

胡慧艳, 文志强, 任婧楠, 等. 嗅闻佛手柑精油对阿尔兹海默症小鼠的神经行为的影响[J]. 华中农业大学学报, 2022, 41(4): 151-157.
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2022.04.019

嗅闻佛手柑精油对阿尔兹海默症小鼠的神经行为的影响

胡慧艳¹, 文志强², 任婧楠¹, 李晓¹, 范刚¹, 潘思轶¹, 张璐璐³

1. 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/
果蔬加工与品质调控湖北省重点实验室, 武汉 430070;

2. 湖北省畜牧良种场, 荆州 434010; 3. 河南工业大学粮油食品学院, 郑州 450001

摘要 为研究嗅闻不同浓度佛手柑精油对 *D*-gal 和 $AlCl_3$ 联合诱导的阿尔兹海默症模型小鼠的神经保护作用, 选用健康的雄性昆明小鼠, 通过腹腔注射 *D*-gal (120 mg/kg) 和 $AlCl_3$ (10 mg/kg) 持续 49 d 以建立阿尔兹海默症实验模型, 第 29 天起, 嗅闻试验组小鼠嗅闻 25% 或 75% 佛手柑精油, 每天 1 h, 持续 21 d, 嗅闻试验结束后评估小鼠行为和大脑生物化学的变化。行为学实验结果显示, 嗅闻佛手柑精油显著改善了阿尔兹海默症模型小鼠的认知障碍和探索性下降等症状。生化实验结果显示, 嗅闻 75% 佛手柑精油明显抑制了氧化应激的程度和乙酰胆碱酶活性的增加, 促进了小鼠认知能的提高。结果表明, 嗅闻 75% 佛手柑精油可以减轻 *D*-gal 和 $AlCl_3$ 引发的小鼠认知行为障碍和生化损伤。

关键词 佛手柑精油; 阿尔兹海默症; 氧化应激; 乙酰胆碱酶; 芳香疗法; 神经保护

中图分类号 R285; R277.7 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2022)04-0151-07

阿尔兹海默症 (Alzheimer's disease, AD) 被认为是一种不可逆的神经系统疾病, 其特点是细胞外 β -淀粉样蛋白 (β -amyloid, $A\beta$) 积累、突触破坏、细胞内神经元纤维缠结、大脑炎症和记忆丧失^[1]。一些研究表明, 氧化应激与 AD 的神经元损伤之间存在联系^[2]。此外, AD 患者还有胆碱能系统的功能减退症状, 这可能是胆碱能神经元的显著丧失、胆碱能神经元和轴突的异常以及突触后神经元对乙酰胆碱 (acetylcholine, Ach) 的可利用性降低引发的^[3]。目前采用的阿尔兹海默症治疗方法多以胆碱酯酶抑制剂为主, 但可能有加重中风或死亡的副作用^[4]。因此, 需要从自然来源中寻找更安全的替代品来提供神经保护^[5]。

佛手柑精油 (bergamot essential oil, BEO) 是来自佛手柑鲜果的一种重要的植物衍生物, 被广泛用于化妆品、医药和食品行业^[6]。随着 BEO 的广泛应用, 它的一些生物效应已经被发现, 如 BEO 可以减轻卡拉胶诱导的大鼠炎症^[7]。此外, 还有研究表明,

BEO 可以改善情绪、缓解压力引起的焦虑症状^[8-9]。之前的研究探讨了 BEO 不同嗅闻时间对 AD 小鼠模型的影响^[1], 在此基础上, 本研究通过行为学实验并测定氧化应激水平和乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AchE) 活性, 进一步评估 BEO 嗅闻浓度对 *D*-gal 和 $AlCl_3$ 诱导的 AD 小鼠认知功能障碍的缓解作用, 旨在为进一步应用芳香疗法治疗 AD 提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

佛手柑精油, 上海妙尔香料有限公司; *D*-gal 和无水氯化铝 ($AlCl_3$), 中国医药集团有限公司; 盐酸多奈哌齐, 卫材 (中国) 制药有限公司; 丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AchE) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GPX) 试剂盒, 上海优选生物科技有限公司。

收稿日期: 2021-12-16

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项 (2662020SPPY002); 湖北省重点研发计划项目 (2020BBA049)

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;电子天平,上海浦春计量仪器有限公司;高压蒸汽灭菌锅,上海申安医疗器械厂。

1.3 实验动物

35只SPF级4周龄的雄性昆明小鼠(KM),动物合格证号为SCXK(鄂)2020-0019,实验动物和饲料购自华中农业大学实验动物中心。日光灯人工照明(照明时间:08:00—20:00),温度(22±2)℃。小鼠自由饮水饮食。所有试验都得到了华中农业大学动物实验委员会的批准(伦理号为HZAUMO-2021-0047)。

1.4 方法

1)动物建模与分组。采用蒸馏水制备25%和75%的BEO稀释液。制备24 g/L的D-gal溶液和2 g/L AlCl₃的溶液。将上述D-gal和AlCl₃溶液等体积混合得到12 g/L的D-gal和1 g/L的AlCl₃的混合溶液。实验小鼠被随机分为5组($n=7$)。对照组(Con):连续49 d接受生理盐水腹腔注射;模型组(Mod):连续49 d腹腔注射D-gal(120 mg/kg)和AlCl₃(10 mg/kg);盐酸多奈哌齐组(Don):连续49 d腹腔注射D-gal(120 mg/kg)和AlCl₃(10 mg/kg),第29天起每天口服盐酸多奈哌齐(2 mg/kg),持续21 d;25% BEO组和75% BEO组:连续49 d腹腔注射D-gal(120 mg/kg)和AlCl₃(10 mg/kg),并且从第29天开始嗅闻25% BEO和75% BEO,每天1 h,持续21 d。随后,在第50天开始进行行为学实验。行为学实验结束后,从眼球中提取血液,并收集脑组织用于测试。

2)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及其对陌生环境的探索行为。OFT过程参考文献[1]。

3)Y-迷宫。采用Y-迷宫装置来评估小鼠的自发交替行为。方法参考文献[1]。

1.5 氧化应激标志物和胆碱能的测定

在行为学实验完成后,从小鼠眼睛中提取血液,4℃下以3 000 r/min离心2 min进行血清分离,用试剂盒测定血清中的SOD活性和MDA含量。同时在行为学实验结束后,立即从死亡小鼠身上收集大脑,在冰块上解剖得到前额叶皮层和海马结构,并用液氮速冻,样品保存在-80℃。用试剂盒测定大脑组织中的GPX和AchE活性。

1.6 苏木精和伊红染色实验

收集小鼠大脑并在4%多聚甲醛中保存48 h,然

后进行石蜡包埋处理。使用厚度为4 μm的切片机进行大脑的矢状切片,切片用苏木精和伊红(hematoxylin and eosin, H&E)染色后在显微镜下观察海马区神经细胞结构。

1.7 统计分析

数值均以“平均值±标准差”来表示。使用Graphpad Prism 7.0进行分析与绘图,用SPSS 22.0软件对数据进行单因素方差分析(ANOVA),并采用Duncan's法进行多重检验,显著性水平 $\alpha=0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 旷场实验结果

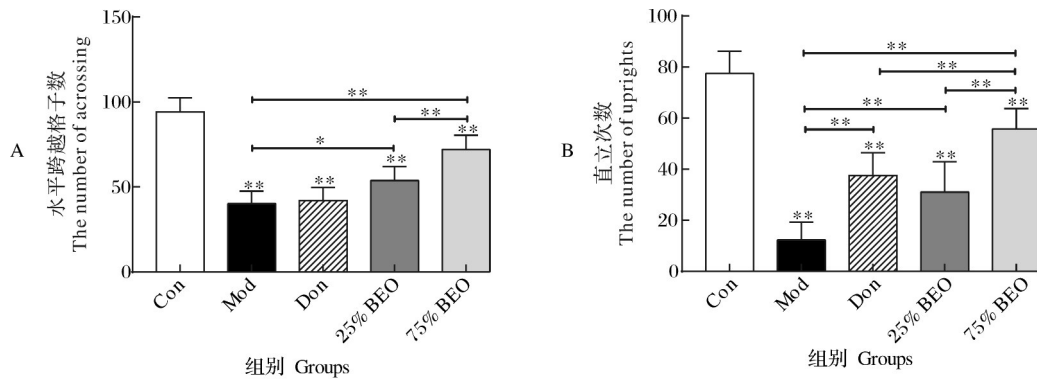
OFT的结果如图1所示。与对照组相比,模型组在水平跨越格子数(图1A)和直立次数(图1B)上都有明显的下降($P<0.01$),这表明小鼠在OFT中的精神状态发生恶化。与Mod组相比,BEO的联合治疗组的水平跨越格子数和直立次数明显增加,表明BEO减少了D-gal和AlCl₃诱导的AD模型的焦虑样行为。25% BEO处理组和75% BEO处理组在OFT中的水平跨越格子数和直立次数有明显差异($P<0.01$),表明75% BEO处理对改善小鼠的精神状态有更好的效果。

2.2 Y-迷宫测试结果

在Y-迷宫测试中,单因素方差分析显示各组之间存在着整体的显著差异。与对照组相比,模型组的自发交替百分比(图2A)和进入新臂的次数(图2B)急剧下降($P<0.01$),表明模型组的小鼠在腹腔注射D-gal和AlCl₃后出现了认知障碍。然而,在经过灌胃盐酸多奈哌齐和嗅闻75% BEO持续21 d后,自发交替百分比的下降幅度明显减弱(盐酸多奈哌齐组 $P<0.01$,75% BEO组 $P<0.05$),进入新臂的次数也有显著提高($P<0.05$)。这一结果表明,本研究中使用2种剂量的BEO,特别是75% BEO,对模型小鼠在Y-迷宫任务中短期记忆的获得表现出更好的治疗效果。可能是高浓度的精油促使通过血脑屏障的生物活性分子(如芳樟醇等)的数量增加,起到了提高自发交替行为的作用。

2.3 嗅闻BEO对阿尔兹海默症小鼠氧化应激程度的影响

与对照组相比,模型组MDA(图3A)的水平明显上升($P<0.01$),而SOD(图3B)的活性明显下降($P<0.01$)。然而,与Mod组小鼠相比,嗅闻BEO(25%和75%)可明显减弱MDA水平的增加幅度



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

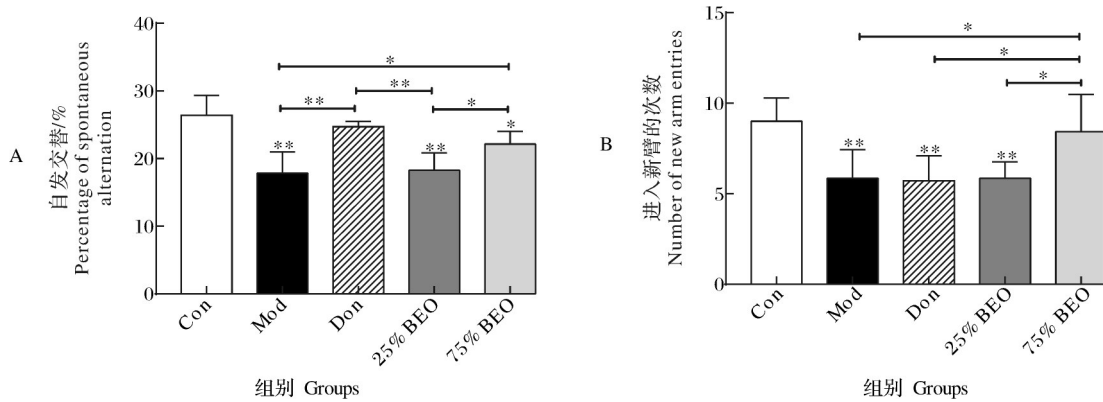


图2 嗅闻 BEO 对 D -gal 和 $AlCl_3$ 处理的小鼠在中自发交替百分比(A)和进入新臂的次数(B)的影响

Fig.2 Effects of the inhaled BEO on the percentage of alternation (A) and the number of entries into the new arm (B) of the D -gal and $AlCl_3$ treated mice

(25% BEO 组, $P<0.05$; 75% BEO 组 $P<0.01$)。此外,与模型组相比,75%BEO 组的处理明显增加了 SOD 的活性($P<0.01$)。

图 3C、D 是小鼠海马和皮层中的 GPX 活性的测定结果。与对照组相比,Mod 组在海马和大脑皮层中的 GPX 活性明显下降($P<0.01$)。与 Mod 组相比,BEO(25% 和 75%)处理可显著提高小鼠海马和皮层中 GPX 活性。结果表明,BEO 具有抗氧化活性,可增强 AD 小鼠体内 SOD 和 GPX 的活性,降低 MDA 含量,缓解氧化应激导致的认知障碍。

2.4 嗅闻 BEO 对阿尔兹海默症小鼠的胆碱能的影响

模型组小鼠大脑海马和皮层中的 AchE 活性(图 4)显著增加($P<0.01$),表明摄入 D -gal 和 $AlCl_3$ 对胆碱能神经系统具有抑制作用。嗅闻 25% BEO 和 75% BEO 后,模型小鼠海马和大脑皮层中的 AchE

活性均显著降低($P<0.01$),导致 Ach 水平的增加。因此,BEO 对 AchE 活性的调节可能也参与了小鼠认知功能的改善。

2.5 嗅闻 BEO 对阿尔兹海默症小鼠海马组织的影响

图 5 是小鼠海马组织切片的 H&E 染色结果。蓝色带是海马的细胞带,蓝色周围的红色部分是这些细胞的树突和细胞基质。空白组小鼠脑组织切片蓝色细胞带密集而整齐,神经元细胞排列紧密,结构完整。而模型小鼠海马中的细胞带排列相对松散,神经元及其细胞核的正常结构丧失,可能出现神经退行性病变,表明 D -gal 和 $AlCl_3$ 联合模型对模型小鼠的神经细胞造成了一定的损伤。与模型组相比,治疗组海马的细胞带比模型组更紧密、清晰。上述结果表明,嗅闻 BEO 可以缓解 D -gal 和 $AlCl_3$ 诱导的模型小鼠海马的神经元数目的减少,起到了一定的神经保护作用。

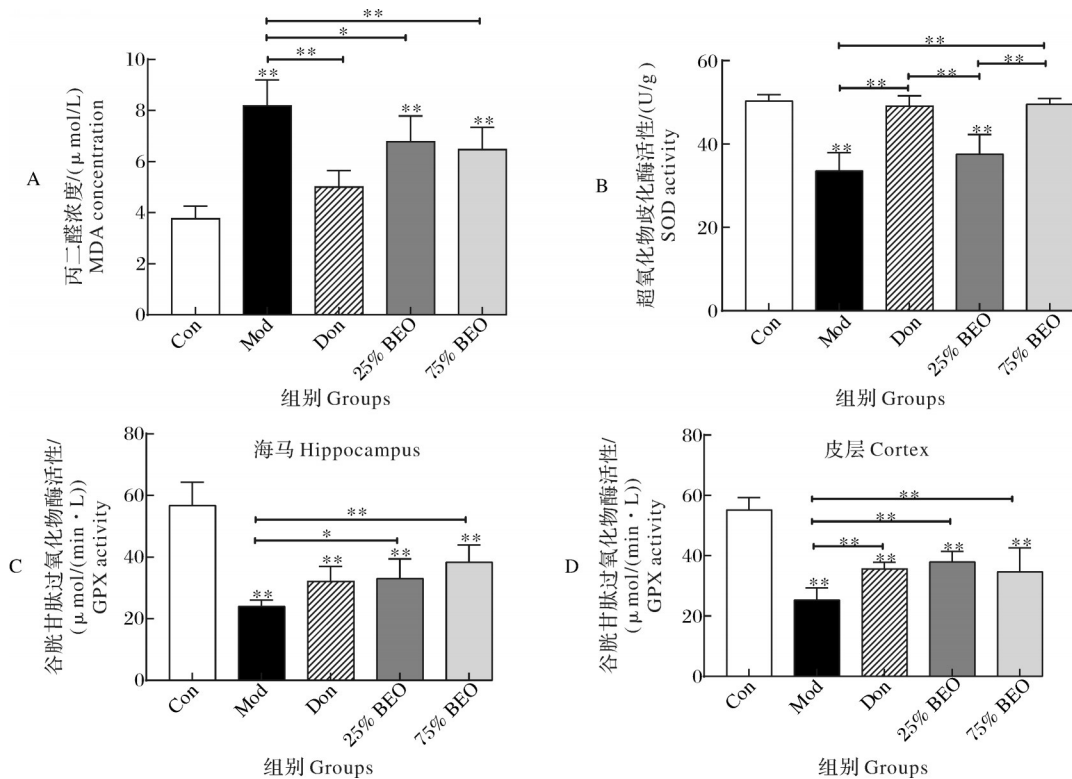


图3 嗅闻 BEO 对 *D*-gal 和 AlCl_3 处理的小鼠血清中 MDA 浓度(A)、SOD 水平(B)、海马(C)和皮层(D)中 GPX 水平的影响

Fig.3 Effects of the inhaled BEO on the concentration of MDA (A), SOD (B), GPX levels in the hippocampus (C) and cortex (D) of *D*-gal and AlCl_3 -treated mice

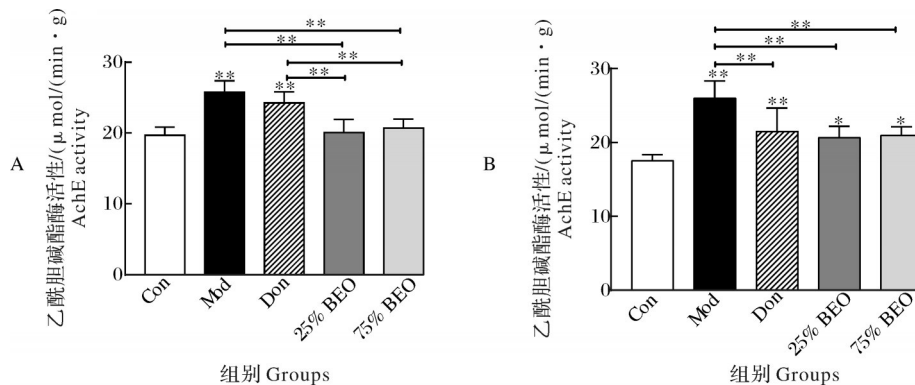


图4 嗅闻 BEO 对 *D*-gal 和 AlCl_3 处理的小鼠的海马(A)和皮层(B)中的 AchE 水平的影响

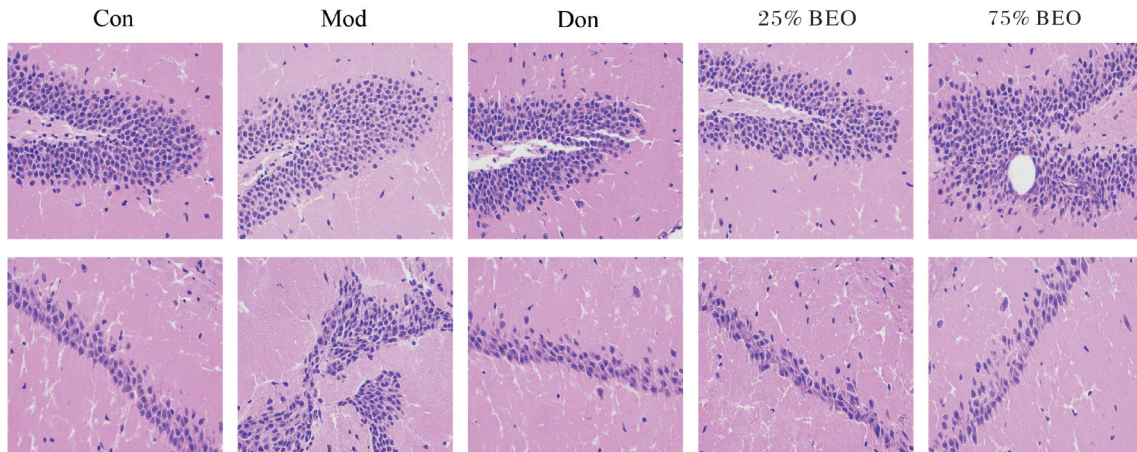
Fig.4 Effects of the inhaled BEO (25% and 75%) on the AchE level in hippocampus(A) and cortex(B) in the *D*-gal and AlCl_3 treated mice

3 讨论

本研究分别运用 OFT 和 Y-迷宫测试了各组小鼠的精神状态和认知功能,发现嗅闻 BEO 精油 21 d (每天 1 h)后,小鼠的精神状态和认知功能显著改善,且高浓度精油处理显示出更好的效果。这与前人的研究结果^[10-11]相一致,其研究显示 AlCl_3 诱导处理的小鼠自发交替行为的百分比减少。同时也与 Abou 等^[12]的研究结果相似,柑橘种子及其次生代谢产物改善了 AlCl_3 诱导的 AD 模型大鼠的精神状态并明显

增加了行走频率。

众所周知,氧化应激是引发衰老和年龄相关疾病的一个重要因素,大量研究表明,氧化应激是 AD 的重要致病因素之一^[13]。在啮齿动物中长期注射 *D*-gal 会产生类似衰老的变化,包括大量自由基的形成和抗氧化酶活性的降低,以及神经肌肉活动和免疫反应受损^[14-15]。MDA 具有很强的生物毒性,很容易与磷脂和蛋白质反应形成脂褐素(脂质过氧化物氧化形成的最终产物)。MDA 含量表征脂质过氧化



上方代表海马,下方为海马局部。The top represents the hippocampus and the bottom is part.

图5 小鼠海马组织H&E染色结果(400×)

Fig.5 HE (400×) staining results of mice hippocampus in groups

损伤的程度^[16]。SOD是体内最重要的自由基清除酶之一,它可以阻止由O₂引发的自由基连锁反应。GPX是谷胱甘肽的主要衍生物,参与其相关反应,减少脂质过氧化,保护细胞膜系统免受过氧化损伤^[17]。GPX是一种低分子清除剂,是组织中主要的非蛋白巯基化合物,对·O²⁻和H₂O₂有直接清除作用。在本研究中,与对照组相比,用D-gal和AlCl₃处理的小鼠的氧化应激标志物水平明显增加,从而证明了脑组织和血清中自由基的增加。经75% BEO治疗后,脑组织和血清中增加的自由基被清除,氧化应激程度减轻。植物精油在体内和体外的抗氧化作用均有报道,被推测为改善学习记忆障碍的可能机制之一。Cui等^[6]研究表明,BEO可以抑制脂质过氧化,激活内源性抗氧化剂(SOD、GPX和过氧化氢酶),以预防小鼠的氧化应激和认知损伤。此外,有研究表明柑橘类精油中高含量的萜类化合物具有良好的抗氧化和抗胆碱酯酶活性^[18]。因此,BEO的抗氧化作用可能是改善Y-迷宫和OFT中认知能力的机制之一。

Ach是中枢胆碱能系统中一个非常重要的神经递质,主要作用是保持意识。AchE是水解Ach的主要酶,其活性大小可以表征胆碱能神经系统的功能。研究表明,金属可能干扰穿过神经元的神经递质流动,导致神经退行性病变、胆碱能传递改变和AchE活性增加,这与记忆缺陷和认知障碍有关^[19]。在本研究中,BEO具有抑制AchE活性和改善胆碱能系统的能力,表现为脑乙酰胆碱酯酶活性降低,从而改善D-gal和AlCl₃诱发的神经毒性作用。众多研究表明,植物精油具有AchE的抑制活性。如Liu等^[20]的研

究结果表明,柠檬精油通过调节海马突触密度和抑制AchE,缓解了APP/PS1双转基因(APP/PS1)AD小鼠的认知功能障碍。Bae等^[21]研究发现,来自*Chamaecyparis obtuse*的精油可以改善认知障碍,并显著降低AD大鼠的AchE活性。因此,BEO对AchE的抑制作用可能是改善Y-迷宫和OFT中记忆表现的机制之一。BEO应被视为一种胆碱酯酶抑制剂,以缓解由注射D-gal和AlCl₃产生的胆碱能系统的功能障碍。笔者在之前的研究中发现该品种BEO中主要成分是柠檬烯和芳樟醇等萜烯类物质^[1]。Piccialli等^[22]研究发现柠檬烯对AchE表现出显著的抑制活性,且半抑制浓度几乎与作为阳性对照的加兰他敏相当。另有研究证明,芳樟醇除了能够抑制D-gal和AlCl₃导致的AchE的升高之外^[23],也能缓解Aβ导致的胆碱能系统的功能障碍^[24]。尤其是从柑橘皮中提取的柑橘皮精油及成分(柠檬烯和芳樟醇)对AchE的活性也具有显著的抑制作用^[25]。因此,BEO精油对AchE抑制作用可能是由柠檬烯和芳樟醇所引起。

H&E染色结果表明嗅闻BEO对D-gal和AlCl₃诱导的AD小鼠脑组织具有保护作用,可明显减少小鼠海马神经元的损伤。刘源香等^[26]研究证实,阿尔兹海默症患者海马区神经元的丢失,是导致AD患者出现学习记忆能力下降的主要原因。神经元的存活数量又会直接影响到神经突触的可塑性,而海马CA1、CA3区的神经突触的形成也与学习记忆能力的提高有关。

综上所述,BEO可以通过嗅闻的方式逆转D-gal

和 $AlCl_3$ 造成的模型小鼠认知障碍,且高浓度(75%)佛手柑精油效果更为显著。BEO的活性作用可能是通过减少氧化应激和调节大脑中的AChE活性来调节的。现阶段的研究结果表明,BEO可提供神经保护,并可被视为AD的辅助治疗方法。

参考文献 References

- [1] 胡慧艳,任婧楠,李晓,等.嗅闻佛手柑精油对阿尔茨海默病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.HU H Y, REN J N, LI X, et al. Neuroprotective effects of smelling bergamot essential oil on mice with Alzheimer's disease[J].Journal of Huazhong Agricultural University, 2022, 41(1): 229-237 (in Chinese with English abstract).
- [2] OSKOUEI Z, MEHRI S, KALALINIA F, et al. Evaluation of the effect of thymoquinone in *D*-galactose-induced memory impairments in rats: role of MAPK, oxidative stress, and neuroinflammation pathways and telomere length[J].Phytotherapy research, 2021, 35(4): 2252-2266.
- [3] BAGCI E, AYDIN E, UNGUREANU E, et al. *Anthriscus nemorosa* essential oil inhalation prevents memory impairment, anxiety and depression in scopolamine-treated rats[J].Biomedicine & pharmacotherapy, 2016, 84: 1313-1320.
- [4] LIU K Y, STRINGER A E, REEVES S J, et al. The neurochemistry of agitation in Alzheimer's disease: a systematic review[J].Ageing research reviews, 2018, 43: 99-107.
- [5] MOHD SAIRZAI N S, SIRAJUDEEN K N S. Natural products and their bioactive compounds: neuroprotective potentials against neurodegenerative diseases [J/OL]. Evidence-based complementary and alternative medicine, 2020, 2020: 6565396 [2021-12-16].<https://doi.org/10.1155/2020/6565396>.
- [6] 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 [2021-12-16].<https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111766>.
- [7] MEHMET K, HANEFI Ö, AYDIN H, et al. Investigation of anti-inflammatory activity of bergamot oil [J]. Electronic journal of general medicine, 2007, 4(4): 176-179.
- [8] 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 [2021-12-16].<https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00036>.
- [9] SCUTERI D, ROMBOLÀ L, MORRONE L A, et al. Neuropharmacology of the neuropsychiatric symptoms of dementia: possible targets for novel therapeutic approaches [J/OL]. International journal of molecular sciences, 2019, 20(13): 3327 [2021-12-16].<https://doi.org/10.3390/ijms.2013.3327>.
- [10] OGUNLADE B, ADELAKUN S A, AGIE J A. Nutritional supplementation of gallic acid ameliorates Alzheimer's-type hippocampal neurodegeneration and cognitive impairment induced by aluminum chloride exposure in adult Wistar rats [J]. Drug and chemical toxicology, 2022, 45(2): 651-662.
- [11] KHALIFA M, SAFAR M M, ABDELSALAM R M, et al. Telmisartan protects against aluminum-induced Alzheimer's-like pathological changes in rats [J]. Neurotoxicity research, 2020, 37(2): 275-285.
- [12] ABOU-BAKER D H, IBRAHIM B M M, HASSAN N S, et al. Exploiting *Citrus aurantium* seeds and their secondary metabolites in the management of Alzheimer disease [J]. Toxicology reports, 2020, 7: 723-729.
- [13] BANERJEE A S S, HITENDRAPRASAD P, et al. Aromatherapy in the treatment of Alzheimer's disease: a systematic review [J]. International journal of pharmaceutical sciences review and research, 2021, 66(2): 93-97.
- [14] TURGUT N H, MERT D G, KARA H, et al. Effect of black mulberry (*Morus nigra*) extract treatment on cognitive impairment and oxidative stress status of *D*-galactose-induced aging mice [J]. Pharmaceutical biology, 2016, 54(6): 1052-1064.
- [15] ZHANG X L, JIANG B, LI Z B, et al. Catalpol ameliorates cognition deficits and attenuates oxidative damage in the brain of senescent mice induced by *D*-galactose [J]. Pharmacology biochemistry and behavior, 2007, 88(1): 64-72.
- [16] LAZZARINO G, TAVAZZI B, PIERRO D, et al. The relevance of malondialdehyde as a biochemical index of lipid peroxidation of postischemic tissues in the rat and human beings [J]. Biological trace element research, 1995, 47(1/2/3): 165-170.
- [17] MERAD-BOUDIA M, NICOLE A, SANTIARD-BARON D, et al. Mitochondrial impairment as an early event in the process of apoptosis induced by glutathione depletion in neuronal cells: relevance to Parkinson's disease [J]. Biochemical pharmacology, 1998, 56(5): 645-655.
- [18] 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.
- [19] HUSSIEN H M, ABD-ELMEGIED A, GHAREEB D A, et al. Neuroprotective effect of berberine against environmental heavy metals-induced neurotoxicity and Alzheimer's-like disease in rats [J]. Food and chemical toxicology, 2018, 111: 432-444.
- [20] LIU B A, KOU J Y, LI F Y, et al. Lemon essential oil ameliorates age-associated cognitive dysfunction via modulating hippocampal synaptic density and inhibiting acetylcholinesterase [J]. Aging, 2020, 12(9): 8622-8639.
- [21] BAE D, SEOL H, YOON H G, et al. Inhaled essential oil from *Chamaecyparis obtuse* ameliorates the impairments of cognitive function induced by injection of β -amyloid in rats [J]. Pharmaceutical biology, 2012, 50(7): 900-910.

- [22] PICCIALLI I, TEDESCHI V, CAPUTO L, et al. The antioxidant activity of limonene counteracts neurotoxicity triggered by A β_{1-42} oligomers in primary cortical neurons [J/OL]. *Antioxidants*, 2021, 10 (6) : 937 [2021-12-16]. <https://doi.org/10.3390/antiox10060937>.
- [23] XU P, WANG K Z, LU C, et al. The protective effect of lavender essential oil and its main component linalool against the cognitive deficits induced by *D*-galactose and aluminum trichloride in mice [J/OL]. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2017, 2017 : 7426538 [2021-12-16]. <https://doi.org/10.1155/2017/7426538>.
- [24] XU P, WANG K Z, LU C, et al. Protective effects of linalool against amyloid beta-induced cognitive deficits and damages in mice [J]. *Life sciences*, 2017, 174 : 21-27.
- [25] OYEDEJI A O, OKUNOWO W O, OSUNTOKI A A, et al. Insecticidal and biochemical activity of essential oil from *Citrus sinensis* peel and constituents on *Callosobrunchus maculatus* and *Sitophilus zeamais* [J]. *Pesticide biochemistry and physiology*, 2020, 168 : 104643 [2021-12-16]. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104643>.
- [26] 刘源香, 杨继国. 督脉灸疗法对阿尔茨海默病模型小鼠学习记忆能力及海马CA1、CA3区HE染色的影响[J]. *山东中医杂志*, 2017, 36 (12) : 1059-1062. LIU Y X, YANG J G. Effect of governor-moxibustion on learning and memory and HE staining in hippocampal CA1 and CA3 area of mouse with Alzheimer's disease [J]. *Shandong journal of traditional Chinese medicine*, 2017, 36 (12) : 1059-1062 (in Chinese with English abstract).

Effects of sniffing bergamot essential oil on neurobehavior in mice with Alzheimer's disease

HU Huiyan¹, WEN Zhiqiang², REN Jingnan¹, LI Xiao¹, FAN Gang¹, PAN Siyi¹, ZHANG Lulu³

1. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University/
Key Laboratory of Environment Correlative Dietology, Ministry of Education/

Hubei Key Laboratory of Fruit & Vegetable Processing & Quality Control, Wuhan 430070, China;

2. Hubei Province Rearing Fine Breed Livestock Farm, Jingzhou 434010, China;

3. College of Food Science and Technology, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China

Abstract Bergamot essential oil (BEO) is known for having many health benefits. Healthy male Kunming mice were selected to establish the model mice with Alzheimer's disease by intraperitoneal injection of *D*-gal (120 mg/kg) and AlCl₃ (10 mg/kg) for 49 days to study the neuroprotective effect of sniffing different concentrations of bergamot essential oil on the model mice with Alzheimer's disease induced by the combination of *D*-gal and AlCl₃. From the 29th day, the mice in the sniffing group sniffed 25% or 75% bergamot essential oil for 21 days, 1 h everyday. After the sniffing experiment, the changes in the behavior and brain biochemistry of the mice were evaluated. The results of behavioral studies showed that sniffing bergamot essential oil significantly improved symptoms including cognitive impairment and exploratory decline in the model mice with Alzheimer's disease. The results of biochemical studies showed that sniffing 75% bergamot essential oil significantly inhibited the degree of oxidative stress and the increase of acetylcholinesterase (AChE) activity, and promoted the improvement of cognitive function in mice. It is indicated that sniffing 75% bergamot essential oil attenuates *D*-gal and AlCl₃-induced cognitive-behavioral impairment and biochemical damage.

Keywords bergamot essential oil; Alzheimer's disease; oxidative stress; acetylcholinesterase; aromatherapy; neuroprotection

(责任编辑: 赵琳琳)