

2种玫瑰精油对小鼠的抗焦虑作用

丁 鸣, 马晓红, 张 楠, 姚 雷

(上海交通大学 农业与生物学院, 上海 200240)

摘 要: 研究通过 GC-MS 法分析了大马士革玫瑰(*Rosa damascena*)精油和苦水玫瑰(*Rosa sertata* × *Rosa rugosa*)精油的化学成分。将 ICR 小鼠分成对照组、地西洋组和精油组,采用高架十字迷宫模型(elevated plus-maze, EPM)评价了急性嗅吸不同浓度2种精油对小鼠抗焦虑的影响。通过高架十字迷宫和明暗箱(light-dark box, LDB)模型评价了长期嗅吸苦水玫瑰精油对抗焦虑的影响。精油成分分析显示,苦水玫瑰精油的主要成分中香茅醇(37.36%)和香叶醇(12.06%)含量均高于大马士革玫瑰精油中香茅醇(16.87%)和香叶醇(11.63%)含量。急性嗅吸实验结果显示,与对照组(开臂时间%: 1.06 ± 0.70 , 开臂次数%: 0.68 ± 0.49)相比,低浓度($10 \mu\text{L}/\text{mL}$)苦水玫瑰精油(开臂时间%: 14.05 ± 6.39 , 开臂次数%: 16.16 ± 6.19)具有显著缓解小鼠焦虑的作用($P < 0.05$),而大马士革玫瑰精油则不具有抗焦虑功效。长期嗅吸实验结果显示,与对照组相比,苦水玫瑰精油可以显著缓解小鼠在 EPM(开臂时间%: 14.05 ± 6.39 , 开臂次数%: 17.52 ± 2.60)和 LDB(精油组:明箱时间%: 48.04 ± 2.28 , 明箱距离%: 46.26 ± 3.19)模型中的焦虑行为($P < 0.05$)。

关键词: 苦水玫瑰; 大马士革玫瑰; 精油; 抗焦虑; 高架十字迷宫; 明暗箱

中图分类号: R 285.5

文献标识码: A

Anxiolytic efficacy of two kinds of rose essential oil on mice

DING Ming, MA Xiao-hong, ZHANG Nan, YAO Lei

(School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240)

Abstract: In this study, GC-MS was used to analyze the chemical constituents of essential oils of the Damask rose (*Rosa damascena*) and Kushui rose (*Rosa sertata* × *Rosa rugosa*). ICR mice were divided into control group, diazepam group and essential oil group. Elevated plus-maze (EPM) test was used to evaluate the acute anxiolytic effect of the two kinds of rose oils in different concentrations. EPM and light-dark box (LDB) tests were used to evaluate the chronic anxiolytic effect of Kushui rose oil. The GC-MS results showed that the content of citronellol (37.36%) in Kushui rose oil was higher than that of Damask rose oil (16.87%). The content of geraniol (12.06%) in Kushui rose oil was higher than that of Damask rose oil (11.63%). The behavioral tests results showed that low concentration ($10 \mu\text{L}/\text{mL}$) of Kushui rose oil (open arm time%: 14.05 ± 6.39 , open arm entry%: 16.16 ± 6.19) showed significant anxiolytic effect compared to the control (open arm time%: 1.06 ± 0.70 , open arm entry%: 0.68 ± 0.49) ($P < 0.05$). All of the three concentrations of Damask rose oil showed no significant efficacy. Chronic exposure of Kushui rose oil significantly reduced the anxiety behaviors of the mice in the EPM test (open arm time%: 14.05 ± 6.39 , open arm entry%: 17.52 ± 2.60) and LDB test (light box time%: 48.04 ± 2.28 , open box distance%: 46.26 ± 3.19) ($P < 0.05$).

收稿日期: 2019-07-03

作者简介: 丁鸣(1989-), 男, 硕士, 研究方向: 芳香植物功效性研究, email: dingming9811@163.com;

姚雷(1963-)为本文通讯作者, 女, 博士, 教授, 研究方向: 芳香植物, email: yaolei@sjtu.edu.cn

Key words: Kushui rose; Damask rose; essential oil; anxiolytic; elevated plus-maze; light-dark box

焦虑症是一种心情不愉快并且伴随着身体方面不适的精神类疾病,当今约有 3.6%~28.8% 的人终身患此病^[1],是一种较为普遍的精神疾病。在焦虑症的治疗中,除了药物治疗和心理治疗外,常常使用芳香疗法作为辅助治疗手段。研究表明,芳香疗法对于焦虑症有积极的疗效,并未出现任何不良反应^[2]。芳香疗法中常见的是精油按摩和精油嗅闻 2 种治疗方式,对于患者来说容易接受,不仅适合作为常规焦虑症治疗的辅助手段,更适合缓解没有达到焦虑症的精神“亚健康”状态。

玫瑰精油是一种芳香疗法中常用的精油,在调节情绪方面,玫瑰精油的气味能带给人愉悦感。据文献报道,大马士革玫瑰(*Rosa damascena*)精油可以缓解孕妇焦虑情绪^[3],香紫苏、薰衣草、迷迭香、玫瑰混合精油可以减轻中年妇女头痛及焦虑症状^[4]。苦水玫瑰(*Rosa sertata* × *Rosa rugosa*)作为我国特有的油用玫瑰花品种,被广泛应用于食品、护肤品、保健品领域。截止 2012 年,种植面积已经达到 3 500 hm²,占全国玫瑰种植面积的 75% 以上^[5],其精油的抗焦虑功效尚未见报道。

近年来,动物行为学模型被广泛应用于焦虑症发病机制的研究和抗焦虑药物的功效评价^[6],本文选用目前最常用的高架十字迷宫和明暗箱模型来评价大马士革玫瑰和苦水玫瑰精油的抗焦虑功效,结合对 2 种精油的化学成分分析探讨了其抗焦虑作用差异可能涉及的原因,为探究玫瑰精油抗焦虑功效机制提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 精油与试剂

大马士革玫瑰精油和苦水玫瑰精油,均由上海交通大学芳香植物研发中心提供。

地西洋注射液(5 mg/mL)由上海旭东海普药业有限公司生产。

1.2 实验动物

健康雄性 ICR 小鼠,4~5 周龄,清洁级,体质量 18~22 g,购自上海斯莱克公司。为了让实验动物适应新环境,动物购买后进行 7 d 适应性饲养再进行实验,所有的动物实验均在上海交通大学动物保护与使用协会的准许下进行。

1.3 主要仪器

动物香薰室:50 cm×50 cm×25 cm,不锈钢盒子,中间有十字通道,香薰灯置于最中央;小鼠高架十字迷宫(elevated plus-maze, EPM):十字迷宫组件由 2 条相对开放臂(30 cm×6 cm)和 2 条相对闭合臂(30 cm×6 cm×15 cm)及中央区(6 cm×6 cm)连接而成,整个迷宫置于距地面 55 cm 的支架上;明暗箱(light-dark box, LDB):尺寸为 55 cm×27 cm×30 cm(明箱尺寸为 27 cm×27 cm×30 cm,暗箱尺寸为 28 cm×27 cm×30 cm),购自上海欣软信息科技有限公司。

1.4 动物分组和处理办法

小鼠随机分组,每组 8 只。精油组:腹腔注射 0.3 mL 生理盐水后,将小鼠放在动物香薰室,嗅吸对应浓度精油溶液(分别取精油 20、100、500 μL,加入去离子水,配成 2 mL 溶液,加入适量吐温 80,搅拌使精油溶解在水中)30 min 后取出,进行后续行为学实验;对照组:腹腔注射 0.3 mL 生理盐水后,将小鼠放在动物香薰室,嗅吸香薰用空白溶液(100 μL 吐温 80 溶于 2 mL 去离子水中,搅拌均匀)30 min 后取出,进行后续实验;地西洋组:按照小鼠体重,腹腔注射 1 mg/kg 地西洋溶液后,将小鼠放在动物香薰室,嗅吸香薰用空白溶液 30 min 后取出,进行后续行为学实验。

急性嗅吸:小鼠进行一次精油嗅吸(30 min)后,立即进行行为学实验。

长期嗅吸:小鼠每天固定时间(14:00)进行一次熏香室嗅吸(30 min),第 14 天嗅吸完毕 2 h 后进行行为学实验。

1.5 精油成分分析

采用气相色谱质谱联用仪(gas chromatography-mass spectrometer, GC-MS)对精油进行化学成分的鉴定。使用设备型号为 7890B-5977A (Agilent 公司, USA)。

色谱条件:色谱柱为 HP-5MS (30 m×250 μm×0.25 μm, Agilent 公司, USA);载气为氦气(1 mL/min);样品进样量为 1 μL;分流比为 20:1;进样口温度为 260 °C;升温程序为初始温度 50 °C(保持 3 min) $\xrightarrow{4\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 280 °C $\xrightarrow{20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 300 °C(保持 5 min)。

质谱条件:接口温度为 280 °C;采用电子电离(electron ionization, EI)方式;电离能量为 70 eV;离子源温度为 230 °C;扫描范围为 35~450 m/z。

对总离子流图中各峰进行标准质谱库(Agilent

NIST 2014 library)检索,采用面积归一化法计算精油中各组分的相对含量。

精油采用直接进样,重复3次,取平均值。

1.6 高架十字迷宫模型(EPM)

EPM模型是利用动物对新奇环境的探索欲望和恐高心理的矛盾来考察动物焦虑情绪的模型,焦虑程度较低动物更倾向于探索开放臂,故在EPM实验中,进入开臂时间和次数的百分比越高,说明动物目前的焦虑状况越轻^[7]。

将小鼠头部正对其中一个闭合臂后置于高架十字迷宫的中央平台处,使其自由探索5 min,记录小鼠行为学参数。每次测试结束后用酒精将仪器擦拭干净,祛除小鼠留下的气味,再进行下一组测试。行为学参数如下:

a. 进入开放臂次数(open arm entry, OE): 进入到任一开放臂的次数,以小鼠4个爪子全部进入到臂内为准,任意一个爪子从该臂中完全退出视为该次进入活动完成;

b. 进入开放臂时间(open arm time, OT): 进入开放臂的时间,单位:s;

c. 进入闭合臂次数(close arm entry, CE): 进入到任一闭合臂的次数,以小鼠4个爪子全部进入到臂内为准,任意一个爪子从该臂中完全退出视为该次进入活动完成;

d. 进入闭合臂时间(close arm time, CT): 进入闭合臂的时间,单位:s;

由上述指标分别算出:

e. 进入开臂次数百分率(OE%) = $OE / (OE + CE) \times 100\%$

f. 开臂停留时间百分率(OT%) = $OT / (OT + CT) \times 100\%$

1.7 明暗箱模型(LDB)

LDB模型是根据动物对明亮的地方具有天然的厌恶和对环境好奇探索倾向的矛盾心理而建立的。在小鼠焦虑情绪较轻时,小鼠探索明箱的时间和活动距离会变长,反之,在小鼠焦虑情绪较重时,则更倾向于在暗箱活动^[8]。

将小鼠放入明箱中,抽出明暗箱中间的插板,任其自由探究5 min,记录5 min内小鼠的行为学指标。每次测试结束后用酒精将仪器擦拭干净,祛除小鼠留下的气味,再进行下一组测试。行为学参数如下:

a. 小鼠明箱时间比(light box time, LT%): 小鼠在明箱停留的时间占总时间的比例;

b. 小鼠明箱路程比(light box distance, LD%): 小鼠在明箱走过的路程占总路程的比例。

以上测试指标的数据由上海欣软信息科技有限公司提供的视频分析软件分析得到。

1.8 统计学分析办法

数据以平均值±标准误(mean±SE)表示。数据使用SPSS 18.0统计分析软件处理,采用单因素ANOVA,用Duncan法进行多重比较,以 $P < 0.05$ 作为差异具有显著性的标准。

2 结果与分析

2.1 精油化学成分分析结果

通过分析GC-MS的结果可以看出2种精油的成分存在差异,表1列出了2种玫瑰精油相对百分含量超过1%的成分。大马士革玫瑰精油中含量较高的成分分别为:香茅醇(16.87%)、香叶醇(11.63%)、正二十一烷(6.05%)、以及十九碳烯(11.26%);苦水玫瑰精油中含量较高的成分分别为:香茅醇(37.36%)、香叶醇(12.06%)、丁香酚(4.1%)以及金合欢醇(3.74%)等。

表1 2种玫瑰精油主要化学成分及其相对百分含量

Tab. 1 Main chemical constituents and relative contents of two rose essential oils

序号 No.	成分名称 Component name	相对百分含量/% Relative contents	
		大马士革玫瑰 Damask rose	苦水玫瑰 Kushui rose
1	蒎烯	3.02	/
2	芳樟醇	2.23	2.86
3	苯乙醇	4.22	/
4	香茅醇	16.87	37.36
5	香叶醇	11.63	12.06
6	柠檬醛	1.15	/
7	丁香酚	3.99	4.10
8	乙酸香叶酯	1.39	/
9	甲基丁香酚	1.08	1.37
10	1-石竹烯	1.39	/
11	别香橙烯	/	2.88
12	萜澄茄油萜	1.02	/
13	杜松烯	/	1.26
14	十五烷	1.67	/
15	十七烷	3.69	/
16	α-没药醇	/	1.02
17	金合欢醇	2.91	3.74
18	2-十三烷酮	/	2.05
19	十九碳烯	17.08	/
20	正二十烷	1.61	/
21	正二十一烷	6.05	1.16
22	植烷	/	1.21
合计		81.00	71.07

2.2 急性嗅吸2种玫瑰精油的小鼠行为学结果

在急性嗅吸不同浓度的2种玫瑰精油后,小鼠在高架十字迷宫的焦虑行为呈现出显著差异(表2)。从开放臂时间百分率和开放臂次数百分率这2项指标来看,苦水玫瑰精油和大马士革玫瑰精油的这2个指标均高于对照组,且小于地西洋

组,但仅有苦水玫瑰低浓度组(OT%:14.05±6.39,OE%:16.16±6.19)表现出与对照组(OT%:1.06±0.70,OE%:0.68±0.49)的显著差异($P<0.05$),且与正对照组地西洋组(OT%:15.23±5.77,OE%:16.65±5.60)相比无显著差异($P>0.05$)。

表2 急性嗅吸玫瑰精油对小鼠 OT 和 OE 的影响(mean±SE)

Tab. 2 Effects of acute sniffing of rose oils on OT and OE in mice (mean±SE)

组 Group	开臂时间百分率 OT%	开臂次数百分率 OE%
对照组	1.06±0.70 ^a	0.68±0.49 ^a
地西洋(1 mg·kg ⁻¹)	15.23±5.77 ^b	16.65±5.60 ^b
苦水玫瑰精油(10 μL·mL ⁻¹)	14.05±6.39 ^b	16.16±6.19 ^b
苦水玫瑰精油(50 μL·mL ⁻¹)	10.82±3.85 ^a	10.00±3.02 ^a
苦水玫瑰精油(250 μL·mL ⁻¹)	4.51±3.10 ^a	5.76±3.79 ^a
大马士革玫瑰精油(10 μL·mL ⁻¹)	1.98±1.23 ^a	5.21±3.04 ^a
大马士革玫瑰精油(50 μL·mL ⁻¹)	3.46±1.87 ^a	4.71±2.59 ^a
大马士革玫瑰精油(250 μL·mL ⁻¹)	1.39±0.92 ^a	2.51±1.68 ^a

注:同列数据中小写字母不同表示差异达到显著水平($P<0.05$), $n=8$ 。

Note: Different lower-case letters show significant difference among groups in the same column ($P<0.05$), $n=8$.

2.3 长期嗅吸苦水玫瑰精油的小鼠行为学结果

长期嗅吸苦水玫瑰同样表现出较好的抗焦虑作用。在EPM模型中,苦水玫瑰精油组(OT%:9.15±2.52,OE%:17.52±2.60)和地西洋组(OT%:11.43±1.21,OE%:21.68±2.85)在开放臂探索的时间百分率以及进入开放臂的次数百分率方面与对照组(OT%:2.14±0.99,OE%:

7.59±2.85)相比均有显著提高($P<0.05$)。在LDB模型中,苦水玫瑰精油组(LT%:48.04±2.28,LD%:46.26±3.19)和地西洋组(LT%:49.92±2.04,LD%:46.26±3.19)小鼠的明箱时间百分率以及明箱距离百分率均与对照组(LT%:39.98±4.26,LD%:34.17±4.88)表现出显著差异($P<0.05$)。

表3 长期嗅吸苦水玫瑰精油对小鼠 OT、OE、LT 和 LD 的影响(mean±SE)

Tab. 3 Effects of long-term sniffing Kushui rose oil on OT, OE, LT and LD in mice (mean±SE)

处理组 Group	开臂时间百分率 OT%	开臂次数百分率 OE%	明箱时间百分率 LT%	明箱距离百分率 LD%
对照组	2.14±0.99 ^a	7.59±2.85 ^a	39.98±4.26 ^a	34.17±4.88 ^a
地西洋组(1 mg·kg ⁻¹)	11.43±1.21 ^b	21.68±2.85 ^b	49.92±2.04 ^b	44.12±2.37 ^b
苦水玫瑰精油组 (10 μL·mL ⁻¹)	9.15±2.52 ^b	17.52±2.60 ^b	48.04±2.28 ^b	46.26±3.19 ^b

注:同列数据中小写字母不同表示差异达到显著水平($P<0.05$), $n=8$ 。

Note: Different lower-case letters show significant difference among groups in the same column ($P<0.05$), $n=8$.

3 讨论

在急性嗅吸实验中,对比了不同浓度的2种玫瑰精油在小鼠EMP行为模型上的差异,实验发现,在小鼠探究开放臂的时间和次数比例方面,仅苦水玫瑰低浓度组(10 μL/mL)与对照组显示出显著差异,3组大马士革玫瑰精油均没有显示出显著差异;

由此可见,小鼠急性嗅吸苦水玫瑰精油后的抗焦虑效果要好于嗅吸大马士革玫瑰精油。苦水玫瑰精油仅在低浓度组显示出抗焦虑功效,说明空气中的精油含量过高不利于焦虑情绪的缓解,只有在合适的浓度下才有效果。在研究嗅吸薰衣草精油对高血压患者血压的影响时发现,嗅吸1%浓度的薰衣草精油降血压的效果要比嗅吸100%和0.1%两种浓度好^[9]。Bradley等将沙鼠暴露在一定浓度的大马士

革玫瑰精油后,进行了 EMP 和 LBD 模型测试,发现大马士革玫瑰精油具有一定的抗焦虑功效^[10]。实验结果不同的原因可能是使用了 ICR 小鼠、沙鼠 2 种不同的实验动物。

根据急性嗅吸实验的结果,选用苦水玫瑰低浓度组进行长期嗅吸实验,在连续嗅吸 14 d 精油后分别进行 EPM 和 LDB 模型测试,结果显示苦水玫瑰精油组无论是在 EPM 模型还是在 LDB 模型中,均与对照组有显著差异,且与正对照地西洋组无显著差异。由此可见,长期嗅吸低浓度苦水玫瑰精油具有显著的抗焦虑效果。本研究中粗略地将嗅吸浓度分为高中低 3 个梯度,并未严谨的测试小鼠嗅吸玫瑰精油的最佳浓度,若要测得最佳嗅吸浓度,需进一步筛选。

苦水玫瑰精油和大马士革玫瑰精油的化学成分分析结果显示苦水玫瑰精油中的主要成分为:香茅醇、香叶醇、金合欢醇;大马士革玫瑰精油中的主要成分为:香茅醇、香叶醇、橙花醇、9-十九碳烯、正二十一烷,以及十九碳烯。在 2 种精油均含有的成分中,香茅醇含量差异较大;仅苦水玫瑰精油含有的成分中,杜松烯、别香橙烯、 α -没药醇等含量较高,以上成分的差异可能是造成了其抗焦虑功效差别的原因。玫瑰精油中单体化合物的功效研究未见报道,未来研究中可以将重点放在单体化合物上,找出对抗焦虑功效影响最大的一种或几种化合物。

综上所述,在本研究的动物行为学模型中,苦水玫瑰精油表现出显著的抗焦虑功效,而大马士革玫瑰精油未表现出抗焦虑功效。这其中所涉及的抗焦虑机制还有待进一步研究。大马士革玫瑰精油在国外研究中被证明具有包括镇痛、抗惊厥、催眠等的功效^[11-13],而苦水玫瑰作为我国特色资源,在本研究中表现出优于大马士革玫瑰的抗焦虑功效,对其功效的挖掘以及其机制的进一步研究有助于让我国的油用玫瑰品种在国际舞台上大放异彩。

参考文献:

- [1] 岳莉莉,柏光泽. 抑郁症与焦虑障碍的研究现状[J]. *医学综述*, 2013, 19(6): 1069-1072.
- [2] Lee Y L, Wu Y, Tsang H W, *et al.* A systematic review on the anxiolytic effects of aromatherapy in people with anxiety symptoms[J]. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 2011, 17(2): 101-108.
- [3] Kheirkhah M, Vali Pour N S, Nisani L, *et al.* Comparing the effects of aromatherapy with rose oils and warm foot bath on anxiety in the first stage of labor in nulliparous women[J]. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 2014, 16(9): e14455.
- [4] Cha J H, Kim M J, Kim H S, *et al.* Effects of aromatherapy in blending oil of basil, lavender, rosemary, and rose on headache, anxiety and serum cortisol level in the middle-aged women[J]. *기초간호자연과학회지 제12권 제3호*, 2010, 12(3): 133-139.
- [5] 于长青,赵煜,徐琼,等. 对苦水玫瑰产业发展的思考[J]. *甘肃科技*, 2012, 28(20): 14-15.
- [6] Crawley J N. Exploratory behavior models of anxiety in mice[J]. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 1985, 9(1): 37-44.
- [7] Pellow S, Chopin P, File S E, *et al.* Validation of open; Closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat [J]. *Journal of Neuroscience Methods*, 1985, 14(3): 149-167.
- [8] Lorenzini C A, Bucherelli C, Giachetti A. Passive and active avoidance behavior in the light-dark box test [J]. *Physiology & Behavior*, 1984, 32(4): 687-689.
- [9] 李家霞,刘云峰,李光武,等. 吸入不同浓度薰衣草精油对高血压患者血压的影响[J]. *安徽医药*, 2011, 15(11): 1418-1421.
- [10] Bradley B F, Starkey N J, Brown S L, *et al.* The effects of prolonged rose odor inhalation in two animal models of anxiety[J]. *Physiology & Behavior*, 2007, 92(5): 931-938.
- [11] Rakhshandah H, Shakeri M T, Ghasemzadeh M R. Comparative hypnotic effect of rosa damascena fractions and diazepam in Mice [J]. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2007, 6(3): 193-197.
- [12] Kheirabadi M, Moghimi A, Rakhshandeh H, *et al.* Evaluation of the anticonvulsant activities of rosa damascena on the PTZ induced seizures in Wistar rats[J]. *Journal of Biological Sciences*, 2008, 8(2): 157-160.
- [13] Rakhshandeh H, Vahdatimashhadian N, Dolati K, *et al.* Antinociceptive effect of rosa damascena in mice [J]. *Journal of Biological Sciences*, 2008, 8(1): 181-185.