

香柠檬精油对子代自闭症大鼠焦虑行为与认知能力的影响研究

王舒婷¹, 张楠², 姚雷^{2*}¹上海交通大学 农业与生物学院;²上海交通大学 设计学院, 上海 200240

摘要:为研究香柠檬精油对自闭症大鼠焦虑行为与认知能力的作用,本实验采用SD大鼠制备自闭症动物模型,GC-MS分析香柠檬精油的挥发性化学成分,对造模成功的大鼠嗅吸精油治疗,通过行为学实验和脑内神经递质变化来研究精油功效。研究发现中浓度香柠檬精油显著增加模型鼠在旷场实验中的运动总路程与中央区探索时间,以及高架十字迷宫中探索开臂的次数百分比,在三箱社交实验和第二次Morris水迷宫中,嗅吸香柠檬精油的子代模型鼠社交与学习记忆能力有改善趋势,但未呈现出显著性差异。嗅吸中浓度香柠檬精油显著降低海马区与前额叶皮层中多巴胺、5-羟色胺含量,提高海马区多巴胺相对代谢率和前额叶皮层中5-羟色胺相对代谢率。嗅吸香柠檬精油可以减少模型鼠的焦虑行为,其作用可能与调节大鼠海马区与前额叶皮层中的5-羟色胺以及多巴胺的代谢有关。

关键词:自闭症;焦虑;认知行为;香柠檬精油;多巴胺;5-羟色胺

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)7-1124-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.7.006

Effects of bergamot essential oil on anxiety and cognitive ability in offspring autistic rats

WANG Shu-ting¹, ZHANG Nan², YAO Lei^{2*}¹School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University;²School of Design, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract:To study the effects of bergamot oil on relieving anxiety and improving cognitive ability in autistic rats, a model of autism of SD rats were established. GC-MS method was used to analyze the volatile chemical constituents of the bergamot oil. The offspring of the model group were used in the essential oil function evaluation study. The offspring received the essential oil or control treatment by inhalational ways. The effects of bergamot oil odor were evaluated by behavioral experiments, the changes of neurotransmitters in different brain regions were also detected. The results showed that the bergamot essential oil could significantly increase the total distance and central area exploration time of the rats in open field tests, as well as the percentage of entries into the open arms in the elevated plus maze tests compared to the control treatment. In the three-chambered social test and Morris water maze test, the bergamot essential oil treated group showed an improvement in social and cognitive abilities, but did not show significant differences compared to the control treatment group. Compared to the control treatment, the bergamot essential oil treatment reduced the content of dopamine and 5-hydroxy tryptamine in the hippocampus and prefrontal cortex, and increased the relative metabolic rate of dopamine in the hippocampus and the relative metabolic rate of 5-hydroxy tryptamine in the prefrontal cortex. In a conclusion, bergamot oil showed anti-anxiety effects in the autism model. The effects might be related to the regulation of 5-hydroxy tryptamine and dopamine in hippocampus and prefrontal cortex.

Key words: autism; anxiety; cognitive behaviors; bergamot oil; dopamine; 5-hydroxy tryptamine

自闭症 (autism 或 autistic disorder), 是一类具有生物基础、持续性的发育障碍类疾病, 属于自闭症谱系障碍 (autism spectrum disorder, ASD) 中较严重的

发病状况^[1]。我国有严重自闭症患者约 65 万, 症状较轻者约有 500 多万^[2]。自闭症患者常在社交沟通方面出现障碍, 出现刻板行为, 学习能力下降伴随焦虑、癫痫^[1]。据报道, 约有三分之一的自闭症患者都患有高 5-羟色胺血症^[3]。近年来, 自闭症发病率不断增高且覆盖率高, 正在引起世界各国的重视。

收稿日期: 2020-01-07

接受日期: 2020-05-21

基金项目: 植物精油对自闭症谱系障碍的辅助治疗研究项目 (18H2H22000127)

* 通信作者 Tel: 86-013801837763; E-mail: yaolei@sjtu.edu.cn

药物治疗可在一定程度上控制自闭症一些临床症状,并且利用行为治疗及一些辅助疗法的配合实施可以起到一定的治疗效果^[4],但具有一定的副作用^[5]。苯丙异恶唑类衍生物利培酮于2006年被美国食品及药品管理局批准用于自闭症的治疗,是第一个用于治疗自闭症的抗精神病药物。其主要通过调控5-羟色胺与多巴胺系统发挥作用^[6],目前被较多的应用于儿童自闭症的临床治疗中^[7]。除精神类药物外,目前也有不少补充与辅助疗法应用于自闭症的治疗中^[8]。

精油提取自芳香植物,具有分子量小、吸收快、接受度高的特点。已有大量研究证明精油可以通过嗅觉通路作用于中枢神经系统,快速达到缓解焦虑、抑郁情绪及改善认知障碍的作用^[9]。香柠檬精油提取自芸香科柑橘属植物香柠檬(*Citrus aurantium bergamia*)的果皮,化学成分以单萜烯、单萜醇、酯类为主,是一种在芳香疗法中常被用于缓解焦虑情绪的精油^[10]。

丙戊酸钠(valproic acid, VPA)模型是经典的自闭症动物模型。Gentile^[11]报道了母体孕期暴露于VPA环境容易诱发胎儿产生自闭症。Narita证实孕鼠暴露在VPA环境导致其子代鼠海马区5-羟色胺浓度升高,认为给药后的孕鼠可以作为有用的自闭症生化模型^[12]。目前已有不少研究通过在孕鼠怀孕第12.5天时单次腹腔注射VPA来建立自闭症动物模型^[13]。同时从体重、尾长、前庭运动、嗅觉、睁眼等发育学指标上评价了模型的可靠性,认为VPA诱导的子代自闭症大鼠模型是复制率较稳定的一种造模方式,具有良好的表现效度和结构效度。同时有学者采用该模型评价了一些天然产物对于缓解自闭症症状的作用^[9,10]。

本研究采用VPA诱导建立子代自闭症大鼠模型,研究嗅闻香柠檬精油对子代自闭症大鼠焦虑行为以及认知能力的影响,同时探讨嗅闻香柠檬精油可能影响的神经递质通路,为香柠檬精油在缓解自闭症症状的应用中提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

成年SD大鼠(SPF级),♂体重 300 ± 20 g,♀体重 260 ± 20 g,经上海交通大学实验动物中心购买于北京维通利华实验动物技术有限公司。实验动物均饲养于上海交通大学实验动物中心饲养间,光照条件为昼夜循环光照(12 h/12 h),环境温度为 25 ± 1 °C,相对湿度为 $50\% \pm 5\%$,大鼠自由摄食及饮水,

环境安静卫生。实验中所涉及的动物的使用和实验方案均符合国际实验动物评估和评审委员会的动物使用标准,实验方案已经通过上海交通大学实验动物保护和和使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)的审核, IACUC 许可编号为A2018084。

1.2 主要试剂

给药试剂:VPA(美国Sigma公司, P1427113), 香柠檬精油(上海交通大学芳香植物研发中心提供),山茶籽油(上海交通大学芳香植物研发中心提供),利培酮(risperidone, RIS, 西安杨森制药有限公司),生理盐水(上海源叶生物科技有限公司)。

样品处理液试剂:高氯酸(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司),乙二胺四乙酸二钠(EDTA- Na_2 , 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司),乙酸钠(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司),柠檬酸(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司),磷酸氢二钾(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司),L-半胱氨酸(分析纯, TCI化成工业发展有限公司),1-庚烷磺酸钠(色谱纯, 上海凌峰化学试剂有限公司),甲醇(色谱纯, 上海安谱实验科技股份有限公司)。

单胺类神经递质标准品:多巴胺(dopamine, DA, 美国Sigma-Aldrich公司)标准品,5-羟基色胺(5-hydroxy tryptamine, 5-HT, 美国Sigma-Aldrich公司)标准品,5-羟基吲哚乙酸(5-hydroxyindole-3-acetic acid, 5-HIAA, 美国Sigma-Aldrich公司)标准品,高香草酸(homovanillic acid, HVA, 美国Sigma-Aldrich公司)。

1.3 主要仪器

扩香器(市售超声扩香机);自制不锈钢熏香装置($36 \text{ cm} \times 24 \text{ cm} \times 25 \text{ cm}$):由下侧熏香室($18 \text{ cm} \times 24 \text{ cm} \times 25 \text{ cm}$)与上侧闻香室($18 \text{ cm} \times 24 \text{ cm} \times 25 \text{ cm}$)构成,两室中间有一隔板,隔板中间有一圆形小孔,供扩香器挥发香气至闻香室。

气相色谱-质谱联用仪(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS, 美国安捷伦公司, 7890B-5977A);程控水迷宫(中国医学科学院药物研究所, SMG-2);旷场实验装置及分析软件(上海欣软信息科技有限公司, XR-XZ301);高架十字迷宫装置及分析软件(上海欣软信息科技有限公司, XR-XG201);三箱社交装置及分析软件(上海欣软信息科技有限公司, XR-XJ117);高速冷冻离心机(德国Sigma公司, 3K15);超声波细胞破碎仪(上海净信实业发展

有限公司, XM-650T); 液相色谱-荧光检测器(美国 Waters 公司, e2695/2475)。

1.4 香柠檬精油成分分析

采用气相色谱-质谱联用法分析香柠檬精油的化学成分。气相色谱条件: DB-WAX (30 m × 250 μm, 0.25 μm) 色谱柱, 进样前 10 μL 样品以 500 μL 乙醇和 500 μL 正己烷稀释, 载气为高纯氮气 (99.999%), 程序升温 (50 °C 维持 3 min, 随后以 4 °C/min 升至 120 °C, 维持 10 min, 再以 2 °C/min 升至 220 °C, 维持 2 min), 进样口 260 °C, 载气流速 1 mL/min, 进样量 1.0 μL, 分流比: 10:1。

质谱条件: 离子源: 230 °C; 四级杆: 150 °C; 电离方式: EI⁺, 70 eV; 检测器电压: 2 047 V; 扫描方式: 全扫描。

1.5 自闭症大鼠模型及分组处理

动物模型制备参照 Schneider^[13] 的造模方法。SD 雌、雄鼠合笼过夜后, 采用阴道涂片法发现精细胞记为妊娠第一天。把孕鼠分为两组, 对照组与 VPA 组 (模型组)。VPA 组在妊娠 12.5 天按 600 mg/kg 剂量单次腹腔注射 VPA, 同时给予对照组注射等量生理盐水。对照组孕鼠所产子代鼠为正常对照组, VPA 组所产子代鼠为模型组。从体重、尾长、睁眼指标, 以及趋向、寻巢、游泳速度、学习记忆七个指标评价模型制备成功。

造模完成后, 从模型组子代鼠随机选择 52 只进行实验并分组: VB1 组 (香柠檬低浓度组) 11 只、VB2 组 (香柠檬中浓度组) 9 只、VB3 组 (香柠檬高浓度组) 10 只、VRIS 组 (利培酮组) 6 只、VC 组 (模型对照组) 8 只, 另设 NC 组 (正常对照组) 8 只。

1.6 给药方式

香柠檬组: 将 100% 香柠檬精油放入超声扩香器中, 扩香器按照 18 mg/min 的流速分别熏香 30 s, 熏香 90 s, 熏香 180 s, 平衡 2 min, 制得香柠檬低浓度组 (0.42 μg/mL)、香柠檬中浓度组 (1.25 μg/mL)、香柠檬高浓度组 (2.5 μg/mL) 的薰香环境。实验中, 将香柠檬精油装入扩香器, 将扩香器放入下侧熏香室, 根据不同浓度组别, 分别熏香 30、90、180 s, 待其平衡 2 min 后, 将实验动物放入上侧闻香室, 自由探索 10 min 后将实验动物取出。

模型对照组、正常对照组: 将山茶籽油装入扩香器, 将扩香器放入下侧熏香室, 采用弱档, 熏香 30 s, 待其平衡 2 min 后, 将实验动物迅速放入上侧闻香室, 自由探索 10 min 后将实验动物取出。

利培酮组: 利培酮试剂按照 1 mg/kg 的浓度进行腹腔注射给药。

以上各组均在出生后第 33 ~ 39 天每天相同时间段给药, 一天一次。

1.7 发育学及行为学观察

1.7.1 发育学观测

1.7.1.1 体重观测

在子代鼠出生第 7、14、21、28、35 天分别检测体重情况并记录。

1.7.1.2 尾巴长度测量

在子代鼠出生后第 7、14、21、28 天分别测量尾巴长度并记录。

1.7.1.3 趋向实验

在子代鼠出生第 7 ~ 11 天进行趋向实验。将幼鼠放置在 25° 表面光滑的倾斜板上, 头部向下, 将幼鼠头部由朝下转为头方向向上所需时间记为潜伏期时间, 若实验动物转头时间超过 30 s, 统一记为 30 s。

1.7.1.4 寻巢实验

在子代鼠出生第 9 ~ 11 天进行寻巢实验。将幼鼠放置在一个 290 mm × 178 mm × 160 mm 的塑料容器, 分别在两端放置幼鼠所在窝别的垫料 (至少使用 3 天) 和干净垫料, 保证垫料所占区域据基本相当, 观察幼鼠头和前爪进入垫料所在区域最前方所用的时间, 将幼鼠从放入容器计时到找到所在窝垫料的时间用潜伏期表示。若实验动物超过 300 s, 统一记为 300 s。

1.7.1.5 睁眼观测

在子代鼠出生第 12 ~ 16 天观察计算各组睁眼得分情况: 两眼均未睁记为 0; 一睁一闭记为 1; 两眼均睁记为 2。

1.7.2 Morris 水迷宫实验

在子代鼠出生第 28 ~ 32 天进行第一次 Morris 水迷宫实验, 评价模型组与正常对照组认知能力的差异; 在完成给药干预、三箱社交实验测试后, 即子代鼠出生后第 37 ~ 40 天, 进行第二次 Morris 水迷宫实验, 评价不同给药干预对模型鼠认知行为的影响。

Morris 水迷宫是直径为 150 cm, 深度为 32 cm 的圆形水池, 实验前注入清水, 水深约为 20 cm, 且水温保持在 22 ± 1 °C, 在清水中加入墨水混合均匀。迷宫分为四个象限, 在其中一个象限中放置直径为 10 cm 的白色圆形平台, 迷宫上方安置与计算机相连的摄像机, 同步记录实验动物的运动轨迹。水迷宫分为训练阶段一定位航行实验和测试阶段一空间

探索阶段。

1.7.2.1 训练阶段即定位航行实验持续 3~4 天,每天实验动物进行三轮实验,每次实验间隔 15~20 min,每次随机更换入水点,三个入水点分布在剩余三个象限中。每次训练将实验动物从入水点放入迷宫,在 1 min 的时间内让其寻找平台并记录其找到平台的时间,如果在 1 min 内实验动物未能成功找到平台则人为将其引导到平台上并待 10 s 后取出。

1.7.2.2 训练期结束后一天为测试阶段,即空间探索实验,将平台去掉,并让实验动物在迷宫中摸索 1 min,入水点位于平台的相对象限且保证与之前平台的距离为最长。

观测指标:测试阶段观测实验动物的穿越平台次数、平均速度、原平台象限运动路程/总路程、原平台象限游泳时间/总时间、平台周边区域总路程以及平台周边区域总时间。

1.7.3 旷场实验

子代鼠出生后第 33 天,在不同处理组熏香 10 min 后或腹腔注射利培酮 30 min 后进行旷场实验。旷场装置(100 cm × 100 cm × 100 cm)为上方开敞,五面围合的箱体,箱子顶部安装录像监控器来录制动物的活动情况,将实验动物放入箱体中央并开始计时,采用摄像头记录动物在 5 min 内的自由活动,并记录其在中央区域内停留时间。

1.7.4 高架十字迷宫实验

在子代鼠出生后第 34 天,在不同处理组熏香 10 min 后或腹腔注射利培酮 30 min 后进行高架十字迷宫实验。高架十字迷宫装置包括两个 50 cm × 10 cm 的相对开臂和两个 50 cm × 10 cm × 40 cm 的相对闭臂。迷宫中央有一 10 cm × 10 cm 的开阔部,迷宫距离地面 50 cm。

将实验动物放入迷宫中央并开始计时,观察动物在 5 min 内的自由活动,并记录其进入开臂次数、进入闭臂次数、开臂停留时间与闭臂停留时间:

进入开臂的次数百分比 =

$$\frac{\text{进入开臂次数}}{\text{进入开臂次数} + \text{进入闭臂次数}} \times 100\%$$

进入开臂的停留时间百分比 =

$$\frac{\text{开臂停留时间}}{\text{开臂停留时间} + \text{闭臂停留时间}} \times 100\%$$

1.7.5 三箱社交实验

在子代鼠出生后第 35 天,在不同处理组熏香 10 min 后或利培酮腹腔注射 30 min 后进行三箱社

交实验。三箱社交实验装置(120 cm × 60 cm × 40 cm)由三个矩形箱组成,每个箱子规格为 60 cm × 40 cm × 40 cm,每个箱子之间的分隔板中间有通道使三箱相通,左侧箱和右侧箱的中央各放一个规格一致的束缚笼。实验装置上方安装录像监控器,记录动物在三箱中的活动情况。

将实验动物放置在没有放置束缚笼的中间箱体并开始计时,观察动物在 10 min 内的自由活动。在测试阶段 1,在左边箱束缚笼中放入一陌生大鼠,右边束缚笼空置,将两扇活动门打开,让实验动物自由探索 10 min。在测试阶段 2,在右边箱束缚笼中放入一陌生大鼠,让实验动物继续自由探索 10 min。分别记录实验动物在两个测试阶段嗅探束缚笼 1 和束缚笼 2 的时间。

1.8 液相色谱-荧光检测大鼠脑区多巴胺、5-羟色胺、5-羟基吲哚乙酸、高香草酸的含量

第二次水迷宫实验结束后,剥离大鼠海马和大脑皮层,放入-80 °C 冰箱保存备用。样品经组织裂解液(0.6 mol/L 高氯酸,0.5 mmol/L EDTA-Na₂, 0.1 g/L L-半胱氨酸混合水溶液)处理后,经超声波细胞破碎机粉碎匀浆,冷冻离心取上清液,上清液加入沉降剂溶液(1.2 mol/L 磷酸氢二钾,2 mmol/L EDTA-Na₂ 混合水溶液)处理后,冰浴静置后经冷冻离心,过滤得到样品处理液。

液相色谱采用 Synchronis C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm,5.0 μm,美国 Thermo),以柠檬酸-乙酸钠缓冲液为流动相溶液,流速为 0.8 mL/min,进样体积为 10 μL,荧光检测器的激发波长和发射波长分别为 280 和 330 nm。

精确称取 DA、5-HT、5-HIAA 和 HVA 四种单胺类神经递质标准品,分别用标准品稀释溶液(0.01 mol/L 高氯酸,0.5 mmol/L EDTA-Na₂,0.1 g/L L-半胱氨酸混合水溶液)溶解稀释得到 25 μg/mL 的标准品储备原液;检测前将各标准品储备原液进一步稀释,混合,依次制得 10、7.5、2.5、0.25、0.2、0.15、0.1 μg/mL 的混合标准品溶液。以标准品进样质量浓度 X(μg/mL)对峰面积 Y 建立标准曲线,根据标准曲线计算大鼠海马区与前额叶皮层中 DA、5-HT、5-HIAA 和 HVA 的含量。

1.9 统计学分析

采用 spss25.0 统计分析软件,所有计量资料以均数 ± 标准误($\bar{x} \pm SE$)表示,图 1 处理组数据采用双因素方差分析,以及 Sidak's multiple comparisons

test 进行事后检验。其余图表处理组数据均采用单因素方差分析,组间比较采用 Duncan 检验, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 香柠檬精油的化学成分

GC-MS 结果显示香柠檬精油中相对面积大于

0.5% 的化学成分共有 10 种。包括萜烯、醇类以及酯类化合物,其中萜烯类占 55.82%,酯类占 29.82%,醇类占 11.19%,主要成分为 (+)-柠檬烯 (37.76%),乙酸芳樟酯 (28.87%),芳樟醇 (11.19%), γ -萜品烯 (7.22%) 以及 (1S)-(-)- β -蒎烯 (4.78%)。

表 1 香柠檬精油 GC-MS 化学成分分析结果

Table 1 Results of chemical constituents of bergamot oil by GC-MS

保留时间 Retention time (min)	化合物名称 Compound name	分子式 Molecular formula	相对含量 Relative content (%)
4.15	d- α -蒎烯	C ₁₀ H ₁₆	1.87
4.23	α -侧柏烯	C ₁₀ H ₁₆	0.58
5.94	(1S)-(-)- β -蒎烯	C ₁₀ H ₁₆	4.78
6.27	桉烯	C ₁₀ H ₁₆	0.95
7.46	月桂烯	C ₁₀ H ₁₆	1.02
8.61	(+)-柠檬烯	C ₁₀ H ₁₆	37.76
9.91	γ -萜品烯	C ₁₀ H ₁₆	7.22
19.49	芳樟醇	C ₁₀ H ₁₈ O	11.19
19.87	乙酸芳樟酯	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	28.87
24.50	β -甜没药烯	C ₁₅ H ₂₄	1.64

注:表中编号以保留时间顺序排序,化学成分相对含量 > 0.5%。

Note: The numbers in the table are sorted in the order of retention time, and the chemical component of relative content > 0.5%.

2.2 造模后发育学与行为学观测结果

2.2.1 发育学观测结果

根据发育学观测结果(图 1),正常对照组实验动物体重大于模型对照组实验动物,与正常组相比,模型组大鼠在出生后第 35 天的体重显著减少了 5.86 ± 2.19 g ($P < 0.05$)。

正常对照组实验动物尾巴长于模型对照组实验动物,与正常组相比,模型组大鼠在出生后第 7、14、21、28 天的尾巴长度分别显著减少了 0.53 ± 0.11 cm ($P < 0.01$)、 0.88 ± 0.11 cm ($P < 0.01$)、 1.33 ± 0.11 cm ($P < 0.01$)、 1.62 ± 0.11 cm ($P < 0.01$)。

正常对照组实验动物趋向实验潜伏期短于模型对照组实验动物,与正常组相比,出生后第 7 天的模型组大鼠潜伏期延长了 3.67 ± 1.22 s ($P < 0.05$),出生后第 8、9、10 天的模型组大鼠潜伏期分别显著延长了 4.28 ± 1.22 s ($P < 0.01$)、 3.81 ± 1.22 s ($P < 0.01$)、 4.81 ± 1.22 s ($P < 0.01$); 出生后第 11 天的模型组大鼠潜伏期延长了 2.75 ± 1.22 s ($P < 0.05$)。

正常对照组实验动物寻巢实验潜伏期短于模型对照组实验动物,模型组实验动物嗅觉发育较正常

组发育迟缓。与正常组相比,出生后第 10 天的模型组大鼠寻巢实验潜伏期显著延长了 52.45 ± 15.62 s ($P < 0.01$)。

正常对照组实验动物的睁眼分数高于模型对照组实验动物,与正常组相比,出生后第 13 天的模型组大鼠睁眼得分显著减少了 0.24 ± 0.08 ($P < 0.05$)。

2.2.2 行为学观测结果

由表 2 可知,在第一次 Morris 水迷宫测试期,与正常对照组相比,模型组实验动物每分钟穿越平台次数明显减少了 0.44 ± 0.19 次 ($P < 0.05$),平均速度明显下降 7.01 ± 1.54 cm/s ($P < 0.01$),平台所在象限停留时间比率明显减少 $4.76\% \pm 1.60\%$ ($P < 0.01$),平台所在象限运动路程比率明显减少 $4.81\% \pm 1.45\%$ ($P < 0.01$),平台周边区域总路程明显减少 275.09 ± 58.44 cm ($P < 0.01$),平台周边区域总时间明显减少 4.44 ± 1.75 s ($P < 0.05$)。

2.3 旷场实验结果

在旷场实验中(图 2),与模型对照组相比,利培酮组的运动总路程显著提高了 6.44 ± 3.05 m ($P < 0.05$),香柠檬中浓度组实验动物的运动总路程明

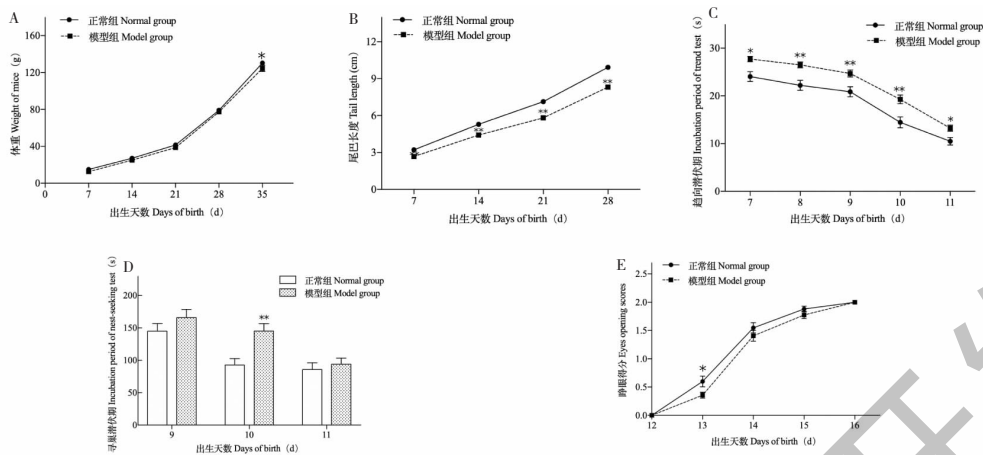


图 1 两组实验动物发育学结果比较 (n = 75 ~ 84)

Fig. 1 Comparison of developmental results between the two groups (n = 75-84)

注:与正常对照组相比, * P < 0.05, ** P < 0.01。 Note: Compared with normal control group, * P < 0.05, ** P < 0.01.

表 2 模型对照组与正常对照组实验动物在 Morris 水迷宫中的行为学差异 ($\bar{x} \pm SE, n = 75 \sim 84$)

Table 2 Behavioral differences between model control group and normal control group in Morris water maze ($\bar{x} \pm SE, n = 75-84$)

组别 Group	穿越平台次数 Frequencies of crossing platform	平均速度 Average swimming speed (cm/s)	原平台象限 Original platform quadrant		平台周边区域 Area around the platform	
			停留时间比率 Percentage of the residence time (%)	运动路程比率 Percentage of the moving distance (%)	周边总路程 Total distance of surrounding area (cm)	周边总时间 Total time of surrounding area (s)
正常组 Normal group	1.57 ± 0.15	33.70 ± 1.02	22.47 ± 1.09	26.49 ± 1.00	1 101.30 ± 41.13	30.43 ± 1.18
模型组 Model group	1.13 ± 0.13	26.70 ± 1.11	17.72 ± 1.14	21.68 ± 1.02	826.21 ± 40.69	25.99 ± 1.25
P	0.023	0.000	0.003	0.001	0.000	0.012

显提高了 9.58 ± 3.00 m ($P < 0.01$), 香柠檬高浓度组的实验动物运动总路程显著提高了 6.86 ± 3.00 m ($P < 0.05$), 香柠檬中浓度组实验动物的中央区域

停留时间明显延长 11.60 ± 5.16 s ($P < 0.05$)。利培酮组、香柠檬低、高浓度组实验动物在中央区域停留时间与路程较模型对照组均有一定程度增加。

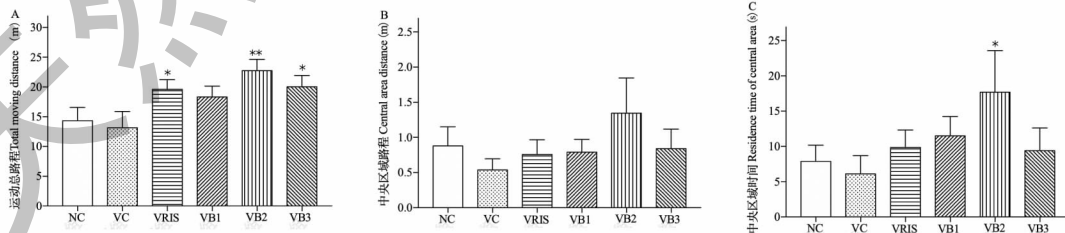


图 2 各处理对子代鼠在旷场模型中行为的影响 (n = 6 ~ 11)

Fig. 2 Effects of treatments on the behavior of offspring rats in an open field model (n = 6-11)

注:NC-正常对照组;VC-模型对照组;VRIS-利培酮组;VB1-香柠檬低浓度组;VB2-香柠檬中浓度组;VB3-香柠檬高浓度组。与模型对照组相比, * P < 0.05, ** P < 0.01。下同。 Note:NC: Normal control group;VC: Model control group;VRIS: Risperidone model group;VB1: Low concentration bergamot essential oil model group;VB2: Medium concentration bergamot essential oil model group;VB3: High concentration bergamot essential oil model group. Compared with VC group, * P < 0.05, ** P < 0.01. The same below.

2.4 高架十字迷宫实验结果

在高架十字迷宫实验中(图3),与模型对照组相比,香柠檬中浓度组的实验动物进入开臂次数百分比

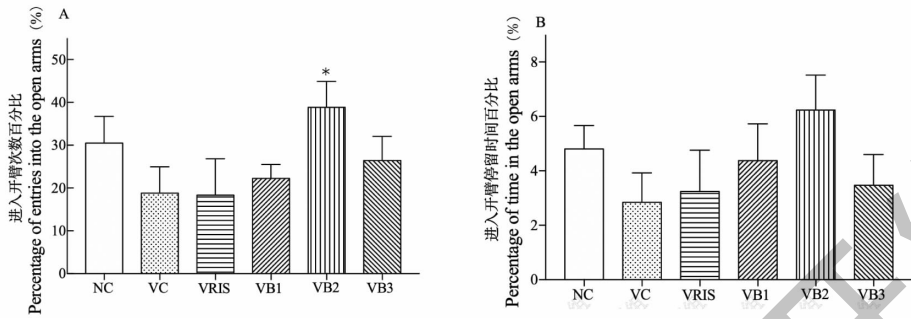


图3 各处理对子代鼠在高架十字迷宫模型中焦虑行为的影响($n=6\sim 11$)

Fig. 3 Effects of treatments on anxious behavior of offspring rats in elevated plus maze test ($n=6-11$)

2.5 三箱社交实验结果

在三箱社交实验中(图4),模型对照组与正常对照组相比,在测试阶段一中与左边陌生物体的接触路程显著下降 $20.34\% \pm 5.38\%$ ($P < 0.01$)。在

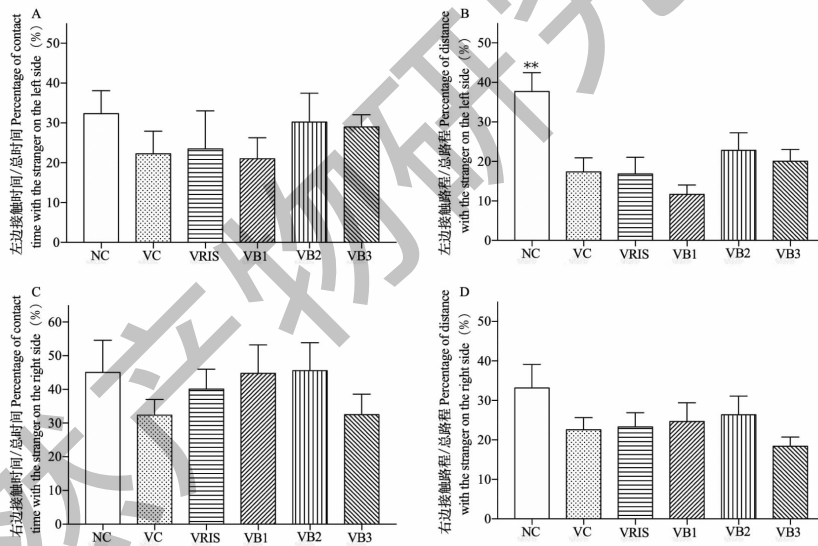


图4 各处理对子代鼠在三箱社交模型中社交行为的影响($n=6\sim 11$)

Fig. 4 Effects of treatments on social behavior of offspring rats in the three-chambered social test ($n=6-11$)

2.6 第二次 Morris 水迷宫实验结果

在第二次水迷宫实验中(图5),模型对照组与正常对照组相比,测试期的平均游泳速度显著下降 9.81 ± 3.72 cm/s ($P < 0.05$)。利培酮组、香柠檬低、中、高浓度组的实验动物平均游泳速度较模型对照组均有一定程度增加。香柠檬低、中、高浓度组的实验动物每分钟穿越平台次数、平台周边区域一时间与路程百分比与模型对照组相比均有一定程度增

分比显著增加 $20.06\% \pm 8.04\%$ ($P < 0.05$)。香柠檬低、中浓度组的实验动物进入开臂停留时间百分比与模型对照组相比均有一定程度增加。

测试阶段二,利培酮组、香柠檬低、中浓度组实验动物接触右边陌生物体的时间与路程百分比比较模型对照组均呈现出增加趋势。

加,但没有呈现出显著性差异。

2.7 液相色谱-荧光检测大鼠脑区多巴胺、5-羟色胺、5-羟基吲哚乙酸、高香草酸含量结果

通过表3检测结果可知,模型对照组与正常对照组实验动物相比,海马区的5-HT含量显著上升 469.23 ± 173.71 ng/g ($P < 0.05$)。利培酮组、香柠檬中浓度组的DA含量较模型对照组分别显著下降 1736.29 ± 522.37 ng/g ($P < 0.05$)、 1446.59 ± 522.37

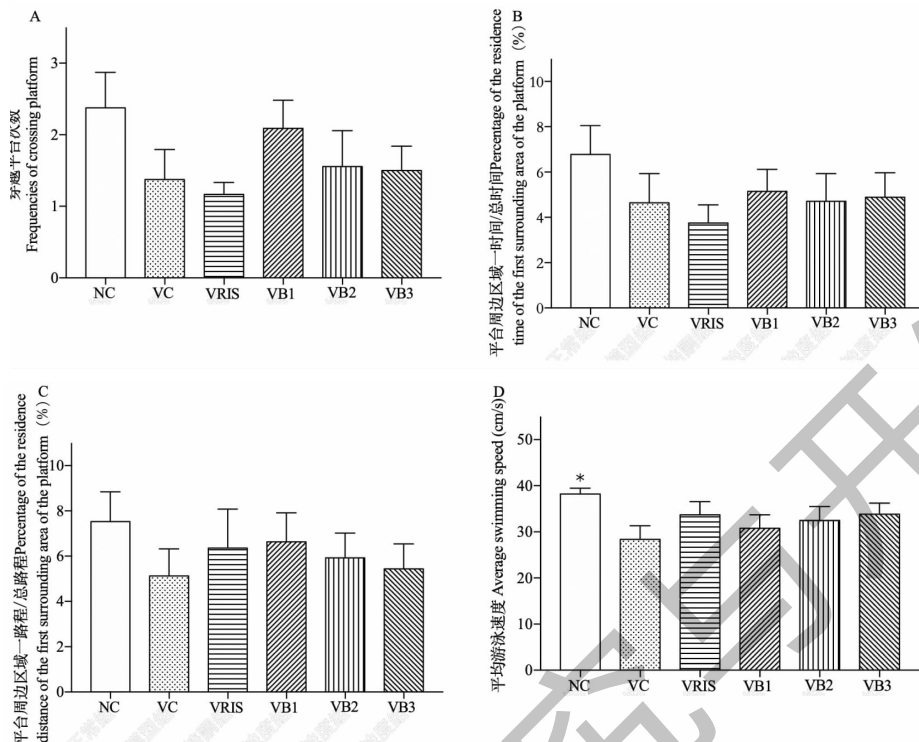


图5 各组第二次 Morris 水迷宫实验结果 (n=6~11)
Fig. 5 Results of second Morris water maze test of each group (n=6-11)

ng/g ($P < 0.05$)。香柠檬中浓度组的 5-HT 含量与模型对照组相比显著下降 424.63 ± 181.43 ng/g ($P < 0.05$)；利培酮组、香柠檬中浓度组的 DA 相对代谢率与模型组相比分别显著提高 $12.94\% \pm 4.01\%$

($P < 0.05$)、 $9.98\% \pm 4.01\%$ ($P < 0.05$)。利培酮组与香柠檬中浓度组的 5-HIAA 含量与 5-HT 相对代谢率与模型对照组相比均有一定程度下降,但与模型对照组相比没有呈现出显著性差异。

表3 各组海马区四种单胺类神经递质样品含量检测结果 ($\bar{x} \pm SE, n=6 \sim 9$)

Table 3 Detection results of four monoamine neurotransmitter samples in each group of hippocampus ($\bar{x} \pm SE, n=6-9$) (ng/g)

神经递质 Neurotransmitter	正常对照组 Normal control group	模型对照组 Model control group	利培酮组 Risperidone group	香柠檬中浓度组 Middle concentration bergamot model group
DA	6 450.42 ± 352.98	7 124.39 ± 355.84	5 388.10 ± 423.73 *	5 677.80 ± 454.64 *
5-HT	782.74 ± 117.03 *	1 251.97 ± 237.31	888.06 ± 55.79	827.34 ± 64.65 *
5-HIAA	131.96 ± 17.68	216.73 ± 52.05	168.49 ± 29.11	143.11 ± 18.34
HVA	2 355.76 ± 39.30	2 526.76 ± 32.04	2 553.98 ± 41.46	2 568.71 ± 194.09
HVA/DA	37.01 ± 1.81	35.86 ± 1.99	48.80 ± 4.54 *	45.84 ± 3.11 *
5-HIAA/5-HT	17.76 ± 2.59	21.35 ± 7.93	19.51 ± 4.11	17.85 ± 2.78

注: DA 相对代谢率 = $\frac{HVA}{DA} \times 100\%$, 5-HT 相对代谢率 = $\frac{5-HIAA}{5-HT} \times 100\%$ 。与模型对照组相比, * $P < 0.05$ 。下同。

Note: The relative metabolic rate of dopamine = $\frac{HVA}{DA} \times 100\%$, the relative metabolic rate of 5-hydroxy tryptamine = $\frac{5-HIAA}{5-HT} \times 100\%$. Compared with model control group, * $P < 0.05$. The same below.

通过表4检测结果可知,模型对照组与正常对照组实验动物相比前额叶皮层的 5-HT 与 HVA 浓度分别显著上升 426.83 ± 195.71 ng/g ($P < 0.05$)、 $1 083.35 \pm 499.93$ ng/g ($P < 0.05$)。香柠檬中浓度

组的 DA 浓度、HVA 浓度与 5-HT 浓度与模型对照组相比分别显著下降 $2 149.57 \pm 659.75$ ng/g ($P < 0.05$)、 $1 114.70 \pm 522.16$ ng/g ($P < 0.05$)、 564.52 ± 204.41 ng/g ($P < 0.05$)。香柠檬中浓度组的 5-

HT 相对代谢率与模型组相比显著上升 10.84% ± 4.04% ($P < 0.05$); 利培酮组的 DA 浓度、HVA 浓度与 5-HT 浓度较模型对照组均有一定程度下降; 利

培酮组、香柠檬中浓度组 5-HIAA 浓度较模型对照组均有一定程度下降, 但与模型对照组相比没有呈现出显著性差异。

表 4 各组前额叶皮层四种单胺类神经递质样品含量检测结果 ($\bar{x} \pm SE, n = 6 \sim 9$)

Table 4 Detection results of four monoamine neurotransmitter samples in each group of prefrontal cortex ($\bar{x} \pm SE, n = 6 \sim 9$) (ng/g)

神经递质 Neurotransmitter	正常对照组 Normal control group	模型对照组 Model control group	利培酮组 Risperidone group	香柠檬中浓度组 Middle concentration bergamot model group
DA	6 738.90 ± 109.98	7 679.60 ± 460.43	6 642.01 ± 803.75	5 530.03 ± 403.77 *
5-HT	822.39 ± 107.15 *	1 249.22 ± 158.03	933.31 ± 129.94	684.70 ± 36.80 *
5-HIAA	140.70 ± 25.62	146.99 ± 38.61	127.14 ± 17.27	145.69 ± 26.09
HVA	3 052.71 ± 151.29 *	4 136.06 ± 440.60	3 233.77 ± 374.41	3 021.36 ± 415.06 *
HVA/DA	45.42 ± 2.58	53.35 ± 3.64	48.86 ± 2.10	55.44 ± 7.38
5-HIAA/5-H	16.88 ± 1.42	11.10 ± 2.06	14.10 ± 1.86	21.94 ± 4.76 *

3 讨论

本研究采用 Schneider^[13] 的造模方法, 对妊娠 12.5 天的孕鼠采用单次腹腔注射 VPA 600 mg/kg 制备了自闭症动物模型, 此方法已被许多研究学者用于自闭症病因及干预药物效果评价的研究^[9]。实验结果表明正常对照组与模型组在体重、尾长、趋向、寻巢、睁眼、游泳能力、学习记忆能力七个发育学及行为学指标上均呈现出显著性差异, 这表明造模是成功的。

利培酮早期是治疗精神分裂症的药物, 能够改善自闭症患者的语言、感知觉、行为等^[7], 在行为学水平上, 利培酮处理并没有有效减少模型动物的焦虑行为以及改善认知水平。这可能是因为利培酮并不是典型的抗焦虑药物, 在应用于临床焦虑症状的缓解治疗时, 通常都是与很多其他主流抗焦虑药物进行联用^[14], 另外也有文献报道过利培酮对于改善自闭症或痴呆模型中动物学习与记忆能力的作用不明显^[15]。已有研究表明利培酮通过作用于 DA 系统, 特别是多巴胺 D2 受体来调控 DA 含量, 使其恢复正常水平^[6]。本研究选取利培酮作为阳性对照药。神经递质检测结果表明利培酮组大鼠海马区 DA 神经递质含量与代谢水平均发生了显著性变化, 但是对于 5-羟色胺系统的影响并不显著, 这可能是造成利培酮无法有效改善模型动物焦虑行为与认知行为的原因。

香柠檬精油的挥发性活性物质主要为萜烯类、醇类、酯类, 已有许多研究发现萜烯类、醇类、酯类物质具有抗焦虑、抑郁^[16] 以及改善认知障碍^[9] 的作

用。本研究中, 香柠檬中浓度组处理可以显著提高大鼠在旷场中的运动总路程及中央区域停留时间, 提高大鼠在高架十字迷宫中探索开臂次数百分比, 这提示嗅吸该浓度香柠檬精油具有缓解子代自闭症大鼠焦虑行为的作用。在三箱社交实验和 Morris 水迷宫中, 嗅吸香柠檬精油干预的模型鼠的社交与学习记忆能力有改善趋势, 但与模型对照组相比未呈现出显著性差异。这提示在本研究中香柠檬精油改善模型鼠的社交与认知能力不是很明显。在很多文献中, 精油在不同浓度都呈现出了功效差异, 比如陈安琪的研究中低浓度与高浓度薰衣草精油缓解头痛效果好^[17], 佟琴琴的研究中中浓度的迷迭香抗抑郁效果最佳, 低浓度效果好于高浓度^[18]。这提示气味分子在不同浓度造成的气味编码不同可能是导致功效差异的原因之一^[19]。

DA、5-HT 是与焦虑和认知行为相关的单胺类神经递质^[20], HVA 和 5-HIAA 分别是 DA 和 5-HT 的代谢产物。多巴胺受体在脑内广泛表达, 参与调控中枢神经系统的多种生理功能。自闭症的发病症状与中枢神经系统多巴胺功能亢进有关^[21]。5-羟色胺系统起源于中脑的背侧缝际核群和正中缝际核群, 投射到黑质纹状体、边缘系统和皮质, 海马也有 5-羟色胺能神经元的存在。抑制 5-羟色胺能神经元的活性, 可以发挥抗焦虑功效。在本项研究中, 模型对照组与正常对照组相比海马与前额叶皮层区域的 5-HT 含量显著上升, 嗅吸香柠檬精油可以逆转这一变化。同时显著提高前额叶皮层中 5-HT 的代谢率以及海马中 DA 的代谢率。这提示嗅闻香柠檬精油

改善子代自闭症模型鼠焦虑行为的作用机制可能与调控 5-HT 和 DA 系统有关。

参考文献

- 1 Emerald DM. Essential oils and autism spectrum disorder (ASD) [J]. *Int J Pro Holist Aromather*, 2016, 5 (2): 19-30.
- 2 Chen P. Rehabilitation for autistic children [J]. *Chin Comm Doc (中国社区医师)*, 2011, 15 (13): 294-294.
- 3 Sarrouilhe D, Dejean C. Autism spectrum disorders and bisphenol A: is serotonin the lacking link in the chain? [J]. *Encephale*, 2016, 43: 402-404.
- 4 Bai BQ. New progress in autism drug treatment [J]. *Health Psychol J (健康心理学杂志)*, 2001, 9: 412-413.
- 5 Posey DJ, Aman MG, Arnold LE, et al. Randomized, controlled, crossover trial of methylphenidate in pervasive developmental disorders with hyperactivity [J]. *Arch Gen Psychiatry*, 2005, 62: 1266-1274.
- 6 Correia CT, Almeida JP, Santos PE, et al. Pharmacogenetics of risperidone therapy in autism: association analysis of eight candidate genes with drug efficacy and adverse drug reactions [J]. *Pharmacogenomics J*, 2009, 10: 418-430.
- 7 Pandina GJ, Bossie CA, Youssef E, et al. Risperidone improves behavioral symptoms in children with autism in a randomized, double-Blind, placebo-controlled trial [J]. *J Autism Dev Disord*, 2007, 37: 367-373.
- 8 Levy S, Mandell D, Schultz R. Autism [J]. *Lancet*, 2009, 374: 1627-1638.
- 9 He LM, Li GW, Wang M, et al. Magnolia volatile oil relieving learning and memory ability and neurotransmitters via olfactory pathway in Kunming mice with autism [J]. *Chin J Neuroanat (神经解剖学杂志)*, 2016, 32: 507-512.
- 10 Rombolà LT, Damiana S. Bergamot essential oil attenuates anxiety-like behaviour in rats [J]. *Molecules*, 2017, 22: 614-624.
- 11 Gentile S. Drug treatment for mood disorders in pregnancy [J]. *Curr Opin Psychiatr*, 2011, 24 (1): 34-40.
- 12 Narita N, Kato M, Tazoe M, et al. Increased monoamine concentration in the brain and blood of fetal thalidomide and valproic acid exposed rat: putative animal models for autism [J]. *Pediatr Res*, 2002, 52: 576-579.
- 13 Schneider T, Turczak J. Environmental enrichment reverses behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: issues for a therapeutic approach in autism [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2006, 31 (1): 36-46.
- 14 Wang C, Lin H, Huang YM. The clinical control study on the treatment of schizophrenia accompanied by risperidone with lorazepam combined with risperidone in the treatment of schizophrenia [J]. *World Latest Med Inform (世界最新医学信息文摘)*, 2017, 17 (95): 259-260.
- 15 Zhao T, Huang GB, Gao XL, et al. Different dose of amisulpride or risperidone's influence on the cognitive function of normal rat [J]. *J Clin Psychiat (临床精神医学杂志)*, 2018, 28 (3): 165-167.
- 16 Wang Y, Tao FY, Cui DH, et al. Study on the anti-depressant effect of compound essential oil [J/OL]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*: 1-14 [2020-04-19]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/51.1335.Q.20191216.1146.002.html>.
- 17 Chen AQ, Gong C, Sun JH. Smoothing effects of inhalation of different concentration of lavender essential oil on nitroglycerin-induced migraine rats [J]. *J Luzhou Med Coll (泸州医学院学报)*, 2015, 38: 465-468.
- 18 Tong SS. Antidepressant effect of the essential oil and the volatile organic compounds in air from rosemary and lemongrass [D]. *J Shanghai Jiaotong Univ: Agr Sci (上海交通大学学报: 农业科学版)*, 2009, 27 (1): 82-85.
- 19 Gupta N, Stopfer M. Olfactory coding: giant inhibitory neuron governs sparse odor codes [J]. *Curr Biol*, 2011, 21: 504-506.
- 20 Griebel G. 5-Hydroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety disorders: more than 30 years of research [J]. *Pharmacol Therapeut*, 1995, 65: 319-395.
- 21 Makkonen I, Riikonen R, Kokki H, et al. Serotonin transporter binding in children with autism determined by Spect [J]. *Dev Med Child Neurol*, 2008, 50: 593-597.