

胡慧艳,任婧楠,李晓,等.嗅闻佛手柑精油对阿尔兹海默症小鼠的神经保护作用研究[J].华中农业大学学报,2022,41(1):229-237.

DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2022.01.023

嗅闻佛手柑精油对阿尔兹海默症小鼠的神经保护作用研究

胡慧艳,任婧楠,李晓,潘思轶,范刚

华中农业大学食品科学技术学院/环境食品学教育部重点实验室,武汉 430070

摘要 为研究嗅闻佛手柑精油(BEO)不同时间对 *D*-半乳糖(*D*-gal)和三氯化铝(AlCl_3)诱导的阿尔兹海默症小鼠的神经保护作用,选用健康的雄性昆明小鼠通过接受 *D*-gal(120 mg/kg,腹腔注射)和 AlCl_3 (10 mg/kg,腹腔注射),持续 49 d 以建立阿尔兹海默症实验模型。第 29 天,阳性组喂服盐酸多奈哌齐,嗅闻组吸入 BEO 1 h 或 2 h,持续 21 d。治疗后评估了小鼠行为和大脑生物化学的变化。行为学研究结果显示,*D*-gal 和 AlCl_3 明显减少了自发的交替和运动活动,表明行为和认知能力的损害。生化研究结果显示,*D*-gal 和 AlCl_3 明显增加了氧化应激的程度、炎症因子的数量和乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AchE)的含量。而 2 h 嗅闻组的小鼠的认知行为障碍和生化指标的改变得到了明显的改善。研究结果表明吸入 BEO 21 d,尤其是 2 h 嗅闻组可以减轻 *D*-gal 和 AlCl_3 引起的认知行为障碍和生化损伤。

关键词 阿尔兹海默症(AD);佛手柑精油(BEO);氧化应激;炎症因子;乙酰胆碱酯酶(AchE);芳香疗法

中图分类号 R 285; R 277.7 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2022)01-0229-09

阿尔兹海默症(Alzheimer's disease, AD)是一种以记忆丧失和认知功能障碍为特点的神经退行性疾病。目前 AD 的具体发病机制还不是十分清楚,但大量的研究表明,淀粉样蛋白(β -amyloid, $\text{A}\beta$)沉积、tau 蛋白过度磷酸化、乙酰胆碱水平的降低、炎症反应、氧化应激、线粒体功能障碍、不稳定代偿功能和金属失调可能在 AD 发病机制中发挥重要作用^[1],其中 $\text{A}\beta$ 沉积、乙酰胆碱水平的降低、氧化应激和炎症反应起到了关键性作用。

目前, FDA 批准的传统药物基于 2 种作用机制,包括非竞争性 N-甲基-D-天冬氨酸受体拮抗剂(美金刚胺)和胆碱酯酶抑制剂(盐酸多奈哌齐、甘兰坦胺和利瓦斯替胺)^[2]。但是,市场上可用的这些药物成本高,副作用多,并且通常无法阻止疾病的发展。因此,如何有效治疗阿尔兹海默症仍然是个挑战。

芳香疗法在阿尔兹海默症中的应用已成为学者的研究热点。佛手柑精油(bergamot essential oil, BEO)是最常见的精油之一,由挥发性芳香族萜烯

和加氧衍生物如芳樟醇组成^[3],之前的研究证明其具有神经保护和抗炎的作用^[4-5],但是针对 *D*-gal 和 AlCl_3 联合诱导模型的研究较少,且摄入方式多为灌胃和腹腔注射的方式。本研究通过行为学和生化指标的检测来评估嗅闻 BEO 对 *D*-gal 和 AlCl_3 引起的阿尔兹海默症的影响,探讨 BEO 在阿尔兹海默症的治疗中的作用机制,为芳香疗法辅助治疗阿尔兹海默症提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

佛手柑精油,上海妙尔香精香料有限公司;*D*-半乳糖(*D*-galactose, *D*-gal)、三氯化铝(AlCl_3),国药集团化学试剂有限公司;盐酸多奈哌齐(Donepezil hydrochloride),卫材(中国)制药有限公司;丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、 β 淀粉样蛋白($\text{A}\beta$)、乙酰胆碱酯酶(AchE)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)检测试剂盒,上海优选生物技术有限公司。

收稿日期:2021-09-24

基金项目:中央高校基本科研业务费专项(2662020SPPY002)

胡慧艳, E-mail: 1460745718@qq.com

通信作者:范刚, E-mail: fangang@mail.hzau.edu.cn

1.2 仪器与设备

Y-迷宫,北京众实迪创有限公司;高压蒸汽灭菌锅,上海申安医疗器械厂;气相色谱-质谱联用仪(Agilent6890N),美国 Agilent 公司;SPME 装置(50/30 μm DVB/CAR/PDMS),美国 Supelco 公司。

1.3 实验动物

SPF 级 4 周龄的雄性昆明小鼠(KM)35 只。实验动物和饲料购自华中农业大学实验动物中心,动物合格证号为 SCXK(鄂)2020-0019。自由饮水饮食,日光灯人工照明(照明时间:08:00-20:00),温度 22 ± 2 $^{\circ}\text{C}$ 。所有的实验都得到了华中农业大学科学伦理委员会的批准(伦理号为 202110240010)。

1.4 佛手柑精油成分定性分析

为了确定小鼠嗅闻佛手柑精油时的挥发性成分,采用固相微萃取的方法测定了佛手柑精油的成分组成^[6]。运用 NIST05 与 Wiley.7n 谱库进行检索,利用 C6~C20 正构烷烃的保留时间计算出每种香气物质的保留指数,再结合文献的保留指数进行比对,确认各个香气物质的化学组成。气相色谱-质谱联用仪色谱与质谱条件参考杨子玉^[6]的方法。

1.5 AD 的诱导

制备质量浓度为 24 g/L *D*-gal 和 2 g/L AlCl_3 溶液。将上述溶液等体积混合后得到 12 g/L 的 *D*-gal 和 1 g/L 的 AlCl_3 的混合溶液。小鼠连续 49 d 注射该混合溶液以诱导阿尔兹海默症。

1.6 动物建模与分组

小鼠被随机分为 5 组($n=7$)。第 1 组(对照组, Con):连续 49 d 接受生理盐水腹腔注射。第 2 组(模型组, Mod):腹腔注射 *D*-gal(120 mg/(kg·d)) 和 AlCl_3 (10 mg/(kg·d)),连续 49 d。第 3 组(盐酸多奈哌齐组, Don):在腹腔注射 *D*-gal 和 AlCl_3 28 d 后,每天口服盐酸多奈哌齐(2 mg/(kg·d))21 d。第 4 组(1 h)和第 5 组(2 h):在腹腔注射 *D*-gal 和 AlCl_3 28 d 后,分别嗅闻 75% BEO 1 h 和 2 h,为期 21 d。实验过程如图 1 所示。

1.7 旷场实验

旷场实验(open field test, OFT)是用来确定小鼠在陌生环境中的行为活动以及它们对陌生环境的探索行为。该实验在一个敞箱(长 70 cm、宽 50 cm、高 40 cm)中进行。实验过程参考杨子玉^[6]的方法,每只小鼠完成测试后,用 10% 的乙醇擦拭敞箱,晾干以备下次使用。

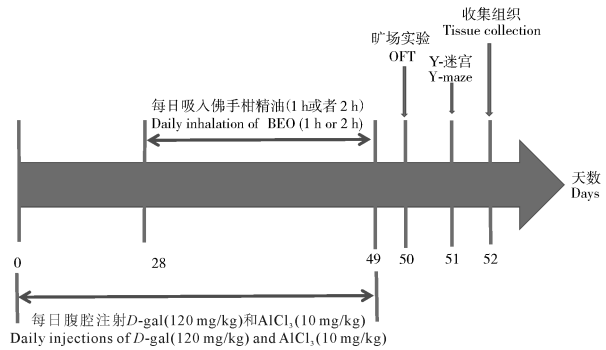


图 1 建立阿尔兹海默症小鼠模型的实验方案和 BEO 处理的实验流程

Fig.1 Experimental protocol for establishing a mouse model of Alzheimer's disease and drug administration for BEO treatment

1.8 Y-迷宫实验

参考刘树柏^[7]的方法进行 Y-迷宫实验,并进行些许改动。Y-迷宫是一个等边三角形区域。实验最初,关闭 3 号臂并将 3 号臂记为新异臂。实验开始时小鼠被放置在 1 号臂,让小鼠在迷宫中自由探索 5 min。1 h 后,3 号臂被打开,让小鼠从 1 号臂开始自由移动 5 min。实验时记录这 5 min 内小鼠进入各个臂的顺序和次数。自发交替行为是指在测试中连续进入 3 个臂。自发交替行为的百分比(percentage of spontaneous alternation, SAP)计算公式如下:

$$\text{SAP} = \frac{\text{交替次数}}{\text{进入臂总数} - 2} \times 100\%$$

每次测试后,用 10% 的乙醇仔细擦拭 Y-迷宫。

1.9 血清和脑组织匀浆的制备

行为实验完成后,取眼球血并在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 3 000 r/min 离心 2 min,分离出血清。此外,在行为学实验结束后,立即从死亡小鼠身上剥离出大脑。将大脑置于生理盐水中,以去除血细胞,在滤纸上印迹,并在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 下冷冻。前额叶皮层和海马结构在冰上进行解剖,并在液氮中冷冻。样品保持在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 直到进行检测。

1.10 小鼠血清以及脑组织中生化指标的检测

按照所对应的试剂盒说明书测定小鼠血清中 MDA 含量和 SOD 活性。

酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测小鼠脑组织小鼠大脑中 $\text{A}\beta$ 、AchE、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量。

1.11 统计分析

本试验各组样本数为 7,数值均以“平均值 \pm 标准差”来表示。柱状图使用 Graphpad Prism 7.0 进

行分析与绘图,分析时采用 ANOVA 单因素进行方差分析,并采用多重检验的方法检验数据的差异显著性。使用 IBM SPSS Statistics 26 软件进行 ANOVA 单因素方差分析,并采用 Duncan's 法检验数据的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 佛手柑精油成分的测定结果

运用 GC-MS 测定实验所用的佛手柑精油,检测到 29 种香气物质。采用峰面积归一化法进行相对定量的计算,求得各个化合物在佛手柑精油中的

相对含量,结果如表 1 所示。所鉴定出的 29 种成分,其中有 13 个烯烃类化合物,总相对含量为 44.30%,为佛手柑精油的主要香气成分;有 7 个酯类化合物,总相对含量为 20.06%;有 3 个醇类化合物,总相对含量为 9.19%;有 4 个醛类化合物,总相对含量为 2.25%;1 个酮类化合物,总相对含量为 0.02%;其他 1 种占 0.08%。由表 1 可知,该 BEO 的主要成分是萜烯类以及酯类、醇类、醛类、酮类等多种生理活性物质,其中含量最高的是 *D*-柠檬烯,占 18.94%,可能它在改善 *D*-gal 和 $AlCl_3$ 导致的认知障碍方面起了主要作用。

表 1 佛手柑精油的化学成分及相对含量

Table 1 Chemical composition and relative percentage content of bergamot essential oil

编号 No.	保留时间/min Retention time	保留指数 Retention index	名称 Name	分子式 Molecular formula	相对含量/% Relative percentage
1	11.594	898	β -蒎烯 β -Pinene	$C_{10}H_{16}$	9.05
2	12.314	913	3-蒎烯 3-Carene	$C_{10}H_{16}$	5.31
3	12.521	918	左旋- α -蒎烯 (1 <i>S</i>)-(-)- α -Pinene	$C_{10}H_{16}$	4.12
4	14.208	953	<i>D</i> -柠檬烯 <i>D</i> -Limonene	$C_{10}H_{16}$	18.94
5	15.719	984	萜品烯 Terpinen-4-ol	$C_{10}H_{16}$	4.16
6	16.766	1 006	异松油烯 Terpinolene	$C_{10}H_{16}$	0.70
7	18.22	1 035	芳樟醇 Linalool	$C_{10}H_{18}O$	9.09
8	18.872	1 049	2,6-二甲基-2,4,6-辛三烯 Alloocimene	$C_{10}H_{16}$	0.39
9	19.982	1 071	香茅醛 Citronellal	$C_{10}H_{18}O$	0.50
10	20.732	1 086	苯甲酸乙酯 Ethyl benzoate	$C_9H_{10}O_2$	0.04
11	20.972	1 091	(-)-4-萜品醇 (-)-4-Terpineol	$C_{10}H_{18}O$	0.09
12	22.397	1 121	癸醛 Decanal	$C_{10}H_{20}O$	0.12
13	22.934	1 132	1,3,3-三甲基-二环[2.2.1] 庚-2-醇乙酸酯 Fenchyl acetate	$C_{12}H_{20}O_2$	0.05
14	23.982	1 154	(<i>Z</i>)-3,7-二甲基-2,6-辛二烯醛 <i>cis</i> -Citral	$C_{10}H_{16}O$	0.62
15	25.326	1 182	丁酸-1-乙烯基-1,5-二甲基-4-己烯基酯 Linalyl butanoate	$C_{14}H_{24}O_2$	14.22
16	25.979	1 196	柠檬醛 Citral	$C_{10}H_{16}O$	1.01
17	26.946	1217	甲酸香叶酯 Geranyl formate	$C_{11}H_{18}O_2$	0.03
18	28.147	1 243	金刚烷 Adamantane	$C_{10}H_{16}$	0.08
19	28.954	1 261	乙酸松油酯 Terpinyl acetate	$C_{12}H_{20}O_2$	1.35
20	29.738	1 278	乙酸橙花酯 Nerol acetate	$C_{12}H_{20}O_2$	1.35
21	30.739	1 300	乙酸香叶酯 Geranyl acetate	$C_{12}H_{20}O_2$	3.02
22	31.06	1 308	长叶烯 <i>d</i> -Longifolene	$C_{15}H_{24}$	0.08
23	31.363	1 315	α -柏木烯 α -Cedrene	$C_{15}H_{24}$	0.25
24	32.894	1 350	罗汉柏烯 <i>cis</i> -(-)-Thujopsene	$C_{15}H_{24}$	0.41
25	34.762	1 394	瓦伦西亚橘烯 (+)-Valencene	$C_{15}H_{24}$	0.54
26	35.208	1 404	(+)-花侧柏烯 (+)-Cuparene	$C_{15}H_{22}$	0.34
27	38.052	1 474	桉油烯醇 Spathulenol	$C_{15}H_{24}O$	0.01
28	38.201	1 478	氧化石竹烯 4,5-Epoxy-4,11,11-trimethyl-8-methylenebicyclo(7.2.0)undecane	$C_{15}H_{24}O$	0.01
29	46.646	1 708	圆柚酮 Nootkanone	$C_{15}H_{22}O$	0.02

2.2 BEO 对 *D*-gal 和 $AlCl_3$ 诱发的 OFT 焦虑感的影响

在嗅闻佛手柑精油 21 d 后,对各组小鼠的焦虑行为进行了评估。图 2 显示了 OFT 中小鼠焦虑行为的结果。与对照组相比,接受 *D*-gal 和 $AlCl_3$ 诱导处理的组在水平跨越格子数和直立次数上显著减少($P < 0.05$),表明接受 *D*-gal 和 $AlCl_3$ 处理的动物

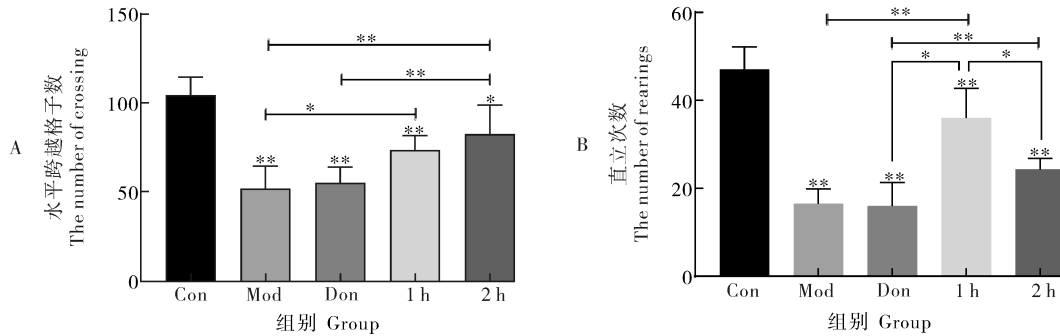
在 OFT 中有类似焦虑的行为。与模型组相比,嗅闻 BEO 1 h 处理组的水平跨越格子数和直立次数显著增加($P < 0.05$),这表明 BEO 减弱了 *D*-gal 和 $AlCl_3$ 诱导的焦虑样行为,提高了小鼠的活泼程度和好奇程度。另外,嗅闻 1 h 组和 2 h 组在直立次数具有显著差异,说明在提高小鼠的好奇程度上,嗅闻 1 h 佛手柑精油比嗅闻 2 h 的效果更好。阳性对照

组的水平跨越格子数和直立次数没有显著增加,可能是盐酸多奈哌齐致恶心、烦躁不安的副作用^[8]影响了小鼠的情绪。

2.3 BEO 对 *D*-gal 和 AlCl_3 引起的空间记忆损害的作用

如图 3 所示,在 Y-迷宫测试中各实验组自发交替百分比(图 3A)和进入新臂的次数(图 3C)均显著下降,其中模型组小鼠下降最多,下降幅度分别达到 45% 和 36%。阳性对照组小鼠在连续 21 d 口服标

准药物的盐酸多奈哌齐(2 mg/kg)后,自发交替百分比显著上升 42%,证明盐酸多奈哌齐对该模型的认知障碍具有改善作用。所有治疗组之间的交替现象均有显著提高,但 1 h 和 2 h 嗅闻组间无显著性差异。与正常组相比,交替百分比最低的是模型组,最接近正常水平的是阳性对照组。结果见图 5。图 3B 中各组小鼠总进臂数无显著差异。图 3C 中模型组和实验组小鼠进入新臂的次数显著减少,但经过嗅闻 BEO 2 h 后进入新臂的次数得到了很大的改善。



差异性用“*”($P < 0.05$)和“**”($P < 0.01$)表示。下同。Differences are indicated by “*” ($P < 0.05$) and “**” ($P < 0.01$). The same as below.

图 2 吸入 BEO(1 h 和 2 h)对 *D*-gal 和 AlCl_3 处理的小鼠在 OFT 中的水平跨越格子数(A)和直立次数(B)的影响

Fig.2 Effects of the inhaled BEO (1 h and 2 h) on the number of squares across (A) and the number of uprights in the OFT (B) in the *D*-gal and AlCl_3 treated mice

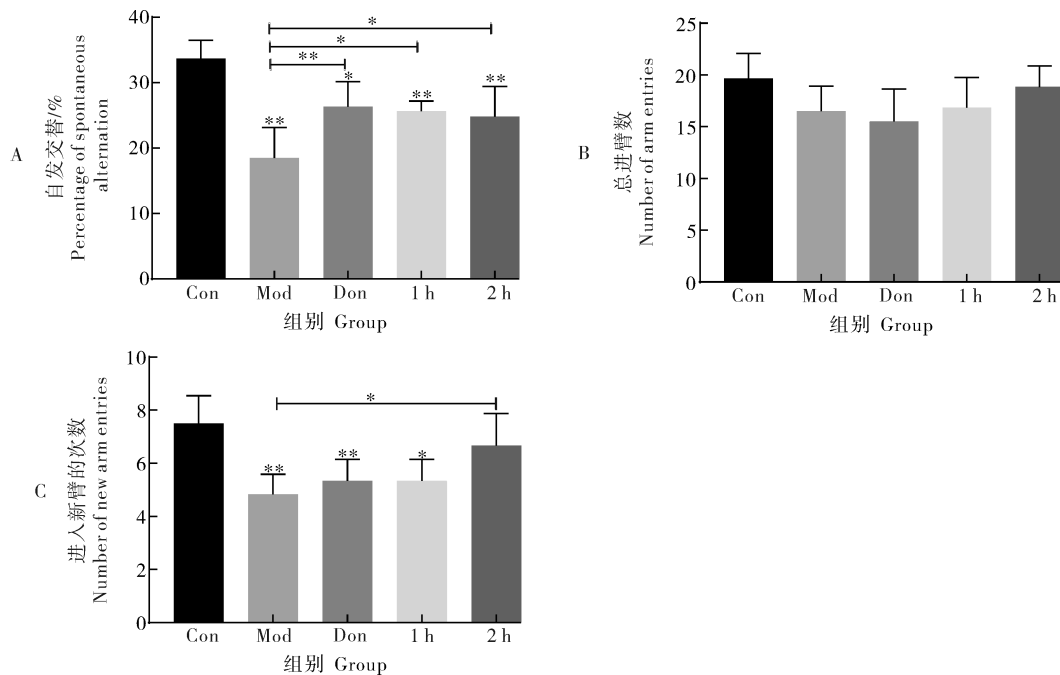


图 3 吸入 BEO(1 h 和 2 h)对自发交替百分比(A)、总进臂数(B)和进入新臂的次数(C)的影响

Fig.3 Effects of the inhaled BEO (1 h and 2 h) on the percentage of alternation (A) and on the number of entry arms (B) and on the number of entries into the new arm (C) in the Y-maze task

2.4 嗅闻 BEO 对氧化应激标志物的影响

与对照组相比,腹腔注射 *D*-gal 和 $AlCl_3$ 导致 MDA 水平显著增加($P < 0.01$)(图 4A)。与模型组相比,盐酸多奈哌齐和精油嗅闻组的 MDA 水平分别下降 18%、34% 和 44%($P < 0.05$)。

此外,与对照组相比,模型组小鼠脑组织中的 SOD 水平明显下降(图 4B)。相反,与模型组相比,吸入佛手柑精油 2 h 后,小鼠脑组织中的 SOD 明显

增加。盐酸多奈哌齐处理组和 1 h 嗅闻组与模型组两两相比均没有明显差异。

另外,我们还测试了小鼠海马和皮层中的 GPX (图 4C 和 4D)。经过 *D*-gal 和 $AlCl_3$ 处理的小鼠海马中 GPX 含量显著下降,但是精油吸入处理未能起到明显的改善作用。类似地,与对照组相比,小鼠皮层中的 GPX 含量也显著下降。与海马中 GPX 结果不同的是精油吸入 1 h 和 2 h 均能够显著提高 GPX

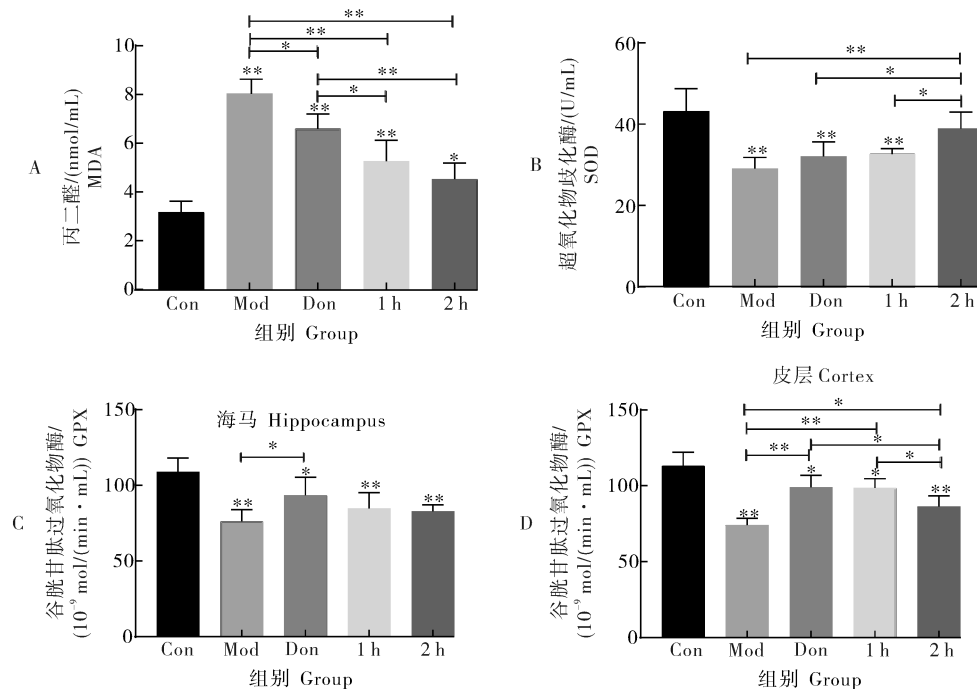


图 4 吸入 BEO(1 h 和 2 h)对 *D*-gal 和 $AlCl_3$ 处理的小鼠血清中的 MDA(A) 和 SOD(B)水平及小鼠海马(C)和皮层(D)中 GPX 的影响

Fig.4 Effects of inhaling BEO (1 h and 2 h) on the levels of MDA (A) and SOD (B) in the serum and the levels of GPX in hippocampal (C) and cortex (D) of *D*-gal and $AlCl_3$ -treated mice

含量,分别提高了 33%和 17%。

2.5 吸入精油对阿尔兹海默症模型小鼠脑内 $A\beta$ 含量的影响

图 5 显示了各组小鼠脑组织 $A\beta$ 含量的不同。与正常组相比,模型组小鼠海马中 $A\beta$ 含量显著增加($P < 0.05$);与模型组相比,阳性对照组和嗅闻组中 $A\beta$ 含量均显著下降,其中 2 h 组最低,1 h 组次之,最后是阳性对照组。这表明小鼠在嗅闻 2 h 佛手柑精油后降低 $A\beta$ 沉积的效果最好。

2.6 吸入佛手柑精油对阿尔兹海默症模型小鼠脑部炎症因子的影响

表 2 显示了小鼠海马中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的水平。与对照组相比,*D*-gal 和 $AlCl_3$ 显著提高了海马中的 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α ($P < 0.05$) 水平,分别

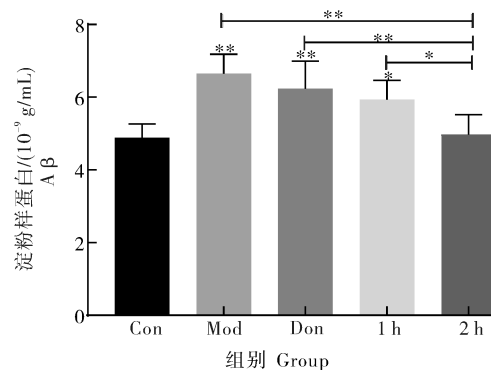


图 5 吸入 BEO(1 h 和 2 h)对 *D*-gal 和 $AlCl_3$ 处理的小鼠脑部 $A\beta$ 水平的影响

Fig.5 Effects of the inhaled BEO (1 h and 2 h) on the $A\beta$ level in the *D*-gal and $AlCl_3$ treated mice

提高了 83%、38% 和 71%。与模型组相比,1 h 和 2 h 嗅闻均显著降低了海马中 IL-1 β 和 TNF- α ($P < 0.05$) 的水平,从而显著降低了炎症反应,且吸入精油 2 h 显示出更好的效果。

表 2 吸入 BEO(1 h 和 2 h)对 *D*-gal 和 AlCl₃ 处理的小鼠脑部 AchE 水平的影响

组别 Group	Table 2 Effect of BEO inhalation (1 h and 2 h) on AchE levels in the brains of <i>D</i> -gal and AlCl ₃ -treated mice		
	白细胞介素-1 β IL-1 β	白细胞介素-6 IL-6	肿瘤坏死因子 α TNF- α
Con	68.04 \pm 8.41a	133.31 \pm 12.75a	96.79 \pm 13.02a
Mod	124.30 \pm 7.63b	184.74 \pm 28.99b	165.35 \pm 9.94b
Don	118.57 \pm 12.89b	155.97 \pm 34.93ac	146.85 \pm 11.87c
1 h	102.99 \pm 12.25c	146.59 \pm 10.86a	136.19 \pm 10.36c
2 h	88.93 \pm 4.89d	181.16 \pm 16.67bc	113.29 \pm 10.91d

注:同列不同小写字母表示不同处理组之间在 0.05 的水平存在显著性差异。Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant differences between the different treatment groups at the level of 0.05.

2.7 吸入佛手柑精油对阿尔兹海默症模型小鼠胆碱功能的影响

脑组织的生化分析显示,与对照组相比,模型组海马和皮层组织中的 AchE 活性显著提高 ($P < 0.01$) (图 6),而与模型组相比,精油处理显著降低了

皮层的 AchE 活性 (1 h 为 $P < 0.01$, 2 h 为 $P < 0.01$),且精油处理 2 h 作用更为显著。因此,吸入精油减少了 *D*-gal 和 AlCl₃ 给药后产生的胆碱功能障碍,从而在 Y 型迷宫和旷场实验中表现出更大的促进作用。

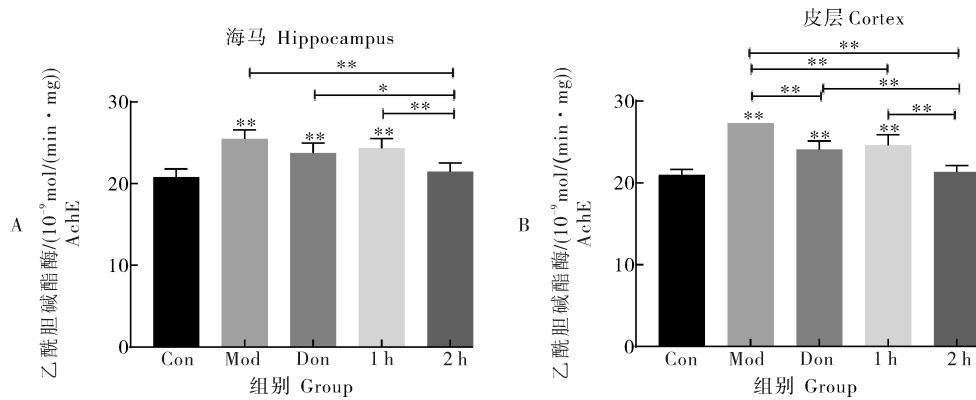


图 6 吸入 BEO(1 h 和 2 h)对 *D*-gal 和 AlCl₃ 处理的小鼠海马(A)和大脑皮层(B)中 AchE 水平的影响

Fig.6 Effects of the inhaled BEO (1 h and 2 h) on the AchE level in hippocampus(A) and cortex(B) in the *D*-gal and AlCl₃ treated mice

3 讨论

本研究检测了小鼠在 OFT 和 Y-迷宫中的表现,仅与对照组和实验组相比,模型组小鼠出现了探索能力和短期记忆指数下降等行为障碍。经过 *D*-gal 和 AlCl₃ 处理后的小鼠脑中 A β 含量显著升高,也证明了小鼠出现了阿尔兹海默症的病理性症状。然而,在吸入 BEO 后,认知功能显著恢复,A β 含量也有所降低。Rombolà 等^[9]也利用 OFT 和强迫游泳等实验证明了注射佛手柑精油可以减轻大鼠焦虑行为。这种整体影响可能归因于其对神经的保护能

力。为进一步探究 BEO 对 AD 小鼠神经保护的机制,笔者进行了有关氧化应激和炎症因子指标的检测。

酶抗氧化剂如过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)以及红细胞状态和血浆中总抗氧化水平的变化,可以作为患有 AD 患者大脑病理特性的指标^[10]。通过测量不同组血清和脑组织中 MDA、SOD、GPX 水平来确定不同组小鼠的体内氧化应激水平。有研究表明长期注射 *D*-gal 会导致代谢紊乱,导致体内活性氧的增加;铝会诱导突触囊泡和轴突线粒体周转的减少,导

致神经元氧化产物的释放^[11]。在本研究中,模型组小鼠的 MDA 含量显著上升, SOD 和 GPX 含量显著下降, 从而表明脑组织内自由基增加。然而, 吸入佛手柑精油显著降低了 MDA 含量, 并提高了 SOD 和 GPX 的含量, 使氧化应激的程度降低。这一发现与另一项研究相一致, 该研究表明口服长叶薄荷挥发油通过抗氧化(SOD, GSH)和抑制 NO 和脂质过氧化水平, 显著改善了 AlCl₃ 导致的氧化应激^[12]。

由于 AD 的确切病因仍然难以捉摸, 有越来越多的证据表明神经炎症也参与了 AD 的发生。许多促炎细胞因子, 如 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α , 都是神经炎症的关键因素^[13]。在目前的研究中, D-gal 和 AlCl₃ 增加了海马中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的水平, 表明大脑区域存在严重的神经炎症情况。本研究结果与其他研究一致^[1,14-16], 表明负责小鼠认知的海马在接受 D-gal 和 AlCl₃ 腹腔注射后受炎症刺激影响。这也与 BEO 被发现可以通过抗氧化剂、抗炎剂和 GABA 调节的联合作用来缓解 AlCl₃ 诱导的大鼠的焦虑行为相似^[17]。

胆碱系统也在 AD 过程中起着重要的作用。AChE 是催化胆碱能神经递质水解的酶, 在与铝相互作用时增强活性^[18], 且 A β 对乙酰胆碱(acetylcholin, Ach)的合成和释放有不利影响^[19], 共同解释了 D-gal 和 AlCl₃ 处理组 AChE 活性的升高。然而, 吸入佛手柑精油抑制了 AChE 活性的升高, 尤其是嗅闻 2 h 组的抑制性更为显著。大量研究证明了植物精油的 AChE 抑制活性。Tundis 等^[20]研究发现柑橘精油具有抗体外 AChE 活性。Sadiki 等^[21]研究发现吸入 *Tetraclinis articulata* 精油能够通过调节 AChE 的作用, 改善 A β ₁₂ 导致的记忆缺陷。因此, BEO 能够降低 D-gal 和 AlCl₃ 给药后产生的胆碱功能缺陷, 从而增强了 Y-迷宫和 OFT 中的益智效应。

上述结果证明了 BEO 具有抗炎等作用, 从而在阿尔兹海默症模型小鼠中发挥作用, 但是 BEO 作为一种复杂的化合物, 具体是哪种气味物质起到了作用还不明确。值得注意的是, 柠檬烯的抗氧化和抗炎活性已被证明其对 A β ₁₂ 毒性的保护作用至关重要^[22-23]。Boiangiu 等^[24]发现柠檬烯能减少氧化应激生物标志物如丙二醛(MDA), 以及增加超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶和谷胱甘肽(GSH)的含

量, 从而提高大鼠的认知功能。另外, 也有研究表明芳樟醇也对阿尔兹海默症有积极作用。芳樟醇被认为可以保护神经元免受毒性和损伤, 从而对阿尔兹海默症有积极的治疗作用。据报道, 慢性芳樟醇可以减轻 AD3xTg-AD 三转基因小鼠模型的记忆丧失和情绪损伤^[25]。Caputo 等^[26]通过细胞实验发现芳樟醇可以通过抵消 A β ₁₂ 低聚物诱导的 Ca²⁺ 稳态的失调来缓解 A β ₁₂ 的神经毒性。因此, 我们初步猜测是佛手柑精油中的柠檬烯和芳樟醇起到了积极作用, 能提高认知功能, 改善 D-gal 和 AlCl₃ 模型小鼠的认知功能障碍。

综上所述, 嗅闻 2 h 后的阿尔兹海默症小鼠表现出更好的神经保护作用, 达到了提高认知能力和探索能力的作用, 这可能是更长时间的嗅闻使得精油中的有效成分在脑中积累的更多, 从而更能发挥出保护作用。分析表明佛手柑精油在吸入后是通过减少小鼠脑中 A β 的沉积, 抑制氧化应激、炎症因子和胆碱酯酶水平来起到神经保护的作用, 从而使得小鼠在旷场实验和 Y-迷宫实验中探索能力和认知能力显著增强。

参考文献 References

- [1] JI D S, WU X M, LI D L, et al. Protective effects of chondroitin sulphate nano-selenium on a mouse model of Alzheimer's disease[J]. International journal of biological macromolecules, 2020, 154: 233-245.
- [2] TALEBI M, İLGÜN S, EBRAHIMI V, et al. *Zingiber officinale* ameliorates Alzheimer's disease and cognitive impairments: lessons from preclinical studies[J/OL]. Biomedicine & pharmacotherapy, 2021, 133: 111088[2021-09-24]. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111088>.
- [3] KOMATSU T, KATSUYAMA S, UEZONO Y, et al. Possible involvement of the peripheral Mu-opioid system in antinociception induced by bergamot essential oil to allodynia after peripheral nerve injury[J]. Neuroscience letters, 2018, 686: 127-132.
- [4] NAVARRA M, MANNUCCI C, DELBÒ M, et al. *Citrus bergamia* essential oil: from basic research to clinical application[J/OL]. Frontiers in pharmacology, 2015, 6: 36[2021-09-24]. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00036>.
- [5] SCUTERI D, ROMBOLÀ L, MORRONE L A, et al. Neuroparmacology of the neuropsychiatric symptoms of dementia and role of pain: essential oil of bergamot as a novel therapeutic approach[J/OL]. International journal of molecular sciences, 2019, 20 (13): 3327[2021-09-24]. <https://doi.org/10.3390/ijms20133327>.

- [6] 杨子玉. 甜橙精油对抑郁小鼠缓解作用的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2017. YANG Z Y. Effect of orange essential oil on the relieving of depression in mice[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2017(in Chinese with English abstract).
- [7] 刘树柏. 艾塞那肽对 D-半乳糖和氯化铝联合诱导小鼠认知损伤的影响[D]. 长春: 吉林大学, 2018. LIU S B. The influence of exenatide on the cognitive impairment induced by aluminum chloride and D-galactose in mice[D]. Changchun: Jilin University, 2018(in Chinese with English abstract).
- [8] 王凯, 于美芝, 孙珊珊. 治疗认知功能障碍药物与合理应用[J]. 人民军医, 2014, 57(1): 91-92. WANG K, YU M Z, SUN S S. Drugs for the treatment of cognitive dysfunction and their rational application[J]. People's military surgeon, 2014, 57(1): 91-92(in Chinese).
- [9] ROMBOLÀ L, TRIDICO L, SCUTERI D, et al. Bergamot essential oil attenuates anxiety-like behaviour in rats[J/OL]. Molecules, 2017, 22(4): 614[2021-09-24]. <https://doi.org/10.3390/molecules22040614>.
- [10] TALEBI M, TALBEI M, SAMARGHANDIAN S. Association of *Crocus sativus* with cognitive dysfunctions and Alzheimer's disease: a systematic review[J]. Biointerface research in applied chemistry, 2021, 11(1): 7468-7492.
- [11] LAKSHMI B V S, SUDHAKAR M, PRAKASH K S. Protective effect of selenium against aluminum chloride-induced Alzheimer's disease: behavioral and biochemical alterations in rats[J]. Biological trace element research, 2015, 165(1): 67-74.
- [12] ELSHAMY S, ABDE- MOTAAL A, ABDEL- HALIM M, et al. Potential neuroprotective activity of *Mentha longifolia* L. in aluminum chloride-induced rat model of Alzheimer's disease[J/OL]. Journal of food biochemistry, 2021, 45(4): 1770[2021-09-24]. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13644>.
- [13] KIM Y K, NA K S, MYINT A M, et al. The role of pro-inflammatory cytokines in neuroinflammation, neurogenesis and the neuroendocrine system in major depression[J]. Progress in neuro-psychopharmacology and biological psychiatry, 2016, 64: 277-284.
- [14] JAMIL A, MAHBOOB A, AHMED T. Ibuprofen targets neuronal pentraxins expression and improves cognitive function in mouse model of $AlCl_3$ -induced neurotoxicity[J]. Experimental and therapeutic medicine, 2016, 11(2): 601-606.
- [15] CHOWRA U, YANASE E, KOYAMA H, et al. Aluminium-induced excessive ROS causes cellular damage and metabolic shifts in black gram *Vigna mungo* (L.) Hepper[J]. Protoplasma, 2017, 254(1): 293-302.
- [16] SAMIR A M, RASHED L A. Effects of occupational exposure to aluminium on some oxidative stress and DNA damage parameters[J]. Human & experimental toxicology, 2018, 37(9): 901-908.
- [17] CUI Y H, CHE Y, WANG H X. Bergamot essential oil attenuate aluminum-induced anxiety-like behavior through antioxidant, anti-inflammatory and GABA regulation in rats[J/OL]. Food and chemical toxicology, 2020, 145: 111766[2021-09-24]. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111766>.
- [18] MASHOQUE A R, AROKIASAMY J T, THAMILARASAN M, et al. Neuroprotective role of Asiatic acid in aluminium chloride induced rat model of Alzheimer's disease[J]. Frontiers in bioscience (scholar edition), 2018, 10: 262-275.
- [19] KAR S, SLOWIKOWSKI S P M, WESTAWAY D, et al. Interactions between beta-amyloid and central cholinergic neurons: implications for Alzheimer's disease[J]. Journal of psychiatry & neuroscience : JPN, 2004, 29(6): 427-441.
- [20] TUNDIS R, LOIZZO M R, BONESI M, et al. Comparative study on the antioxidant capacity and cholinesterase inhibitory activity of *Citrus aurantifolia* Swingle, *C. aurantium* L., and *C. bergamia* Risso and Poit. peel essential oils[J]. Journal of food science, 2012, 77(1): H40-H46.
- [21] SADIKI F Z, IDRISSE M E, CIOANCA O, et al. *Tetraclinis articulata* essential oil mitigates cognitive deficits and brain oxidative stress in an Alzheimer's disease amyloidosis model[J]. Phytomedicine, 2019, 56: 57-63.
- [22] REHMAN M U, TAHIR M, KHAN A Q, et al. D-Limonene suppresses doxorubicin-induced oxidative stress and inflammation via repression of COX-2, iNOS, and NF κ B in kidneys of Wistar rats[J]. Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.), 2014, 239(4): 465-476.
- [23] SHIN M, LIU Q F, CHOI B, et al. Neuroprotective effects of limonene (+) against $A\beta_{42}$ -induced neurotoxicity in a *Drosophila* model of Alzheimer's disease[J]. Biological & pharmaceutical bulletin, 2020, 43(3): 409-417.
- [24] BOIANGIU R S, BRINZA I, HANCIANU M, et al. Cognitive facilitation and antioxidant effects of an essential oil mix on scopolamine-induced amnesia in rats: molecular modeling of *in vitro* and *in vivo* approaches[J/OL]. Molecules, 2020, 25(7): 1519[2021-09-24]. <https://doi.org/10.3390/molecules25071519>.
- [25] SABOGAL-GUÁQUETA A M, OSORIO E, CARDONA-GÓMEZ G P. Linalool reverses neuropathological and behavioral impairments in old triple transgenic Alzheimer's mice[J]. Neuropharmacology, 2016, 102: 111-120.
- [26] CAPUTO L, PICCIALLI I, CICCONE R, et al. Lavender and coriander essential oils and their main component linalool exert a protective effect against amyloid- β neurotoxicity[J]. Phytotherapy research, 2021, 35(1): 486-493.

Neuroprotective effects of smelling bergamot essential oil on mice with Alzheimer's disease

HU Huiyan, REN Jingnan, LI Xiao, PAN Siyi, FAN Gang

College of Food Science and Technology/Ministry of Education Key Laboratory of Environment Correlative Dietology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Bergamot essential oil (BEO) is a very common citrus essential oil, which is widely used in the cosmetics and food industries. At the same time, it has a good effect on improving the mood of mice and anti-inflammatory and analgesic as well. This article evaluated the neuroprotective effects of inhaling BEO for various times on mice with Alzheimer's disease induced by *D*-galactose (*D*-gal) and aluminum trichloride (AlCl_3). Healthy male Kunming mice received *D*-gal (120 mg/kg, intraperitoneal injection) and AlCl_3 (10 mg/kg, intraperitoneal injection) for 49 days were used to establish an Alzheimer's disease model. On the 29th day, the positive group received donepezil hydrochloride (oral), the sniffing group inhaled BEO for 1 h or 2 h for 21 d. After treatment, the cognitive behavior of the mice was evaluated by Y-maze and open field test (OFT), and the changes in brain biochemistry were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The results of behavioral studies showed that *D*-gal and AlCl_3 significantly reduced spontaneous alternation and motor activities, indicating that the cognitive ability of mice was impaired. The results of biochemical studies showed that *D*-gal and AlCl_3 significantly increased the degree of oxidation stress, the number of inflammatory factors and the content of acetylcholinesterase (AChE). However, the cognitive behavioral impairment and the changes of biochemical indexes of the mice in the 2 h sniffing group were significantly improved. It is indicated that inhalation of BEO for 21 d, especially in the 2 h sniffing group, can significantly reduce the behavioral disorders and biochemical damage caused by *D*-gal and AlCl_3 .

Keywords Alzheimer's disease (AD); bergamot essential oil (BEO); oxidative stress; inflammatory factors; acetylcholinesterase (AChE); aromatherapy

(责任编辑:赵琳琳)