93.e8.
- [98]Tripp A, Oh H, Guilloux J P, et al. Brain-derived neurotrophic factor signaling and subgenual anterior cingulate cortex dysfunction in major depressive disorder[J]. *Am J Psychiatry*, 2012, 169(11): 1194-202.
- [99]Yu H, Chen Z-Y. The role of BDNF in depression on the basis of its location in the neural circuitry[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2011, 32(1): 3-11.
- [100]Jiang C, Salton S R. The Role of Neurotrophins in Major Depressive Disorder[J]. *Transl Neurosci*, 2013, 4(1): 46-58.
- [101]Melvin T A, Nguyen M T, Lane A P, et al. Allergic rhinitis is associated with decreased expression of Toll-like receptor 9 by sinonasal epithelial cells[J]. *Int Forum Allergy Rhinol*, 2011, 1(3): 153-6.
- [102]Lauriello M, Micera A, Muzi P, et al. TLR4 and TLR9 Expression in Different Phenotypes of Rhinitis[J]. *Int J Otolaryngol*, 2012, 2012: 925164.
- [103]Rao J S, Harry G J, Rapoport S I, et al. Increased excitotoxicity and neuroinflammatory markers in postmortem frontal cortex from bipolar disorder patients[J]. *Mol Psychiatry*, 2010, 15(4): 384-92.
- [104]Irwin M R, Cole S W. Reciprocal regulation of the neural and innate immune systems[J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(9): 625-32.
- [105]Rosenkranz M A, Busse W W, Johnstone T, et al. Neural circuitry underlying the interaction between emotion and asthma symptom exacerbation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(37): 13319-13324.
- [106]Torres-Platas S G, Cruceanu C, Chen G G, et al. Evidence for increased microglial priming and macrophage recruitment in the dorsal anterior cingulate white matter of depressed suicides[J]. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2014, 42: 50-59.
- [107]Costa-Pinto F A, Basso A S, De S -Rocha L C, et al. Neural Correlates of IgE-Mediated Allergy[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2006, 1088(1): 116-131.
- [108]Ferguson A V, Latchford K J, Samson W K. The Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus A Potential Target for Integrative Treatment of Autonomic Dysfunction[J]. *Expert opinion on therapeutic targets*, 2008, 12(6): 717-727.
- [109]Veenema A H, Neumann I D. Central vasopressin and oxytocin release: regulation of complex social behaviours[J]. *Prog Brain Res*, 2008, 170: 261-76.
- [110]Heinrichs M, Von Dawans B, Domes G. Oxytocin, vasopressin, and human social behavior[J]. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 2009, 30(4): 548-557.
- [111]Modahl C, Green L A, Fein D, et al. Plasma oxytocin levels in autistic children[J]. *Biological Psychiatry*, 1998, 43(4): 270-277.
- [112]Meynen G, Unmehopa U A, Hofman M A, et al. Hypothalamic oxytocin mRNA expression and melancholic depression[J]. *Mol Psychiatry*, 2000, 12(2): 118-119.
- [113]Hsu D T, Kirouac G J, Zubieta J-K, et al. Contributions of the paraventricular thalamic nucleus in the regulation of stress, motivation, and mood[J]. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 2014, 8: 73.

- [114]Sheehan T P, Chambers R A, Russell D S. Regulation of affect by the lateral septum: implications for neuropsychiatry[J]. *Brain Research Reviews*, 2004, 46(1): 71-117.
- [115]Bredewold R, Schiavo J K, Van Der Hart M, et al. Dynamic changes in extracellular release of GABA and glutamate in the lateral septum during social play behavior in juvenile rats: Implications for sex-specific regulation of social play behavior[J]. *Neuroscience*, 2015, 307: 117-127.
- [116]Xiu J, Zhang Q, Zhou T, et al. Visualizing an emotional valence map in the limbic forebrain by TAI-FISH[J]. *Nat Neurosci*, 2014, 17(11): 1552-1559.
- [117]Huang Y-H, Cheng C-Y, Hong C-J, et al. Expression of c-Fos-like immunoreactivity in the brain of mice with learned helplessness[J]. *Neuroscience Letters*, 2004, 363(3): 280-283.
- [118]Kim Y, Perova Z, Mirrione M M, et al. Whole-Brain Mapping of Neuronal Activity in the Learned Helplessness Model of Depression[J]. *Frontiers in Neural Circuits*, 2016, 10: 3.
- [119]Singewald G M, Rjabokon A, Singewald N, et al. The Modulatory Role of the Lateral Septum on Neuroendocrine and Behavioral Stress Responses[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2011, 36(4): 793-804.
- [120]Porsolt R D, Brossard G, Hautbois C, et al. Rodent models of depression: forced swimming and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice[J]. *Curr Protoc Neurosci*, 2001, Chapter 8: Unit 8.10A.
- [121]Mitra A, Lenglos C, Timofeeva E. Inhibition in the lateral septum increases sucrose intake and decreases anorectic effects of stress[J]. *European Journal of Neuroscience*, 2015, 41(4): 420-433.
- [122]Walker F R, Beynon S B, Jones K A, et al. Dynamic structural remodelling of microglia in health and disease: a review of the models, the signals and the mechanisms[J]. *Brain Behav Immun*, 2014, 37: 1-14.
- [123]Hanisch U K, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain[J]. *Nat Neurosci*, 2007, 10(11): 1387-94.
- [124]Streit W J, Walter S A, Pennell N A. Reactive microgliosis[J]. *Prog Neurobiol*, 1999, 57(6): 563-81.
- [125]Walker F R, Beynon S B, Jones K A, et al. Dynamic structural remodelling of microglia in health and disease: A review of the models, the signals and the mechanisms[J]. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2014, 37: 1-14.
- [126]Stence N, Waite M, Dailey M E. Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices[J]. *Glia*, 2001, 33(3): 256-66.
- [127]Eyo U B, Dailey M E. Microglia: key elements in neural development, plasticity, and pathology[J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2013, 8(3): 494-509.
- [128]Franciosi S, Ryu J K, Shim Y, et al. Age-dependent neurovascular abnormalities and altered microglial morphology in the YAC128 mouse model of Huntington disease[J]. *Neurobiol Dis*, 2012, 45(1): 438-49.
- [129]Madore C, Joffre C, Delpech J C, et al. Early morphofunctional plasticity of microglia in response to acute lipopolysaccharide[J]. *Brain Behav Immun*, 2013, 34: 151-8.
- [130]Kobayashi K, Imagama S, Ohgomori T, et al. Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia[J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4: e525.
- [131]Hinwood M, Tynan R J, Charnley J L, et al. Chronic stress induced remodeling of the prefrontal cortex: structural re-organization of microglia and the inhibitory effect of

- minocycline[J]. *Cereb Cortex*, 2013, 23(8): 1784-97.
- [132]Wirjatijasa F, Dehghani F, Blaheta R A, et al. Interleukin-4, interleukin-10, and interleukin-1-receptor antagonist but not transforming growth factor-beta induce ramification and reduce adhesion molecule expression of rat microglial cells[J]. *J Neurosci Res*, 2002, 68(5): 579-87.
- [133]Chen C-H, Panizzon Matthew s, Eyler Lisa t, et al. Genetic Influences on Cortical Regionalization in the Human Brain[J]. *Neuron*, 2011, 72(4): 537-544.
- [134]O'leary D D M, Chou S-J, Sahara S. Area Patterning of the Mammalian Cortex[J]. *Neuron*, 2007, 56(2): 252-269.
- [135]Gu L, Xie J, Long J, et al. Epidemiology of Major Depressive Disorder in Mainland China: A Systematic Review[J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(6): e65356.
- [136]Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013[J]. *Lancet*, 2015, 386(9995): 743-800.
- [137]Ferrari A J, Charlson F J, Norman R E, et al. Burden of Depressive Disorders by Country, Sex, Age, and Year: Findings from the Global Burden of Disease Study 2010[J]. *PLoS Med*, 2013, 10(11): e1001547.
- [138]Rush A J, Trivedi M H, Wisniewski S R, et al. Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: a STAR*D report[J]. *Am J Psychiatry*, 2006, 163(11): 1905-17.
- [139]Iwata M, Ota K T, Duman R S. The inflammasome: pathways linking psychological stress, depression, and systemic illnesses[J]. *Brain Behav Immun*, 2013, 31: 105-14.
- [140]Steiner J, Biela H, Brisch R, et al. Immunological aspects in the neurobiology of suicide: elevated microglial density in schizophrenia and depression is associated with suicide[J]. *J Psychiatr Res*, 2008, 42(2): 151-7.
- [141]Torres-Platas S G, Cruceanu C, Chen G G, et al. Evidence for increased microglial priming and macrophage recruitment in the dorsal anterior cingulate white matter of depressed suicides[J]. *Brain Behav Immun*, 2014, 42: 50-9.
- [142]Nagy C, Suderman M, Yang J, et al. Astrocytic abnormalities and global DNA methylation patterns in depression and suicide[J]. *Mol Psychiatry*, 2015, 20(3): 320-8.
- [143]Setiawan E, Wilson A A, Mizrahi R, et al. Role of translocator protein density, a marker of neuroinflammation, in the brain during major depressive episodes[J]. *JAMA Psychiatry*, 2015, 72(3): 268-75.
- [144]Schatzberg A F, DeBattista C. Manual of clinical psychopharmacology[M]. American Psychiatric Pub, 2015.
- [145]Steiner J, Walter M, Gos T, et al. Severe depression is associated with increased microglial quinolinic acid in subregions of the anterior cingulate gyrus: evidence for an immune-modulated glutamatergic neurotransmission?[J]. *J Neuroinflammation*, 2011, 8: 94.
- [146]Tavares R G, Tasca C I, Santos C E, et al. Quinolinic acid stimulates synaptosomal glutamate release and inhibits glutamate uptake into astrocytes[J]. *Neurochem Int*, 2002, 40(7): 621-7.
- [147]Hardingham G E, Fukunaga Y, Bading H. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways[J]. *Nat Neurosci*, 2002, 5(5): 405-14.
- [148]Koo J W, Russo S J, Ferguson D, et al. Nuclear factor-kappaB is a critical mediator of stress-impaired neurogenesis and depressive behavior[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(6): 2669-

74.

- [149]Goshen I, Kreisel T, Ben-Menachem-Zidon O, et al. Brain interleukin-1 mediates chronic stress-induced depression in mice via adrenocortical activation and hippocampal neurogenesis suppression[J]. *Mol Psychiatry*, 2008, 13(7): 717-28.
- [150]Capuron L, Pagnoni G, Drake D F, et al. Dopaminergic mechanisms of reduced basal ganglia responses to hedonic reward during interferon alfa administration[J]. *Arch Gen Psychiatry*, 2012, 69(10): 1044-53.
- [151]Eisenberger N I, Berkman E T, Inagaki T K, et al. Inflammation-induced anhedonia: endotoxin reduces ventral striatum responses to reward[J]. *Biol Psychiatry*, 2010, 68(8): 748-54.
- [152]Felger J C, Mun J, Kimmel H L, et al. Chronic interferon-alpha decreases dopamine 2 receptor binding and striatal dopamine release in association with anhedonia-like behavior in nonhuman primates[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2013, 38(11): 2179-87.
- [153]Haroon E, Woolwine B J, Chen X, et al. IFN-alpha-induced cortical and subcortical glutamate changes assessed by magnetic resonance spectroscopy[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2014, 39(7): 1777-85.
- [154]Dowell N G, Cooper E A, Tibble J, et al. Acute Changes in Striatal Microstructure Predict the Development of Interferon-Alpha Induced Fatigue[J]. *Biol Psychiatry*, 2016, 79(4): 320-8.
- [155]Harrison N A, Voon V, Cercignani M, et al. A Neurocomputational Account of How Inflammation Enhances Sensitivity to Punishments Versus Rewards[J]. *Biol Psychiatry*, 2015.
- [156]Harrison N A, Brydon L, Walker C, et al. Inflammation causes mood changes through alterations in subgenual cingulate activity and mesolimbic connectivity[J]. *Biol Psychiatry*, 2009, 66(5): 407-14.
- [157]Felger J C, Li Z, Haroon E, et al. Inflammation is associated with decreased functional connectivity within corticostriatal reward circuitry in depression[J]. *Mol Psychiatry*, 2015.
- [158]Wise R A. Dopamine, learning and motivation[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2004, 5(6): 483-94.
- [159]Russo S J, Nestler E J. The brain reward circuitry in mood disorders[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2013, 14(9): 609-25.
- [160]Cools R, Nakamura K, Daw N D. Serotonin and dopamine: unifying affective, activational, and decision functions[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2011, 36(1): 98-113.
- [161]Hikosaka O. The habenula: from stress evasion to value-based decision-making[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2010, 11(7): 503-13.
- [162]Lecourtier L, Kelly P H. A conductor hidden in the orchestra? Role of the habenular complex in monoamine transmission and cognition[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2007, 31(5): 658-72.
- [163]Omelchenko N, Bell R, Sesack S R. Lateral habenula projections to dopamine and GABA neurons in the rat ventral tegmental area[J]. *Eur J Neurosci*, 2009, 30(7): 1239-50.
- [164]Herkenham M, Nauta W J. Efferent connections of the habenular nuclei in the rat[J]. *J Comp Neurol*, 1979, 187(1): 19-47.
- [165]Jhou T C, Fields H L, Baxter M G, et al. The rostromedial tegmental nucleus (RMTg), a GABAergic afferent to midbrain dopamine neurons, encodes aversive stimuli and inhibits motor responses[J]. *Neuron*, 2009, 61(5): 786-800.
- [166]Kaufling J, Veinante P, Pawlowski S A, et al. Afferents to the GABAergic tail of the ventral tegmental area in the rat[J]. *J Comp Neurol*, 2009, 513(6): 597-621.
- [167]Moore R Y, Halaris A E, Jones B E. Serotonin neurons of the midbrain raphe: ascending projections[J]. *J Comp Neurol*, 1978, 180(3): 417-38.

- [168]Reisine T D, Soubrie P, Ferron A, et al. Evidence for a dopaminergic innervation of the cat lateral habenula: its role in controlling serotonin transmission in the basal ganglia[J]. *Brain Res*, 1984, 308(2): 281-8.
- [169]Sartorius A, Kiening K L, Kirsch P, et al. Remission of major depression under deep brain stimulation of the lateral habenula in a therapy-refractory patient[J]. *Biol Psychiatry*, 2010, 67(2): e9-e11.
- [170]Lecca S, Meze F J, Mameli M. The lateral habenula in addiction and depression: an anatomical, synaptic and behavioral overview[J]. *Eur J Neurosci*, 2014, 39(7): 1170-8.
- [171]Dayan P, Huys Q J. Serotonin, inhibition, and negative mood[J]. *PLoS Comput Biol*, 2008, 4(2): e4.
- [172]Proulx C D, Hikosaka O, Malinow R. Reward processing by the lateral habenula in normal and depressive behaviors[J]. *Nature neuroscience*, 2014, 17(9): 1146-1152.
- [173]Morris J S, Smith K A, Cowen P J, et al. Covariation of activity in habenula and dorsal raphe nuclei following tryptophan depletion[J]. *Neuroimage*, 1999, 10(2): 163-72.
- [174]Shumake J, Edwards E, Gonzalez-Lima F. Opposite metabolic changes in the habenula and ventral tegmental area of a genetic model of helpless behavior[J]. *Brain Res*, 2003, 963(1-2): 274-81.
- [175]Yang L M, Hu B, Xia Y H, et al. Lateral habenula lesions improve the behavioral response in depressed rats via increasing the serotonin level in dorsal raphe nucleus[J]. *Behav Brain Res*, 2008, 188(1): 84-90.
- [176]Amat J, Sparks P D, Matus-Amat P, et al. The role of the habenular complex in the elevation of dorsal raphe nucleus serotonin and the changes in the behavioral responses produced by uncontrollable stress[J]. *Brain Res*, 2001, 917(1): 118-26.
- [177]Li B, Piriz J, Mirrione M, et al. Synaptic potentiation onto habenula neurons in the learned helplessness model of depression[J]. *Nature*, 2011, 470(7335): 535-9.
- [178]Lammel S, Lim B K, Ran C, et al. Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area[J]. *Nature*, 2012, 491(7423): 212-7.
- [179]Mizoguchi K, Yuzurihara M, Ishige A, et al. Chronic stress induces impairment of spatial working memory because of prefrontal dopaminergic dysfunction[J]. *J Neurosci*, 2000, 20(4): 1568-74.
- [180]Stamatakis A M, Stuber G D. Activation of lateral habenula inputs to the ventral midbrain promotes behavioral avoidance[J]. *Nat Neurosci*, 2012, 15(8): 1105-7.
- [181]Fiorillo C D, Tobler P N, Schultz W. Discrete coding of reward probability and uncertainty by dopamine neurons[J]. *Science*, 2003, 299(5614): 1898-902.
- [182]Li K, Zhou T, Liao L, et al. betaCaMKII in lateral habenula mediates core symptoms of depression[J]. *Science*, 2013, 341(6149): 1016-20.
- [183]Proulx C D, Hikosaka O, Malinow R. Reward processing by the lateral habenula in normal and depressive behaviors[J]. *Nat Neurosci*, 2014, 17(9): 1146-1152.
- [184]Shabel S J, Proulx C D, Piriz J, et al. GABA/glutamate co-release controls habenula output and is modified by antidepressant treatment[J]. *Science (New York, N.Y.)*, 2014, 345(6203): 1494-1498.

致谢

硕士三年如梭岁月，在梅兵老师的指导下我在神经生物领域内的科学素养得到了较为全面的训练。本毕业论文以及已发表的综述是在梅老师的细心指导下完成的。梅老师以其特有的人格魅力令我折服，她不仅指导了我在科学问题上的思考方式，还在生活中指引了我为人处世的方式，所谓“夫子循循善诱，博我以文，约我以礼”。依稀记得在进入硕士学习之前，我还仅仅是一个对神经生物学领域怀抱浓厚兴趣的学生，而经过三年的培训和指导，我已然掌握了该领域的基本知识和实验技能。三年了，我依旧记得踏入华东师大那一刻的心情；三年了，我依然还记得梅老师对我们进行的第一次谈话；而此刻我的内心纵有千言万语，也抵不过一句：谢谢！

同时还要感谢孟博老师，在她的帮助下，我顺利的完成了许多实验，得到较为全面的实验技能培训。感谢她对我课题设计、实验设计、结果分析等方面细心的指导，这让我迅速的掌握的许多有用的技能，以及在学习和生活方面提供的帮助。还要感谢高虹老师作为辅导员在生活和学习方面给予的帮助。

同时，感谢孟军老师在工作上的帮助，感谢张霖宇师姐、董浩师兄、吴楠师兄以及已毕业的吕佚晴师姐、张文君师姐和曹浩师兄在实验和生活上给予的帮助。感谢曹波师兄、王耀师兄在电生理方面的知识给予的帮助。感谢朱太林师弟、高伟师弟、陈婧师妹、谢双翼师弟、闫宇华师妹在实验上给予的协助，因为有他们的帮忙，才能让我更好的实施实验。

感谢我的室友刘文钊、吕明澈、冯永杰以及与我同级的程远、张海龙、王振、王欣鹤三年来在生活上的关照，因为有你们，三年的硕士生活才更加有意义。

感谢我在华师大认识的所有朋友，因为有你们，硕士生活才变得那么美好。

最后，我还要感谢我的父母，因为你们的支持，我才能更加坚定地去做自己想做的事情。

郭超

2016 年 4 月于华东师范大学