基础研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003689

屋尘螨诱导过敏性哮喘伴认知功能障碍小鼠模型的构建

付 强，柯义玲，贺桂琼，余华荣
（重庆医科大学神经科学研究中心，重庆 400016）

【摘 要】目的：旨在构建屋尘螨诱导过敏性哮喘伴认知功能障碍的小鼠模型。**方法：**以6～8周龄C57 BL/6小鼠为研究对象，采用屋尘螨（house dust mite，HDM）滴鼻诱导小鼠产生过敏性哮喘（HDM组），同时设立生理盐水对照组（normal saline control group，NS组）和空白对照组（blank control group，CN组），并分别在构建模型的2周和1个月，通过巴恩斯迷宫检测认知能力，乙酰-β-甲基氯化胆碱溶液雾化检测肺功能，苏木素-伊红（hematoxylin-eosin，HE）染色、免疫组化和免疫印迹检测肺和脑组织病理变化等对模型进行评估。**结果：**与2周CN组和NS组比较，HDM组小鼠增强呼吸间歇（enhanced pause，Penh）和支气管周围炎性细胞浸润差异无统计学意义；小鼠找到逃生箱的时间和次数差异无统计学意义；脑内神经元标志物成熟神经元相关神经元核（neuronal nuclei antigen，NeuN）和突触蛋白变化无明显差异；脑内未出现神经炎症。而与1个月CN组和NS组比较，HDM组小鼠Penh出现明显升高，支气管周围出现大量炎性细胞浸润；小鼠找到逃生箱的时间明显增加（F=19.600，P<0.001），找到逃生箱的次数明显减少（F=10.150，P=0.002）；小鼠脑内海马区NeuN阳性面积明显减少（F=6.449，P=0.012），突触蛋白明显减少（F=16.200，P=0.004）；出现小胶质细胞活化和神经炎症。**结论：**成功构建的屋尘螨诱导过敏性哮喘伴认知功能障碍小鼠模型，为研究过敏性哮喘引起认知功能障碍的机制探讨及药物干预研究提供了一种较好的动物模型。

【关键词】过敏性哮喘；认知功能障碍；屋尘螨；动物模型；小鼠
【中图分类号】R338 **【文献标志码】**A **【收稿日期】**2024-08-04

Construction of a mouse model of house dust mite-induced allergic asthma with cognitive impairment

Fu Qiang，*Ke Yiling*，*He Guiqiong*，*Yu Huarong*
（*Center for Neuroscience Research*，*Chongqing Medical University*）

【Abstract】*Objective*：To construct a mouse model of house dust mite（HDM）-induced allergic asthma with cognitive impairment. ***Methods*：**C57 BL/6 mice aged 6-8 weeks were used as the study subjects. HDMs were used intranasally to induce allergic asthma in mice（HDM group）. Simultaneously，a normal saline control group（NS group）and a blank control group（CN group）were established. At week 2 and month 1 of model construction，cognitive ability was tested using Barnes maze；pulmonary function was determined by nebulization with acetyl-β-methylcholine chloride solution，and pathological changes in lung and brain tissues were evaluated using hematoxylin-eosin staining，immunohistochemistry，and Western blotting. ***Results*：**At week 2，there were no significant differences in the enhanced pause（Penh），inflammatory cell infiltration around the bronchi，time and frequency of mice finding escape boxes，and changes in mature neuronal marker neuronal nuclei antigen（NeuN）and synaptophysin in the brain in the HDM group compared with the CN and NS groups；no neuroinflammation occurred in the brain. At month 1，compared with the CN and NS groups，the HDM group showed a significant increase in Penh and a large amount of inflammatory cell infiltration around the bronchi；the time of mice finding escape boxes significantly increased（F=19.600，P<0.001），and the frequency significantly decreased（F=10.150，P=0.002）；the NeuN-positive area in the hippocampus of mice significantly decreased（F=6.449，P=0.012），and synaptophysin was significantly reduced（F=16.200，P=0.004）；activation of microglial cells and neuroinflammation occurred. ***Conclusion*：**This study successfully constructed a mouse model of HDM-induced allergic asthma with cognitive impairment，providing a good animal model for exploring the mechanism of cognitive impairment caused by allergic asthma and drug intervention research.

【Key words】allergic asthma；cognitive impairment；house dust mite；animal model；mouse

作者介绍：付 强，Email：2021110001@stu.cqmu.edu.cn，研究方向：认知功能障碍疾病的病理机制。
通信作者：余华荣，Email：yuhuarong@cqmu.edu.cn。
优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20250102.1545.005（2025-01-03）

过敏性哮喘是儿童时期最常见的呼吸系统疾病，全球约有10%的儿童患有过敏性哮喘的风险[1]。吸入性过敏原（尘螨、花粉、真菌、毛发和皮屑等）是引起过敏性哮喘最主要的一类过敏原，其中屋尘螨（house dust mite，HDM）是最主要的吸入性过敏原[2-3]。在针对儿童的过敏原检测中，儿童过敏性哮喘患者的HDM阳性率超过85%[4-5]。在患有过敏性哮喘的儿童中，疲倦、易激惹和注意力不集中是过敏性哮喘控制不佳的典型症状[6]。流行病学调查表明，过敏性哮喘患者出现轻度认知障碍的风险增加了78%[7]。认知功能障碍泛指各种程度的记忆、执行功能、注意力、语言和视觉空间技能等认知功能减退，是正常认知状态与痴呆的中间阶段，转化为痴呆的风险增加，给患者家庭带来巨大的生活和经济压力[8]。对于过敏性哮喘通过什么机制导致认知功能障碍，目前仍不清楚，因此急需进行研究，为预防和治疗过敏性哮喘引起的认知功能障碍提供依据。动物模型有助于帮助研究过敏性哮喘诱发认知功能障碍的机制，寻找药物干预的靶点。但是在目前的研究中并没有相关的模型可供参考，因此，建立具有认知功能障碍的过敏性哮喘模型至关重要。

1 材料与方法

1.1 实验动物

6～8周龄SPF级C57 BL/6小鼠购于本校实验动物中心，饲养于本校实验动物中心，饲养温度20~24 ℃，每日光照/黑暗时间12 h/12 h，动物可自由进食和饮水。动物实验研究方案已获得本校实验动物管理和使用委员会批准（批准编号：IACUC-CQMU-2024-0488）。

1.2 主要试剂和仪器

HDM购于美国Greer Labs；乙酰-β-甲基氯化胆碱购于美国Sigma；免疫组化染色试剂盒购于美国BOSTER；苏木素-伊红（hematoxylin-eosin，HE）染色试剂盒购于中国索莱宝；十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresi，SDS-PAGE）凝胶快速制备试剂盒购于中国雅酶；RIPA蛋白裂解液、苯甲基磺酰氟（phenylmethanesulfonyl fluoride，PMSF）、二喹啉甲酸（bicinchoninic acid，BCA）蛋白浓度测定试剂盒和5×蛋白上样缓冲液购于中国碧云天；兔抗嗜酸性粒细胞阳离子蛋白（eosinophil cationic protein，ECP）多克隆抗体购于中国博奥森；兔抗突触蛋白多克隆抗体、兔抗成熟神经元相关神经元核（neuronal nuclei antigen，NeuN）多克隆抗体、兔抗白细胞介素-1β（Interleukin 1β，IL-1β）、兔抗肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor α，TNFα）、兔抗诱导型一氧化氮合酶（inducible nitric oxide synthase，iNOS）、兔抗离子钙结合衔接分子1（ionized calcium binding adaptor molecule 1，IBA-1）兔抗β-微管蛋白（β-tublin）多克隆抗体均购于中国proteintech；肺功能仪购于美国Buxco；巴恩斯迷宫和SMART 3.0视频跟踪系统购于中国瑞沃德；正置荧光显微镜购于德国Leica。

1.3 方法

1.3.1 过敏性哮喘伴认知功能障碍小鼠模型的构建 小鼠分为空白对照组（blank control group，CN组）、生理盐水组（normal saline control group，NS组）和过敏性哮喘组（HDM组），每组12只。使用HDM溶液滴鼻构建过敏性哮喘小鼠模型。在第1天和第14天分别进行1次滴鼻，在第21天至第30天，每周进行2次滴鼻。HDM组每次给予0.67 μg/30 μL HDM溶液滴鼻，CN组不进行药物处理，NS组每次给与30 μL生理盐水滴鼻。分别在构建模型的2周和1个月进行肺功能、巴恩斯迷宫行为学检测、肺和脑组织病理学检测。

1.3.2 肺功能检测 增强呼吸间歇（enhanced pause，Penh）被广泛用于过敏性哮喘小鼠肺功能的评价。在末次滴鼻后24 h内测定小鼠肺功能。将小鼠置于体积描记箱中，记录基线值。使用浓度为0 mg/mL的乙酰-β-甲基氯化胆碱溶液雾化3 min。然后记录5 min呼吸状态数据。重复以上步骤，依次测量雾化浓度为3.125、6.250、12.500、25.000、50.000 mg/mL的呼吸状态数据。

1.3.3 行为学检测 使用巴恩斯迷宫检测造模后小鼠的学习记忆能力。实验装置距离地面90 cm，由直径122 cm的圆盘和20个直径5 cm的圆孔组成，其中1个圆孔下放置逃生箱，其余圆孔由挡板遮挡。实验持续7 d，第1天，将小鼠放置在逃生箱中1 min，然后将小鼠放置在迷宫中央，使其自由地在迷宫中寻找逃生箱的位置。同时使用SMART 3.0视频跟踪系统记录小鼠运动情况300 s。第2～6天为学习期，保持逃生箱的位置不变，将小鼠由迷宫中央放入，并记录小鼠找到逃生箱的时间。第7天为测试期，撤除逃生箱和挡板，将小鼠放置在迷宫中央，使其自由活动300 s，并记录首次找到逃生箱所在位置的时间和次数。

1.3.4 组织样本制备 使用0.5%戊巴比妥钠麻醉小鼠，打开胸腔暴露心脏，由心尖灌注4 ℃预冷的生理盐水直至肝脏变白，随后断头取脑，在冰上将左右半脑分离，分别放入4%多聚甲醛固定和-80 ℃冰箱保存。同时摘取双侧肺组织分别放入4%多聚甲醛固定和-80 ℃冰箱保存。固定后的脑组织和肺组织经75%，85%，95%，100%梯度乙醇脱水，二甲苯透明后进行石蜡包埋，进行冠状位切片，厚度4 μm。

1.3.5 Western blot 取出-80 ℃保存的组织，称重后按照每10 mg组织加入100 μL裂解液（RIPA∶PMSF=100∶1），使用匀浆器充分研磨，冰上裂解30 min后，4 ℃ 12 000 r/min离心30 min，取上清液；使用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度，并将提取的组织蛋白溶液浓度配平。按照蛋白∶蛋白上样缓冲液=1∶4的比例加入5×蛋白上样缓冲液，95 ℃金属浴10 min使蛋白变性。

按照SDS-PAGE凝胶快速制备试剂盒说明书配置凝胶。电泳完成后，将凝胶与充分浸泡后的硝酸纤维素膜紧密贴合使用半干转膜仪进行电转。转膜完成后将膜放入5%脱脂牛奶中室温封闭2 h，使用兔抗ECP多克隆抗体、兔抗Synap-

tophysin多克隆抗体、兔抗IL-1β多克隆抗体、兔抗TNFα多克隆抗体、兔抗iNOS多克隆抗体、兔抗IBA-1多克隆抗体和兔抗β-tublin内参抗体4 ℃孵育过夜。次日使用含吐温-20的磷酸盐缓冲液（phosphate buffered saline with tween-20，PBST）将条带清洗3次，放入二抗中室温孵育1 h；PBST清洗3次后进行显影，采集图片用于后续分析。

1.3.6 形态学染色 HE染色：常规脱蜡水化，65 ℃烤片1 h，使用二甲苯Ⅰ、二甲苯Ⅱ脱蜡15 min，使用100%、95%、85%、75%、ddH_2O各5 min梯度水化。使用HE染色试剂盒进行染色，苏木素染色2 min，ddH_2O洗去浮色；分化液分化30 s，自来水浸洗；置于伊红染色30 s，ddH_2O洗去多余染液。随后进行脱水、透明、封片：依次经75%、85%、95%、100%乙醇Ⅰ各浸洗2 s；100%乙醇Ⅱ浸洗1 min，二甲苯透明两次，每次1 min，中性树胶封片。免疫组化染色：常规脱蜡水化，将切片放入柠檬酸钠抗原修复液，加热至95 ℃，维持15 min；冷却至室温后，磷酸盐缓冲液（phosphate buffered saline，PBS）浸洗3次；使用免疫组化染色试剂盒进行染色，加入3% H_2O_2覆盖组织，室温孵育15 min，PBS浸洗3次；加入免疫染色封闭液，37 ℃孵育30 min后加入一抗4 ℃过夜；次日取出切片复温至室温，PBS浸洗3次；加入二抗，37 ℃孵育30 min，PBS浸洗3次；加入SABC染色液 37 ℃孵育30 min，PBS浸洗3次；滴加DAB显色液，镜下观察显色后使用ddH_2O冲洗；苏木素复染2 min，自来水洗去浮色；随后进行脱水、透明、封片。

1.4 统计学方法

采用GraphPad Prism 9.0统计软件进行分析，计量资料以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，2组之间的比较采用t检验，多组间比较采用方差分析，检验水准α=0.05。

2 结 果

2.1 过敏性哮喘的验证

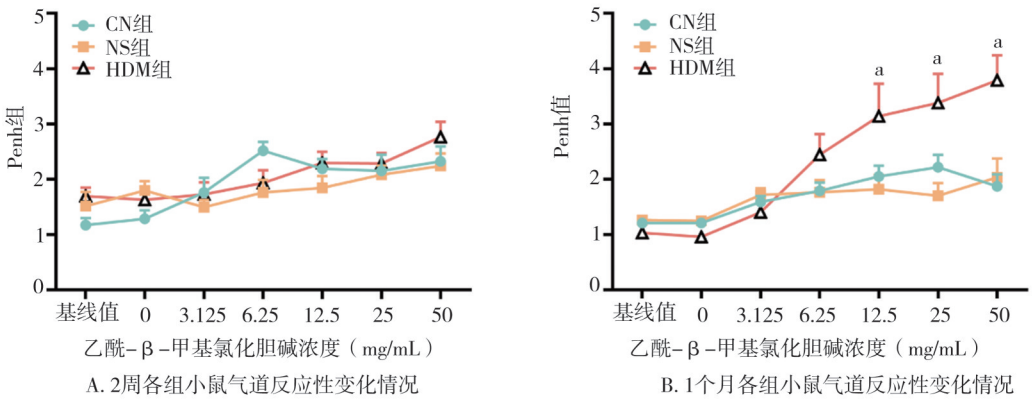
气道高反应性是过敏性哮喘患者呼吸功能改变的重要特征，通过不同浓度的乙酰-β-甲基氯化胆碱雾化激发，检测小鼠Penh值的变化以反应呼吸功能的改变，评价气道高反应性。与2周CN组和2周NS组相比，2周HDM组小鼠的Penh值未表现出明显的差异（图1A）。与1个月CN组和1个月NS组相比，1个月HDM组小鼠Penh值出现增加，差异有统计学意义（F=13.280，P<0.001）（图1B）。这说明1个月HDM组小鼠出现了气道高反应性。

过敏性哮喘是呼吸道的炎症性疾病，因此对各组小鼠肺组织切片进行HE染色以观察肺部的炎症变化。2周各组小鼠支气管及肺泡结构正常，气道黏膜上皮完整，2周CN组和2周NS组小鼠气道周围基本未观察到炎性细胞浸润，2周HDM组小鼠支气管周围观察到少量炎性细胞浸润（图2A）。1个月CN组和1个月NS组小鼠支气管及肺泡结构正常，支气管黏膜上皮完整，支气管周围基本未观察到炎性细胞浸润，1个月HDM组小鼠支气管黏膜出现脱落，支气管腔不规则，支气管周围观察到较多炎性细胞浸润（图2B）。

嗜酸性粒细胞是过敏反应中极为重要和特异的反应细胞，嗜酸性粒细胞增加是过敏性哮喘的肺部典型改变，使用嗜酸性粒细胞标志物ECP对各组小鼠肺组织进行Western blot检测，评估各组小鼠肺组织嗜酸性粒细胞表达情况。与2周CN和2周NS组小鼠相比，2周HDM组小鼠肺组织嗜酸性粒细胞增加，差异有统计学意义（F=18.720，P=0.003）（图3A、3B）。与1个月CN和1个月NS组小鼠相比，1个月HDM组小鼠肺组织嗜酸性粒细胞增加，差异具有统计学意义（F=8.156，P=0.019）（图3A、3B）。这进一步说明HDM组小鼠肺内嗜酸性粒细胞增加，其哮喘表型是过敏性哮喘。

2.2 小鼠学习记忆能力的变化

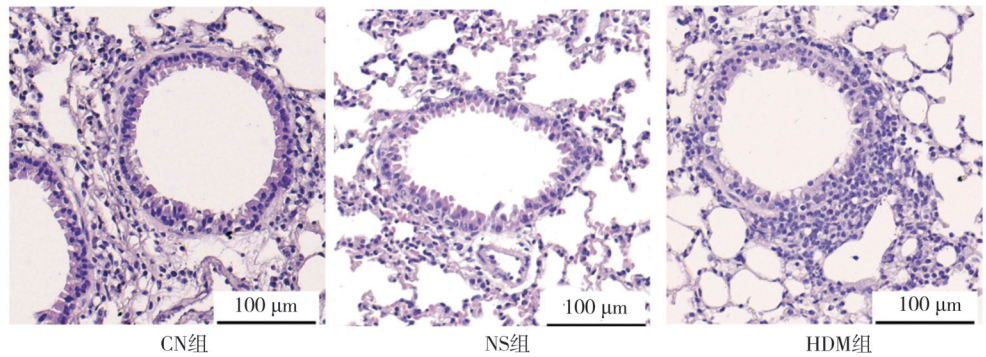
使用巴恩斯迷宫检测小鼠的学习记忆能力。与2周CN组和2周NS组小鼠相比，2周HDM组小鼠在第2~6天的学习期找到逃生箱的时间未出现明显差异；在第7天的测试期找到逃生箱的时间和次数未出现明显差异（图4A、4C、4D）。与1个月CN组和1个月NS组小鼠相比，在第2~6天的学习期，1个月HDM组小鼠找到逃生箱的时间增加，差异有统计学意义（F=9.818，P=0.002）；在第7天的测试期，与1个月CN组和1个月NS组小鼠相比，1个月HDM组小鼠首次找到逃生箱的时间增加，差异有统计学意义（F=19.600，P<0.001），找到逃生箱的次数减少，差异有统计学意义（F=10.150，P=



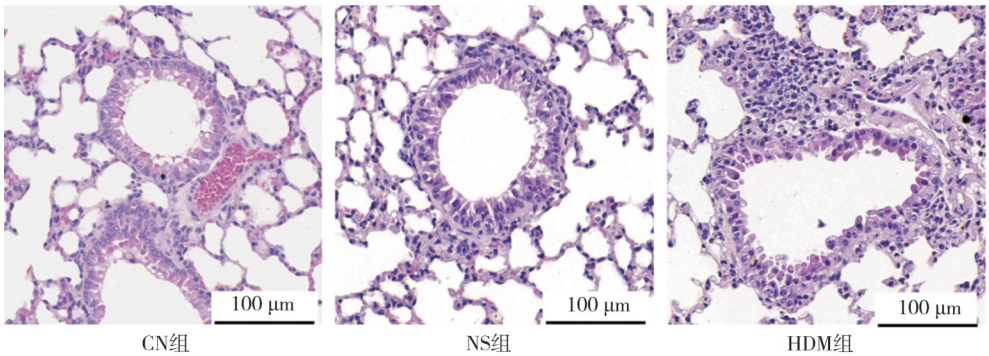
A. 2周各组小鼠气道反应性变化情况　　B. 1个月各组小鼠气道反应性变化情况

注：a，与CN和NS组比较，P<0.01

图1 各组小鼠肺功能检测（n=6，$\bar{x}\pm s$）

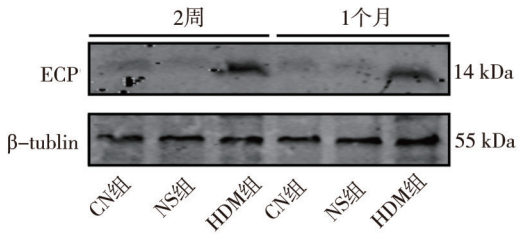


A. 2周各组小鼠肺组织HE染色（比例尺=100 μm）

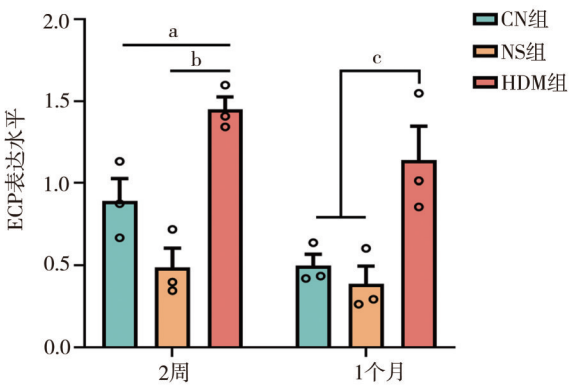


B. 1个月各组小鼠肺组织HE染色（比例尺=100 μm）

图2　各组小鼠肺组织HE染色（n=5）



A. 各组肺组织ECP蛋白表达



B. 各组肺组织ECP蛋白相对表达量

注：a，与2周CN组比较，P<0.05；b，与2周NS组比较，P<0.01；c，与1个月CN组、NS组比较，P<0.05

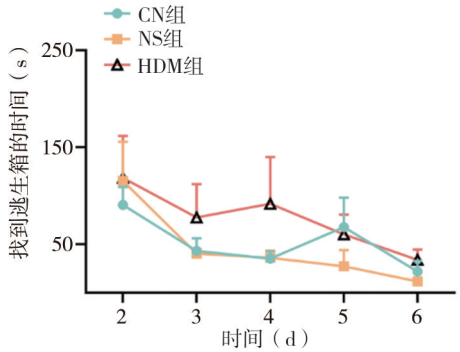
图3　小鼠肺组织嗜酸性粒细胞表达情况（n=3，$\bar{x}\pm s$）

0.002）（图4B、4C、4D）；与2周HDM组相比，1个月HDM组小鼠在测试期找到逃生箱的时间增加（t=3.102，P=0.011），找到逃生箱的次数减少（t=3.435，P=0.006），差异有统计学意义（图4C、4D）。

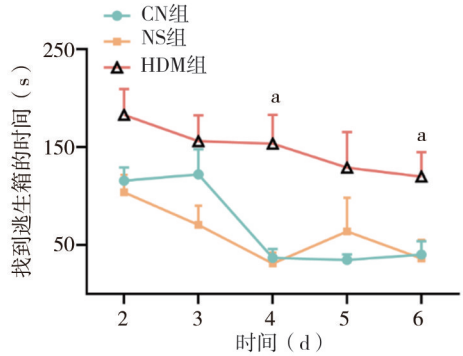
2.3　小鼠脑内神经元和突触的检测

使用神经元标志物NeuN对脑组织进行免疫组化染色，分析海马区阳性面积百分比，与2周CN组（12.850±1.002）%和2周NS组（12.560±0.815）%小鼠相比，2周HDM组（11.610±1.026）%小鼠海马区NeuN阳性表达未出现明显改变（F=0.465，P=0.639）（图5A）。与1个月CN组（12.500±0.762）%和1个月NS组（13.140±0.898）%小鼠相比，1个月HDM组（9.670±0.445）%小鼠脑组织海马区NeuN阳性表达减少，差异有统计学意义（F=6.449，P=0.012）（图5B）。

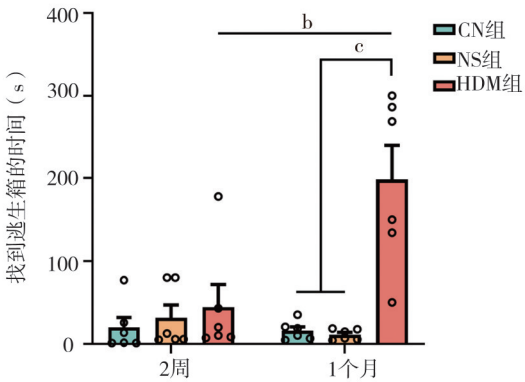
突触蛋白是突触膜结构的组成成分，其改变可以反映突触数量的变化。对小鼠脑组织进行Western blot检测突触蛋白的表达情况，与2周CN组和2周NS组小鼠相比，2周HDM组小鼠脑内突触蛋白的表达无明显改变；与1个月CN和1个月NS组小鼠相比，1个月HDM组小鼠脑组织突触蛋白的表达减少，差异有统计学意义（F=16.200，P=0.004），同时，1个月HDM组小鼠脑内突触蛋白相较于2周HDM组小鼠减少，差异有统计学意义（t=3.255，P=0.031）（图6A、6B）。



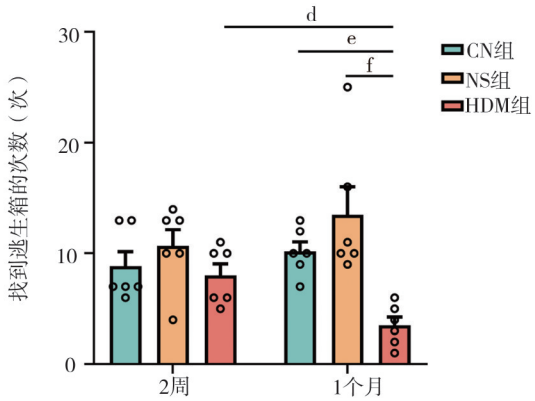
A. 2周各组小鼠学习期找到逃生箱的时间



B. 1个月各组小鼠学习期找到逃生箱的时间



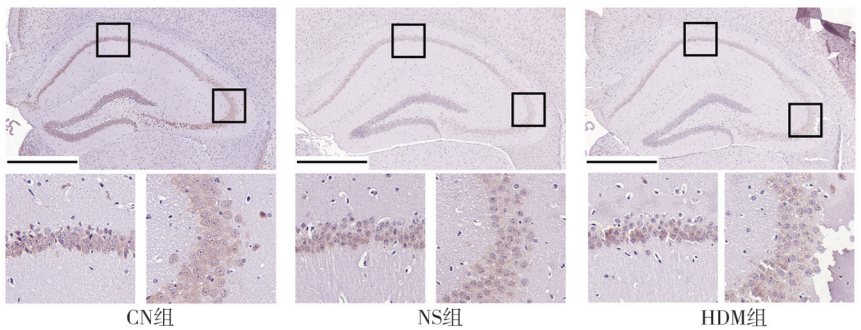
C. 各组小鼠测试期找到逃生箱的时间

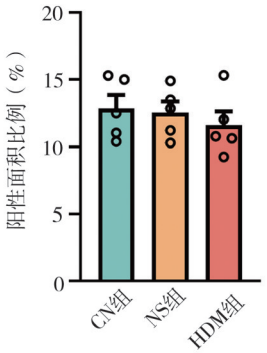


D. 各组小鼠测试期找到逃生箱的次数

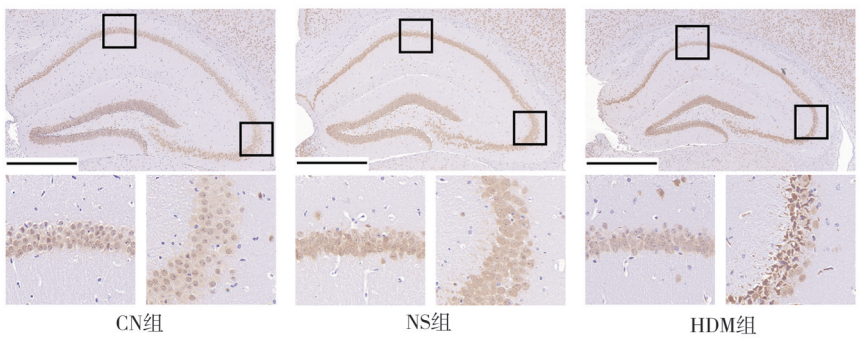
注：a，与1个月CN和1个月NS组比较，$P<0.05$；b，与2周HDM组比较，$P<0.05$；c，与1个月CN和1个月NS组比较，$P<0.001$；d，与2周HDM组比较，$P<0.01$；e，与1个月CN组比较，$P<0.05$；f，与1个月NS组比较，$P<0.001$

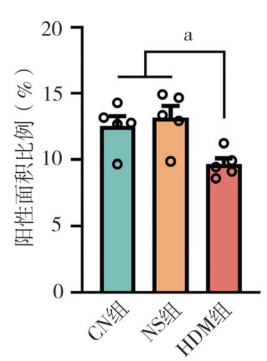
图4　巴恩斯迷宫检测（$n=6, \bar{x} \pm s$）





A. 免疫组化染色检测2周各组小鼠脑组织海马区神经元（比例尺=500 μm）





B. 免疫组化染色检测1个月各组小鼠脑组织海马区神经元（比例尺=500 μm）

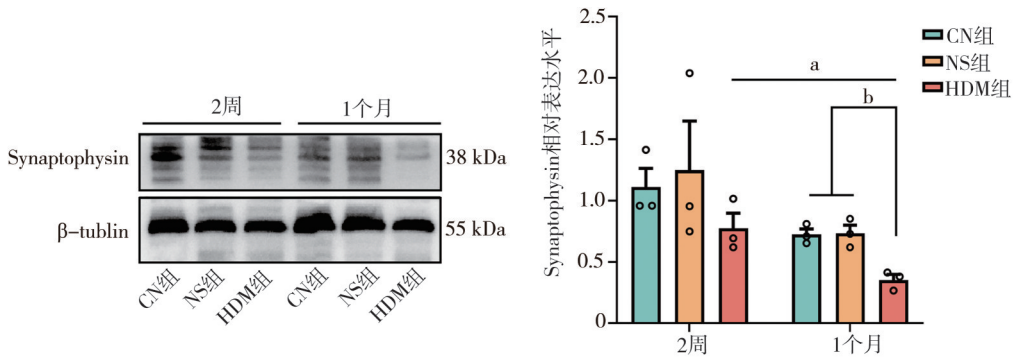
注：a，与1个月CN和1个月NS组比较，$P<0.05$

图5　各组小鼠海马区NeuN表达情况（$n=5, \bar{x} \pm s$）

2.4　小鼠脑内神经炎症的检测

持续的神经炎症是导致神经元和突触功能异常的重要因素，炎性细胞因子IL-1β和TNFα的改变反应神经炎症的程度，对小鼠脑组织进行Western blot检测IL-1β和TNFα的表达情况，与2周CN组和2周NS组小鼠相比，2周HDM组小鼠脑内IL-1β和TNFα的表达无明显改变；与1个月CN和1个月NS组小鼠相比，1个月HDM组小鼠脑组织IL-1β（F=11.770，P=0.008）和TNFα（F=8.208，P=0.089）的表达增加，差异有统计学意义（图7A、7B、7C）。

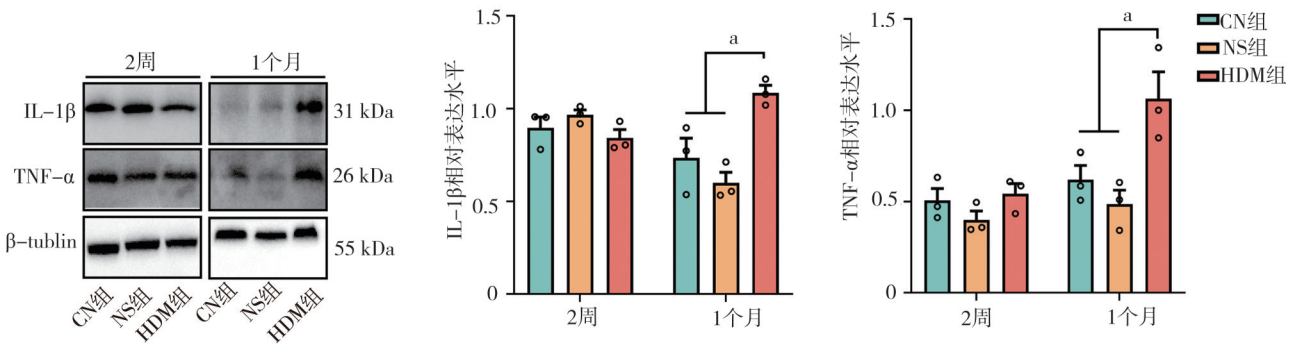
小胶质细胞是脑组织中的常驻免疫细胞，小胶质细胞活化和数量增加也是神经炎症的重要表现。本研究对小鼠脑组织进行Western blot检测小胶质细胞标志物IBA-1和活化小胶质细胞标志物iNOS，发现与2周CN组和2周NS组小鼠相比，2周HDM组小鼠脑内iNOS和IBA-1的表达无明显改变；与1个月CN和1个月NS组小鼠相比，1个月HDM组小鼠脑组织iNOS（F=5.899，P=0.038）和IBA-1（F=27.830，P=0.001）的表达增加，差异有统计学意义（图8A、8B、8C）。



A. 各组脑组织突触蛋白表达　　B. 各组脑组织突触蛋白相对表达量

注：a，与2周HDM组比较，P<0.05；b，与1个月CN组和NS组比较，P<0.01

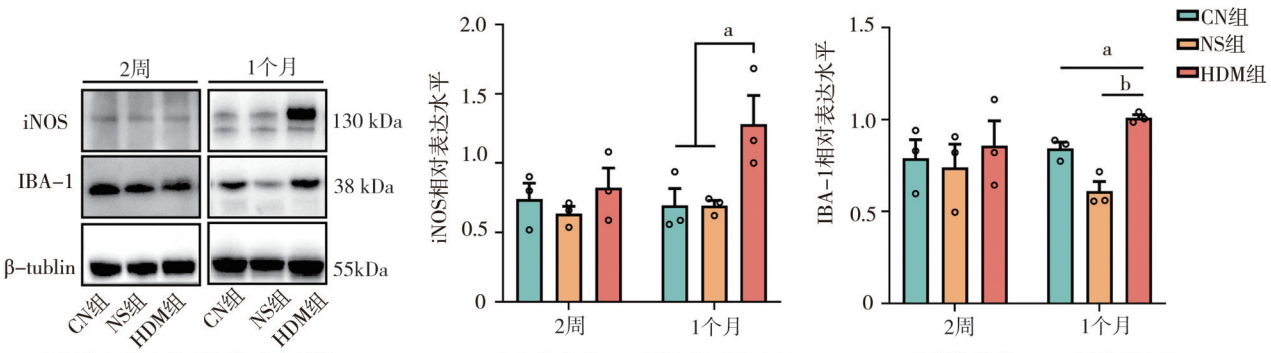
图6　小鼠脑内突触蛋白表达情况（n=3，$\bar{x}\pm s$）



A. 各组脑组织小胶质细胞改变情况　　B. 各组脑组织IL-1β蛋白相对表达量　　C. 各组脑组织TNF-α相对表达量

注：a，与1个月CN和NS组比较，P<0.05

图7　小鼠脑内炎性细胞因子表达情况（n=3，$\bar{x}\pm s$）



A. 各组脑组织小胶质细胞改变情况　　B. 各组脑组织iNOS蛋白相对表达量　　C. 各组脑组织IBA-1相对表达量

注：a，与1个月CN组和NS组比较，P<0.05；b，与1个月NS组比较，P<0.01

图8　小鼠脑内小胶质细胞表达情况（n=3，$\bar{x}\pm s$）

3 讨 论

过敏性哮喘是一种在儿童中常见的呼吸道疾病，病因和发病机制十分复杂，通常认为是遗传因素和环境因素复杂的相互作用引起的。相关研究表明，HDM是儿童过敏性哮喘最常见的过敏原[4-5]。过去的研究中常用卵清蛋白（ovalbumins，OVA）诱导C57小鼠、Balb/c小鼠、豚鼠或大鼠过敏，OVA被认为可以诱导较为纯粹的2型免疫反应[9]，也有研究者使用基因敲除鼠对某些特定靶点进行研究[10-11]，但是OVA作为食物过敏原，在呼吸道过敏性疾病中并不常见，基因敲除小鼠则更适用于研究某个基因在过敏性哮喘发病机制中的作用。使用OVA致敏或者基因敲除小鼠并不能很好地契合临床上过敏性哮喘复杂的病因及发病机制，因此越来越多的研究开始使用尘螨、花粉等常见的环境过敏原来诱导过敏性哮喘[12-14]。此外，在不同的研究中对于过敏原干预的剂量和周期也有一定差异[12,15]。因此，本研究在查阅文献的基础上，经过反复试验，最终确定使用HDM在C57 BL/6小鼠上建立过敏性哮喘模型，使用HDM溶液进行滴鼻，模拟气道吸入过敏原的过程，并调整了给药频率和剂量，使模型更好地符合反复多次接触过敏原的临床特点。国内外研究中通常使用肺功能检测不同浓度的乙酰-β-甲基氯化胆碱雾化激发时的Penh值来反映气道高反应性，并结合气道周围炎性细胞浸润情况，血清IgE、细胞因子、肺泡灌洗液和肺组织嗜酸性粒细胞的变化来确定哮喘的过敏表型[12,15-16]。基于嗜酸性粒细胞是过敏反应经典的免疫细胞，也是临床诊断指南中将过敏性哮喘区分于其他类型哮喘的重要指标，因此本研究选用了肺组织嗜酸性粒细胞检测来确定过敏性哮喘。结果表明，2周HDM组小鼠肺内嗜酸性粒细胞增加，但并未出现气道高反应性，其过敏性哮喘的表现不典型，而1个月HDM组小鼠肺内出现大量嗜酸性粒细胞，出现气道高反应性，符合典型的过敏性哮喘的改变。

巴恩斯迷宫是用于评估小鼠学习记忆能力的经典实验，常用于认知功能相关研究[17]，与莫里斯水迷宫不同的是，巴恩斯迷宫实验是在陆地平台上进行，对小鼠的体力需求较小，减小了过敏性哮喘模型建立后由于体力下降及水温刺激对过敏性哮喘模型小鼠运动能力的影响带来的实验误差。因此，在模型建立之后，本研究使用了巴恩斯迷宫评估小鼠认知功能。为了确定过敏性哮喘小鼠出现认知功能障碍的时间，本研究在2周和1个月2个时间点进行认知功能评估，发现2周HDM组小鼠的学习记忆能力并没有出现明显改变，而1个月HDM组小鼠学习记忆能力降低，出现认知功能障碍。

大脑神经元的数量和功能是执行认知功能，反映学习记忆能力的基础，海马是大脑中执行学习和记忆功能的重要区域。神经元和突触的改变对认知功能极其重要。在最严重的认知功能障碍疾病阿尔茨海默病中，神经元凋亡便是其特征病理改变之一[18-19]。突触是神经元之间信息传递的关键结构，学习过程和记忆的形成涉及突触可塑性的增强，表现为突触数量的增加和功能的增强[20]。本研究对小鼠脑组织的神经元标志物NeuN和突触膜结构组分突触蛋白进行检测，发现在2周HDM组小鼠海马区的NeuN阳性表达和大脑突触蛋白未出现明显改变，而1个月HDM组小鼠海马区的NeuN阳性表达和大脑突触蛋白减少，说明过敏性哮喘小鼠脑内海马区神经元和突触数量减少，突触可塑性降低，这与巴恩斯迷宫检测的结果相符，也与认知功能障碍相关文献报道一致[21-22]。

认知功能障碍的潜在病理机制是多因素且高度复杂的，越来越多的证据表明，氧化应激、线粒体功能障碍和神经炎症引起的大脑代谢改变在认知功能障碍的病理生理中起重要作用[23-24]。小胶质细胞是脑内的常驻免疫细胞，负责对中枢神经系统中有害物质的清除，在早期神经发育中也具有突触修剪的功能[25]。过度激活的小胶质细胞其吞噬能力和释放炎症介质的能力增强，导致突触异常修剪，神经元功能障碍甚至死亡[26-27]。本研究发现，使用HDM对小鼠进行干预2周，此时模型组小鼠的过敏性哮喘症状还不典型，其认知功能、大脑神经元和突触未出现明显的损伤，也未出现炎性细胞因子增加和小胶质细胞活化等神经炎症的改变。而对小鼠进行1个月的干预后，模型组小鼠出现典型的过敏性哮喘改变，认知功能、大脑神经元和突触出现明显的损伤，同时，过敏性哮喘小鼠脑内出现的明显的神经炎症。这种协同性的改变提示我们神经炎症在过敏性哮喘导致的认知功能障碍中可能具有重要作用。既往的观点认为，血脑屏障的存在，中枢神经系统与外周环境是相对隔绝的，然而，有研究发现，持续存在的外周炎症导致血脑屏障紧密连接蛋白减少，通透性增加，循环的炎症介质进入中枢神经系统，导致神经炎症的发生[28]。过敏性哮喘炎症反应并不局限于肺部，而是全身性的改变[29]。因此，过敏性哮喘很可能通过类似的机制导致神经炎症，进而导致认知功能障碍。

综上所述，本研究在C57 BL/6小鼠上使用HDM

溶液滴鼻干预1个月，成功构建了具有认知功能障碍的过敏性哮喘模型，这个模型同时具有脑内神经元数量和突触可塑性的改变，有望在动物水平为过敏性哮喘诱发认知功能障碍的研究提供新的方法。同时，本课题组发现神经炎症在过敏性哮喘导致的认知功能障碍中具有重要作用，这也为探究过敏性哮喘导致的认知功能障碍的机制和临床治疗提供了新的思路。

参 考 文 献

[1] Mori F, Barni S, Saretta F, et al. Epidemiology of rare allergic diseases in children[J]. Pediatric Allergy Immunology, 2020, 31(Suppl 26): S39-S42.

[2] Lim FL, Hashim Z, Than LT, et al. Asthma, airway symptoms and rhinitis in office workers in Malaysia: associations with house dust mite (HDM) allergy, cat allergy and levels of house dust mite allergens in office dust[J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0124905.

[3] Liao CX, Huang DM, Hu HS, et al. Analysis of serum allergen-specific IgE in children with respiratory allergic disease in Guangdong [J]. Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi, 2021, 55(5): 613-619.

[4] Zhang CQ, Li J, Lai XX, et al. House dust mite and storage mite IgE reactivity in allergic patients from Guangzhou, China[J]. Asian Pac J Allergy Immunol, 2012, 30(4): 294-300.

[5] Leung R, Ho P, Lam CW, et al. Sensitization to inhaled allergens as a risk factor for asthma and allergic diseases in Chinese population [J]. J Allergy Clin Immunol, 1997, 99(5): 594-599.

[6] Papi A, Brightling C, Pedersen SE, et al. Asthma[J]. Lancet, 2018, 391(10122): 783-800.

[7] Caldera-Alvarado G, Khan DA, Defina LF, et al. Relationship between asthma and cognition: the cooper center longitudinal study[J]. Allergy, 2013, 68(4): 545-548.

[8] Naude JP, Gill S, Hu S, et al. Plasma neurofilament light: a marker of neurodegeneration in mild behavioral impairment[J]. J Alzheimers Dis, 2020, 76(3): 1017-1027.

[9] Gao LC, Wu M, Liu HY, et al. Neonatal LPS administered before sensitization reduced the number of inflammatory monocytes and abrogated the development of OVA-induced Th2 allergic airway inflammation[J]. Front Immunol, 2021, 12: 725906.

[10] Dai MN, Zhu XH, Yu J, et al. CCR3 gene knockout in bone marrow cells ameliorates combined allergic rhinitis and asthma syndrome (CARAS) by reducing airway inflammatory cell infiltration and Th2 cytokines expression in mice model[J]. Int Immunopharmacol, 2022, 104: 108509.

[11] Waern I, Akula S, Allam VSRR, et al. Disruption of the mast cell carboxypeptidase A3 gene does not attenuate airway inflammation and hyperresponsiveness in two mouse models of asthma[J]. PLoS One, 2024, 19(4): e0300668.

[12] Gao X, Leung TF, Wong GW, et al. Meteorin-β/Meteorin like/IL-41 attenuates airway inflammation in house dust mite-induced allergic asthma[J]. Cell Mol Immunol, 2022, 19(2): 245-259.

[13] Yao L, Yuan XJ, Fu H, et al. Epithelium-derived cystatin SN inhibits house dust mite protease activity in allergic asthma[J]. Allergy, 2023, 78(6): 1507-1523.

[14] Babayeva M, Tabynov K, Nurpeisov T, et al. A recombinant *Artemisia vulgaris* pollen adjuvanted Art v 1 protein-based vaccine treats allergic rhinitis and bronchial asthma using pre- and co-seasonal ultrashort immunotherapy regimens in sensitized mice[J]. Front Immunol, 2022, 13: 983621.

[15] Ma M, Li GY, Qi MH, et al. Inhibition of the inflammasome activity of NLRP3 attenuates HDM-induced allergic asthma[J]. Front Immunol, 2021, 12: 718779.

[16] Dong LY, Wang Y, Zheng TT, et al. Hypoxic hUCMSC-derived extracellular vesicles attenuate allergic airway inflammation and airway remodeling in chronic asthma mice[J]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12(1): 4.

[17] Gawel K, Gibula E, Marszalek-Grabska M, et al. Assessment of spatial learning and memory in the Barnes maze task in rodents-methodological consideration[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2019, 392(1): 1-18.

[18] Kumari S, Dhapola R, Reddy DH. Apoptosis in Alzheimer's disease: insight into the signaling pathways and therapeutic avenues[J]. Apoptosis, 2023, 28(7/8): 943-957.

[19] Mangalmurti A, Lukens JR. How neurons die in Alzheimer's disease: implications for neuroinflammation[J]. Curr Opin Neurobiol, 2022, 75: 102575.

[20] Magee JC, Grienberger C. Synaptic plasticity forms and functions [J]. Annu Rev Neurosci, 2020, 43: 95-117.

[21] Chou YH, Sundman M, Ton That V, et al. Cortical excitability and plasticity in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a systematic review and meta-analysis of transcranial magnetic stimulation studies[J]. Ageing Res Rev, 2022, 79: 101660.

[22] Zhang Y, Zhou Q, Lu L, et al. Copper induces cognitive impairment in mice *via* modulation of cuproptosis and CREB signaling[J]. Nutrients, 2023, 15(4): 972.

[23] Song T, Song XP, Zhu C, et al. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress, neuroinflammation, and metabolic alterations in the progression of Alzheimer's disease: a meta-analysis of *in vivo* magnetic resonance spectroscopy studies[J]. Ageing Res Rev, 2021, 72: 101503.

[24] Liu YQ, Yang H, Luo NB, et al. An Fgr kinase inhibitor attenuates sepsis-associated encephalopathy by ameliorating mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and neuroinflammation *via* the SIRT1/PGC-1α signaling pathway[J]. J Transl Med, 2023, 21(1): 486.

[25] Borst K, Dumas AA, Prinz M. Microglia: Immune and non-immune functions[J]. Immunity, 2021, 54(10): 2194-2208.

[26] Brás JP, Bravo J, Freitas J, et al. TNF-alpha-induced microglia activation requires miR-342: impact on NF-κB signaling and neurotoxicity[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(6): 415.

[27] Wang L, Ling HY, He H, et al. Dysfunctional synaptic pruning by microglia correlates with cognitive impairment in sleep-deprived mice: involvement of CX3CR1 signaling[J]. Neurobiol Stress, 2023, 25: 100553.

[28] Huang XW, Hussain B, Chang JL. Peripheral inflammation and blood-brain barrier disruption: effects and mechanisms[J]. CNS Neurosci Ther, 2021, 27(1): 36-47.

[29] Tamasauskiene L, Sitkauskiene B. Systemic and local cytokine profile and risk factors for persistent allergic airway inflammation in patients sensitised to house dust mite allergens[J]. BMC Pulm Med, 2021, 21(1): 424.

（责任编辑：曾 玲）

本文引用格式：

付 强，柯义玲，贺桂琼，等. 屋尘螨诱导过敏性哮喘伴认知功能障碍小鼠模型的构建[J]. 重庆医科大学学报，2025，50(5)：649-656.