

迷迭香精油通过嗅觉通路改善小鼠学习记忆的研究

石瑜瑜¹, 傅佳^{1*}, 操礼琼¹, 赵焕¹, 李光武²

1. 安徽医科大学第一附属医院, 安徽 合肥 230022

2. 安徽医科大学神经生物学研究所, 安徽 合肥 230032

摘要: **目的** 探讨迷迭香精油通过嗅觉通路改善 C57BL/6 小鼠学习记忆能力及其可能的机制。**方法** 通过鼻吸入迷迭香精油的方法, 以毁损嗅上皮模型作对照, 分组进行 Lashley-III 水迷宫和嗅觉辨别记忆实验, 并进行免疫组化, 观察各组小鼠海马 CA1 区乙酰胆碱酯酶、谷氨酸的表达情况。**结果** 迷迭香精油组小鼠的水迷宫实验和嗅觉辨别记忆实验潜伏期低于其他组 ($P < 0.05$), 免疫组化结果显示该组小鼠海马 CA1 区乙酰胆碱酯酶、谷氨酸的表达增强。**结论** 迷迭香精油能够通过嗅觉通路改善小鼠的学习记忆功能, 其机制可能与嗅觉通路中神经递质的改变有关。

关键词: 迷迭香精油; 嗅觉通路; 学习记忆; 神经递质

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2012)06-0562-04

Improvement of learning and memory behavior in mice through olfactory pathway using essential oil of *Rosmarinus officinalis*

SHI Yu-yu¹, FU Jia¹, CAO Li-qiong¹, ZHAO Huan¹, LI Guang-wu²

1. The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China

2. Institute of Neurobiology, Anhui Medical University, Hefei 230032, China

Abstract: Objective To study the function of *Rosmarinus officinalis* essential oil (ROEO) on improving the learning and memory behavior in C57BL/6 mice through olfactory pathway and its possible mechanism. **Methods** The ROEO was given via inhalation and the damaged olfactory epithelium of mice was taken as the control model. The Lashley-III water maze and olfactory discrimination memory tests of mice were carried out and the expressions of AchE and Glu in hippocampus CA1 of mice were observed by immunohistochemistry in different groups. **Results** The latency in water maze test and olfaction discrimination memory tests of mice in ROEO group was lower than that of mice in the other groups ($P < 0.05$), and the expressions of AchE and Glu in hippocampus CA1 of mice in ROEO group was significantly increased by immunohistochemistry. **Conclusion** ROEO could improve the learning and memory behavior of mice through olfactory pathway. The mechanisms are related to the changing of brain's neurotransmitters.

Key words: *Rosmarinus officinalis* essential oil (ROEO); olfactory pathway; learning and memory; neurotransmitter

作为人类和动物原始的感觉功能之一, 嗅觉和脑功能之间存在着密切的联系。嗅觉通路的主要作用是在嗅觉的传导及嗅觉与高级活动的联系中发挥着重要作用, 但其还调控着学习记忆、情绪、内脏活动以及警觉与睡眠等脑的高级功能。迷迭香 *Rosmarinus officinalis* Linn. 又名油安草, 别名艾菊, 系唇形科迷迭香属植物, 多年生常绿亚灌木。迷迭香性温, 味辛, 具有芳香健胃、镇静安神等功效^[1]。迷迭香精油从迷迭香中萃取而来。本实验中小鼠经

鼻吸入迷迭香精油, 然后进行 Lashley-III 水迷宫和嗅觉辨别记忆能力实验, 并观察各组小鼠海马 CA1 区乙酰胆碱酯酶 (AchE)、谷氨酸 (Glu) 的表达情况, 探讨迷迭香精油通过嗅觉通路改善 C57BL/6 小鼠学习记忆能力及其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

SMG—2 Lashley-III 水迷宫、ZIL—2 程控自主活动箱 (中国医学科学院药物研究所), 密闭实验盒

收稿日期: 2012-07-23

基金项目: 安徽省自然科学基金资助项目 (090413145)

作者简介: 石瑜瑜 (1987—), 女, 浙江绍兴人, 硕士在读, 从事神经病学研究。Tel: (0551) 2922263 E-mail: xuezhongyuyu@163.com

*通讯作者 傅佳 (1954—), 神经内科主任医师、教授。Tel: (0551) 2922263 E-mail: ayfyfujia@yahoo.com

(塑料箱, 60 cm×60 cm×20 cm, 上海正卫日用品有限公司), 木制旷场箱(自制, 80 cm×80 cm×40 cm), Leica RM 2135 型石蜡切片机(德国)。

SABC 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司, 批号 SA1022), 迷迭香精油(新疆盛澜香料开发有限公司, 批号 JH08-1)。C57BL/6 雄性小鼠(20~25 g, 3 月龄, 安徽医科大学动物中心提供, 合格证号: 皖医实动准第 01 号)。

1.2 动物与分组

小鼠适应性喂养后, 通过程控自主活动箱进行自主活动, 训练 5 d, 1 次/d, 记录 180 s 小鼠自主活动次数, 按第 5 天结果 90% 区间去除两端极值。再通过水迷宫训练 5 d, 每天进行 2 次测试, 上下午各 1 次, 实验环境不变, 水温保持在 20~22 °C, 试验第 5 天, 剔除 3 min 内不能到达平台的小鼠, 将剩余的小鼠根据潜伏期随机分为 5 组, 每组 12 只, 分别为嗅上皮完整组(对照组、假手术组)、嗅上皮毁损组(模型组)、嗅上皮完整药物组(嗅上皮完整+迷迭香精油组)、嗅上皮毁损药物组(模型+迷迭香精油组)。

1.3 嗅上皮毁损模型的制备

将模型组和模型+迷迭香精油组小鼠行 0.3% 水合氯醛麻醉后, 用微量注射器向双侧鼻孔分别滴入 0.17 mol/L ZnSO₄ 和 0.7% Triton X-100 (PBS 配制) 混合液, 总剂量 50 μL^[2], 1 次/d, 共 7 d。将假手术组小鼠行 0.3% 水合氯醛麻醉后, 用微量注射器向双侧鼻孔滴入生理盐水 50 μL, 1 次/d, 共 7 d。

1.4 精油的吸入

在密闭实验盒中放入香薰灯托盘, 先后抽取 10 mL 蒸馏水和 0.1 mL 迷迭香精油放入托盘中。将香薰灯加热, 待精油在盒中扩散均匀后, 将小鼠放入盒内, 吸入精油, 30 min 后将小鼠取出。嗅上皮完整+迷迭香精油组、模型+迷迭香精油组小鼠每天吸入迷迭香精油 30 min, 持续 14 d。

1.5 神经行为学观察

1.5.1 水迷宫实验 Lashley III 水迷宫主体为 80 cm×50 cm×20 cm 双层不透明有机玻璃箱, 作为观测小鼠空间学习记忆的神经行为学的经典装置, 其内设起始点、终点平台和 4 个盲端, 平台附近为安全区, 并放台灯标示, 动物只有通过台阶才可上岸躲避溺水的危险。实验环境不变, 水温保持在 20~22 °C。正式实验前, 先训练 4 d, 在起始点将小鼠面向壁侧放入水中, 记录小鼠从放入水中到达终点平台的时

间(即潜伏期), 记录前 4 d 的潜伏期, 取其平均值作为实验前观察指标, 第 5 天实验正式开始。在正式实验的第 1、7、14 天进行测试, 并记录结果。

1.5.2 嗅觉辨识记忆实验^[3] 在木制旷场箱内的 4 个角落中, 放置装有酒精、乙酸、蒜、胡椒气味沙子的玻璃器皿(高 2 cm, 半径 3 cm), 其中仅胡椒气味的沙子内藏有巧克力, 4 只器皿随机放置。实验前两天及实验期小鼠限食(正常量的 1/2)。训练前第 1 天将小鼠置于旷场箱中熟悉环境, 第 2 天将巧克力先后完全暴露于沙子表面、半暴露于沙子表面、完全埋藏在沙子内, 让小鼠在气味的引导下寻找有巧克力的器皿, 以小鼠找到巧克力为 1 次训练终点。每只小鼠训练 5 次, 每次间隔 20 min, 相邻 2 次训练间变动胡椒气味沙子的位置, 记录找到食物的时间, 作为记忆成绩, 以小于 1 min 为训练标准。达标后取出器皿中的巧克力, 记录小鼠找到胡椒气味沙子的时间, 以排除巧克力本身的影响。正式实验的第 1、7、14 天再次进行测试, 记录找到巧克力的时间, 3 min 内找不到食物以 3 min 计算, 记录实验结果。

1.6 免疫组化^[4]

水合氯醛(38 g/L)腹腔麻醉小鼠(0.38 g/kg), 产生麻醉效应后迅速开颅取脑, 固定、脱水、透明、石蜡包埋。对照 The Mouse Brain 脑立体定位图谱, 用切片机在海马 CA1 区层面切片 12 张, 贴片、烤片后收储备用。再按 SABC 法进行免疫组化染色, 切片置于显微镜下, 对所测阳性区域进行定位后, 使用 Image-Pro-Plus 6.0 彩色图像分析系统, 准确分割阳性区域后, 测量该区域的平均吸光度值。在测量中, 尺寸定标、光照强度、显微镜的放大倍数是固定的。

1.7 统计学分析

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, 组间比较用 *t* 检验和单因素方差分析。

2 结果

2.1 水迷宫实验

经正态性检验, 对照组、嗅上皮完整药物组在实验第 7、14 天的数据符合正态分布, 做各组样本的 *t* 检验, *P* 值均小于 0.05。对照组与模型组、假手术组、模型+迷迭香精油组的第 7、14 天的结果比较, *P* 值均大于 0.05。结果见表 1。

2.2 嗅觉辨识记忆实验

经正态性检验, 对照组、嗅上皮完整药物组在

实验第 7、14 天的数据符合正态性分布，做各组样本的 *t* 检验，*P* 值均小于 0.05。对照组与模型组、假手术组、模型+迷迭香精油组的第 7、14 天的结果比较，*P* 值均大于 0.05。结果见表 2。

表 1 水迷宫实验结果

Table 1 Results of Lashley-III water maze

组 别	潜伏期/s			
	给药前	给药后 1 d	给药后 7 d	给药后 14 d
对照	54.67 ± 8.74	54.50 ± 10.52	60.08 ± 7.67	58.25 ± 7.47
假手术	56.58 ± 7.14	56.40 ± 8.19	50.67 ± 8.16	48.42 ± 5.90
模型	53.12 ± 8.67	55.90 ± 10.42	56.00 ± 8.75	55.20 ± 4.16
嗅上皮完整+迷迭香精油	54.58 ± 7.99	46.00 ± 8.38	38.00 ± 5.74*	33.75 ± 2.03**
模型+迷迭香精油	52.75 ± 8.19	56.70 ± 7.38	55.50 ± 12.24	54.00 ± 8.78

与对照组比较：**P*<0.05 ***P*<0.01。下表同
P*<0.05 *P*<0.01 vs control group, same as below

表 2 嗅觉辨识记忆实验结果

Table 2 Results of olfactory discrimination memory test

组 别	记忆成绩/s			
	给药前	给药后 1 d	给药后 7 d	给药后 14 d
对照	46.41 ± 5.85	46.67 ± 5.56	41.83 ± 10.84	40.08 ± 11.48
假手术	47.33 ± 7.69	46.58 ± 7.87	40.92 ± 8.87	38.00 ± 9.77
模型	51.08 ± 11.78	55.40 ± 15.88	48.83 ± 14.66	42.33 ± 3.88
嗅上皮完整+迷迭香精油	46.59 ± 7.12	44.92 ± 9.27	30.50 ± 6.74*	25.83 ± 6.02**
模型+迷迭香精油	49.05 ± 8.70	48.40 ± 10.20	49.33 ± 14.63	37.33 ± 8.71

2.3 免疫组化

在海马 CA1 区，AChE 阳性细胞呈黄褐色，主要位于神经元胞浆及近侧突起内，胞核未着色或着色较淡。嗅上皮完整+迷迭香精油组阳性细胞数量增多明显，细胞着色加深，而其他组未见明显变化，

见图 1 和表 3。

在海马 CA1 区，Glu 阳性细胞胞核胞质均着深棕色，嗅上皮完整+迷迭香精油组阳性细胞数量增多明显，细胞着色加深，而其他组未见明显变化，见图 1 和表 3。

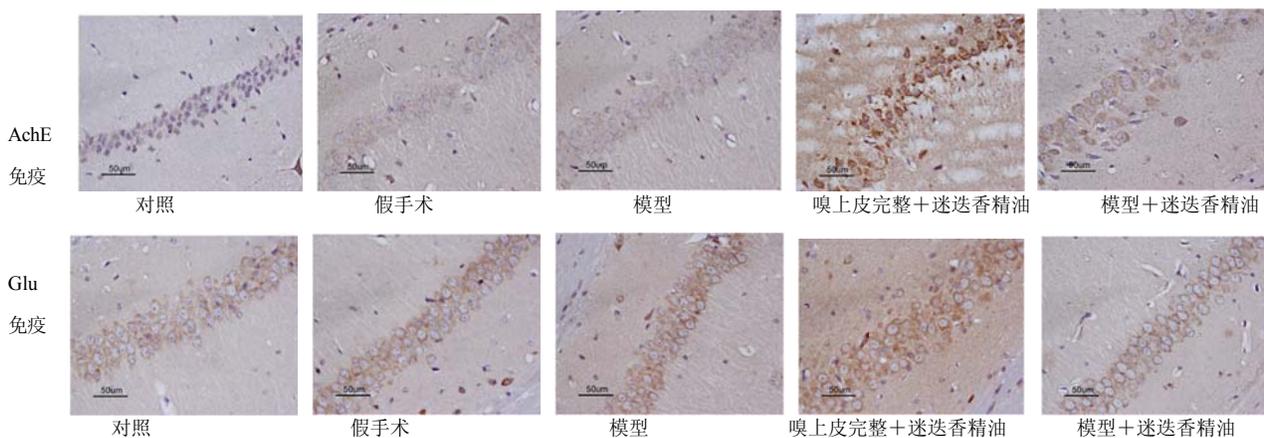


图 1 AchE 和 Glu 免疫组化

Fig. 1 Immunohistochemistry of AchE and Glu

3 讨论

作为中药治疗的一部分，芳香疗法广泛用于祛病保健、调理情绪、增强免疫、美容塑身等各个领

域。迷迭香精油具有很好的抗氧化、抗炎、抗病毒、抗肿瘤作用^[5]。在一个芳香疗法治疗阿尔茨海默病的试验中，对 28 名患者进行迷迭香精油香薰，结果

表 3 AchE、Glu 平均吸光度值测定结果
Table 3 Average absorbance of AchE and Glu

组 别	平均 A 值	
	AchE	Glu
对照	0.18±0.02	0.19±0.02
假手术	0.18±0.02	0.20±0.02
模型	0.18±0.02	0.19±0.02
嗅上皮完整+迷迭香精油	0.32±0.028*	0.22±0.02**
模型+迷迭香精油	0.19±0.02	0.20±0.02

全部患者的认知功能均显著提高^[6]。佟苓苓等^[7]研究发现,迷迭香精油能改善小鼠的抑郁症状。

学习记忆能力分为空间学习记忆能力和非空间学习记忆能力。Lashley III 水迷宫可反映小鼠的空间学习记忆能力,而嗅觉辨别记忆实验属于非空间学习记忆的行为学实验,可通过检测小鼠对食物相联系的气味辨别来分析小鼠对不同嗅质的辨别能力。本实验发现嗅上皮完整+迷迭香精油组小鼠的水迷宫实验和嗅觉辨别记忆实验潜伏期低于其他组($P<0.05$),而嗅上皮毁损后的小鼠与对照组差异无显著性,提示迷迭香精油是通过嗅觉传导通路进入中枢神经系统发挥药效作用的。根据嗅觉传导通路原理:嗅上皮感觉神经元膜上的特异性气体受体识别气体后,引出嗅觉感受器电位,沿着嗅感觉神经元轴突传递至嗅球,嗅球通过嗅束将传入的信号投射到初级嗅皮质。传入的信号经嗅球内神经元与嗅皮质内神经元建立纤维联系后,被传递到初级嗅皮质的嗅前核、梨状前皮质、下丘脑、杏仁核、内侧嗅皮质,再由嗅中枢的次级嗅皮质传至海马。嗅觉感受器、嗅球和大脑嗅觉中枢就这样三位一体地形成了嗅觉感受和传导通路^[9-10],其传递信息的神经递质有 Ach、Glu、GABA、5-HT 等。涉及学习记忆功能的主要脑区是海马。被破坏海马的小鼠在水迷宫实验中显示空间学习记忆功能受损^[11]。Ach 是学习记忆关系最为密切的神经递质之一^[12]。AchE 作为 Ach 的水解酶,在大脑内 AchE 和 ChAT 共同维持着 Ach 的动态平衡。Dunbar 等^[13]发现水迷宫作业中表现较好的小鼠其海马 CA1 区中 Ach 的摄取量较高。Glu 在学习记忆、突触可塑性等方面有重要作用,其与脑内信息贮存和记忆形成的生理学机制长时程增强密切相关^[14]。Glu 呈免疫反应阳性的细胞被发现广泛分布于海马、额叶皮质、梨状皮质、基底前脑、杏仁核等部位。本实验中,嗅上皮

完整+迷迭香精油小鼠的海马 CA1 区 AchE 和 Glu 的阳性细胞表达率明显高于其他组,提示迷迭香精油改善小鼠学习记忆能力的机制可能与嗅觉通路中神经递质 Ach、Glu 表达量的改变有关。

本实验证明了迷迭香精油可通过嗅觉传导通路改善小鼠学习记忆功能,进一步的神经形态学研究发现其机制可能与海马 CA1 区神经递质 AchE、Glu 的改变有关。这也为进一步研究嗅觉吸入的神经药理学提供了线索。

参考文献

- [1] 吴修仁. 潮汕生物资源植物志略 [M]. 广州: 中山大学出版社, 1997: 281.
- [2] Chuah M I, Tennent R, Jacobs I. Response of olfactory Schwann cells to intranasal zinc sulfate irrigation [J]. *J Neurosci Res*, 1995, 42(4): 470-480.
- [3] Fecteau J, Milgram N W. The ability to smell remains intact, but does not recover, after olfactory bulb lesions [J]. *Int J Neurosci*, 2001, 108(1/2): 11-20.
- [4] 杨天鹏, 唐敏, 刘巧琼, 等. 香酮通过嗅觉通路改善昆明鼠学习记忆的机制 [J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22(6): 487-489.
- [5] 屠鹏飞, 徐占辉. 新型资源植物迷迭香的化学成分及其应用 [J]. 天然产物研究与开发, 1998, 10(3): 62-68.
- [6] Jimbo D, Kimura Y, Taniguchi M, et al. Effect of aromatherapy on patients with Alzheimer's disease [J]. *Psychogeriatrics*, 2009, 9(4): 173-179.
- [7] 佟苓苓, 姚雷. 迷迭香和柠檬草的精油以及活体香气的抗抑郁作用的研究 [J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2009, 27(1): 82-85.
- [8] Davis R L. Olfactory learning [J]. *Neuron*, 2004, 44(1): 31-48.
- [9] Hummel T. Assessment of intranasal trigeminal function [J]. *Int J Psychophysiol*, 2000, 36(2): 147-155.
- [10] Doty R L. Olfaction [J]. *Annu Rev Psychol*, 2001, 52: 423-452.
- [11] 方松, 余化霖. Morris 水迷宫实验中海马相关空间学习记忆的研究进展 [J]. 国际病理科学与临床杂志, 2010, 30(4): 321-326.
- [12] Wilson D A, Fletcher M L, Sullivan R M. Acetylcholine and olfactory perceptual learning [J]. *Learn Mem*, 2004, 11(1): 28-34.
- [13] Dunbar G L, Rylett R J, Schmidt B M, et al. Hippocampal choline acetyltransferase activity correlates with spatial learning in aged rats [J]. *Brain Res*, 1993, 604(1/2): 266-272.
- [14] 李红彦, 刘萍, 徐华雷, 等. 铝整合剂对铅染毒大鼠学习记忆及兴奋性氨基酸类神经递质的影响 [J]. 环境与健康杂志, 2008, 25(11): 960-962.