



Research  
Green Plant Protection Innovation—Article

## 单萜类化合物芳樟醇、甲基丁香酚、草蒿脑和香茅醛对配体门控离子通道的作用模式

Amy S. Li<sup>a,c</sup>, Akimasa Iijima<sup>a</sup>, Junhao Huang<sup>a,†</sup>, Qing X. Li<sup>b</sup>, Yongli Chen<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> College of Natural and Computational Sciences, Hawaii Pacific University, Kaneohe, HI 96744, USA

<sup>b</sup> Department of Molecular Biosciences and Bioengineering, University of Hawaii at Manoa, Honolulu, HI 96822, USA

<sup>c</sup> Department of Internal Medicine, University of Colorado School of Medicine, Aurora, CO 80045, USA

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 17 January 2019

Revised 15 July 2019

Accepted 23 July 2019

Available online 7 March 2020

#### 关键词

精油

$\gamma$ -氨基丁酸A型受体

芳樟醇

单萜

烟碱型乙酰胆碱受体

### 摘要

在传统的医学治疗中，精油被用作镇静剂、抗惊厥剂以及局部麻醉剂，还可以用作储藏食品、水果、蔬菜和谷物等的防腐剂，同时，它还能用作食品生产的生物农药。芳樟醇（LL）以及其他一些主要组分，如甲基丁香酚（ME）、草蒿脑（EG）和香茅醛是许多精油（如罗勒精油）中的活性化学成分。罗勒精油以及上述单萜类化合物在驱除害虫等方面有明显的功效。然而，这些化学成分的作用机制尚不明确。众所周知， $\gamma$ -氨基丁酸A型受体（GABA<sub>A</sub>R）和烟碱型乙酰胆碱受体（nAChR）是目前市场上使用的合成杀虫剂的主要分子靶标。此外，GABA<sub>A</sub>R靶向治疗也已经有了数十年的临床应用实践，如巴比妥类药物和苯二氮类药物。在本研究中，我们研究了LL、ME、EG和香茅醛对GABA<sub>A</sub>R和nAChR的电生理作用，以进一步了解它们作为传统药物治疗剂和杀虫剂的多功能性。研究表明，LL对GABA<sub>A</sub>R和nAChR均有抑制作用，这或许可以解释LL的杀虫活性。LL是GABA<sub>A</sub>R的一种浓度依赖性、非竞争性抑制剂，因为在实验中我们发现，小鼠 $\alpha 1\beta 3\gamma 2L$  GABA<sub>A</sub>R的 $\gamma$ -氨基丁酸（GABA）半最大效应浓度（EC<sub>50</sub>）值不受LL影响：在LL不存在或存在5 mmol·L<sup>-1</sup> LL的情况下，该半最大效应浓度值分别为(36.2 ± 7.9)  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以及(36.1 ± 23.8)  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。LL对GABA<sub>A</sub>R的半抑制浓度（IC<sub>50</sub>）约为3.2 mmol·L<sup>-1</sup>。考虑到在精油之中存在着多种单萜类化合物，所以LL可能与此前被表征为GABA<sub>A</sub>R激动剂和正变构调节物的ME以及其他单萜类化合物具有协同作用，这为LL的镇静、抗惊厥效用和杀虫活性提供了一种可能的解释。

© 2020 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## 1. 引言

芳樟醇（LL）、甲基丁香酚（ME）、草蒿脑（EG）和香茅醛是从许多植物如罗勒、薰衣草、柠檬草等提取的植物精油中的主要化学成分。在传统的医学疗法中，精油被广泛用作镇静剂、抗惊厥药、抗微生物药、抗焦虑药和局部麻醉剂[1,2]。在现代应用中，我们也常常能在芳香疗法产品[3]、调味剂[4]、香料、杀虫剂[5,6]以

及各种家用清洁剂[7]中发现上述化合物。罗勒精油的许多化学成分在实验动物模型中显示出抗惊厥活性[8]。罗勒精油在小鼠纤维肌痛模型中也表现出了镇痛作用[9]。此外，LL（许多精油尤其是罗勒精油的主要成分）在戊四氮、苦毒素以及最大电休克发作模型中均有效[10,11]，并在小鼠模型中显示出镇静作用[12]。此前的研究发现，这些特性与 $\gamma$ -氨基丁酸（GABA）能系统、胆碱能系统、多巴胺能系统、谷氨酸能系统、5-羟色胺

\* Corresponding author.

E-mail address: [ychen@hpu.edu](mailto:ychen@hpu.edu) (Y. Chen).

<sup>†</sup> Current address: Guangdong Provincial Key Laboratory of Sports and Health Promotion, Scientific Research Center, Guangzhou Sport University, Guangzhou 510500, China.

能系统和副交感神经系统有关[6,8,13–16]。然而, 这些化学成分, 包括LL、ME、EG和香茅醛的分子作用机制尚不清楚。

$\gamma$ -氨基丁酸A型受体(GABA<sub>A</sub>R)是中枢神经系统(CNS)中主要抑制性的神经递质受体。GABA<sub>A</sub>R属于cys-环配体门控离子通道家族, 烟碱型乙酰胆碱受体(nAChR)亦属于此类, 它是一种兴奋性神经递质受体。许多研究表明, GABA<sub>A</sub>R在癫痫病和其他多种神经退行性疾病中起着关键作用。许多临床处方药(诸如苯二氮卓类药物)均能增强GABA<sub>A</sub>R的抑制功能。有趣的是, 某些抗惊厥药物对GABA<sub>A</sub>R的增强作用与药物的抗惊厥作用没有太大的相关性, 其中一些药物对Nav1.2电压门控钠离子(Na<sup>+</sup>)通道有抑制作用[17,18]。此外, 据报道, 一种叫做拉莫三嗪的抗惊厥药物除了阻断电压门控Na<sup>+</sup>通道[20]外, 还可以有效地抑制nAChR [19]。因此, 鉴于罗勒精油已经被广泛用作镇静剂、抗惊厥药、生物农药和食品防腐剂[5,21], 为了进一步阐明罗勒精油中主要的单萜成分(图1)的分子作用机制, 本文将着手研究这些单萜成分对nAChR和GABA<sub>A</sub>R的电生理作用。

## 2. 材料和方法

### 2.1. 化学药品

实验所用的所有的化学药品: 包括GABA、(-)-LL、ME、EG、(R)-香茅醛[(R)-C]和(S)-香茅醛[(S)-C], 以及戊四氮(PTZ), 除非另作说明, 均购自西格玛奥德里奇公司(位于美国密苏里州圣路易斯)。

### 2.2. 细胞培养

试验所用细胞为分别能够稳定地表达小鼠 $\alpha 1\beta 3\gamma 2L$  GABA<sub>A</sub>R [22,23]和小鼠 $\alpha 3\beta 4$  nAChR亚型[24]的WSS-1细胞系(ATCC; CRL-2029<sup>TM</sup>)以及KX $\alpha 3\beta 4R2$ 细胞系(乔治敦大学Yingxian Xiao博士慷慨馈赠)。这两株细胞系均置于GlutaMAX<sup>TM</sup>培养基(Thermo Fisher Scientific

公司, 美国沃尔瑟姆)中并在37 °C和5% CO<sub>2</sub>的环境中培养。此外, 在上述培养基中添加10%的胎牛血清、0.4 mg·mL<sup>-1</sup> G-418、100单位·mL<sup>-1</sup>青霉素和0.1 mg·mL<sup>-1</sup>链霉素。每周进行两次传代培养, 采用1:5的稀释比, 融合率为75%~90%。这些细胞在组织培养板中培育之后的24~72 h之间被用于全细胞电流记录。

### 2.3. 全细胞电流记录

使用计算机控制的膜片钳放大器(EPC 10 USB)和内置数字化仪(LIH 8+8)(HEKA Elektronik公司, 美国马萨诸塞州霍利斯顿)放大全细胞电流, 并使用数据采集软件PatchMaster(HEKA Elektronik公司)进行记录。使用Narishige PC-10垂直拔管器(Narishige International USA公司, 美国纽约州Amityville)从硼硅酸盐玻璃毛细管(World Precision Instruments公司, 美国佛罗里达州萨拉索塔)中抽出2~3 M $\Omega$ 的记录毛细管。细胞内电极缓冲液由140 mmol·L<sup>-1</sup> CsCl、10 mmol·L<sup>-1</sup> 乙二醇四乙酸(EGTA)、2 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>、10 mmol·L<sup>-1</sup> 四乙基氯化铵(TEA-Cl), 以及10 mmol·L<sup>-1</sup> 4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙烷磺酸(HEPES)组成, 用CsOH调节pH至7.4。当使用KX $\alpha 3\beta 4R2$ 细胞系(表达nAChR)时, 上述细胞内缓冲液中不添加TEA-Cl。细胞外电极缓冲液由145 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl、5 mmol·L<sup>-1</sup> KCl、2 mmol·L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>、1.5 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>和25 mmol·L<sup>-1</sup> HEPES组成, 并用NaOH调节至pH = 7.4。接触细胞的膜片钳设置为-60 mV。该实验在室温(25 °C)环境下进行并至少重复三次。

### 2.4. 快速配体溶液输送

前人的研究已经详细描述了用于将配体溶液快速送至细胞表面膜蛋白的细胞流动装置[25]。综上所述, 其操作是在入口和出口管道之间连接一个中间孔直径为150  $\mu$ m的U形管, 并将入口和出口管用Minipuls<sup>®</sup> 3号蠕动泵(Glison公司, 美国威斯康星州米德尔敦)泵送。系统自动触发并控制溶液输送的时间和长度。这种装置允许配体溶液在细胞内流动并在毫秒内实现交换。

### 2.5. 曲线拟合

我们用面向Windows系统的GraphPad Prism软件5.04版(GraphPad Software公司, 美国加利福尼亚州圣地亚哥)对不存在LL或存在5 mmol·L<sup>-1</sup> LL两种不同情况下的LL受体抑制曲线和GABA<sub>A</sub>R的剂量依赖性反应

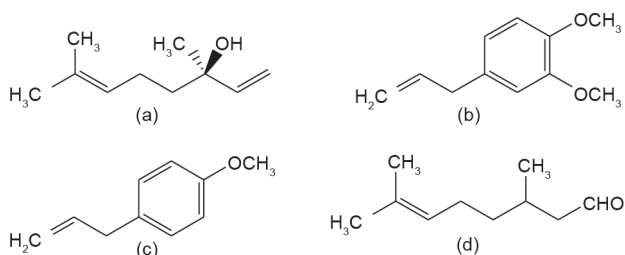


图1. (-)-LL (a)、ME (b)、EG (c) 和香茅醛 (d) 的结构。

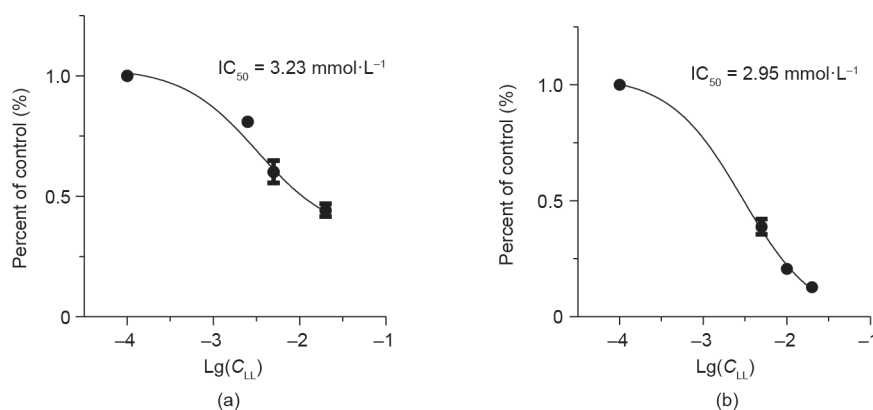


图2. LL对100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  GABA诱导的 $\alpha 1\beta 3\gamma 2\text{L}$  GABA<sub>A</sub>R (a)和3  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氨基乙酰胆碱诱导的 $\alpha 3\beta 4$  nAChR (b)的全细胞电流的剂量依赖性抑制。小鼠 $\alpha 1\beta 3\gamma 2\text{L}$  GABA<sub>A</sub>R在WSS-1细胞中稳定表达,小鼠nAChR亚型在KX $\alpha 3\beta 4\text{R}2$ 细胞系中稳定表达。LL对GABA<sub>A</sub>R的最大抑制作用是对照的44%和nAChR的13%。氨基乙酰胆碱是一种稳定的乙酰胆碱类似物,被用作nAChR全细胞电流记录的对照。

曲线进行拟合。激动剂的浓度-响应关系用方程式 $I/I_{\text{max}} = 1/[1 + (\text{EC}_{50}/C_A)^{n_H}]$ 拟合,其中, $I$ 和 $I_{\text{max}}$ 分别代表给定激动剂浓度( $C_A$ )下的电流和最大激动剂诱导电流下的电流, $\text{EC}_{50}$ 表示半最大效应浓度, $n_H$ 为希尔系数(Hill coefficient)。戊四氮(PTZ)抑制响应关系用方程式 $I_A/I_0 = 1/[1 + (\text{IC}_{50}/C_{\text{LL}})^{n_H}]$ 拟合,其中, $I_A$ 和 $I_0$ 分别表示LL存在以及不存在时的电流幅, $\text{IC}_{50}$ 表示半抑制浓度, $C_{\text{LL}}$ 是LL的浓度。数据用平均值 $\pm$ 均值标准差(SEM)表示。

### 3. 结果

#### 3.1. 芳樟醇的剂量依赖性抑制

将各种浓度的LL与接近饱和的100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的GABA共同施用。与100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  GABA诱导的控制电流相比,很明显,LL剂量依赖性地抑制 $\alpha 1\beta 3\gamma 2\text{L}$  GABA<sub>A</sub>R [图2 (a)]。有趣的是,当与氨基乙酰胆碱联合应用时,LL还以与在GABA<sub>A</sub>R上相似的效力对 $\alpha 3\beta 4$  nAChR产生了抑制作用[图2 (a)、(b)],尽管其效力似乎更强。LL对GABA<sub>A</sub>R的不完全抑制可能是由于LL在水溶液中的溶度极限所致,因为我们所能获得的LL溶液的最高浓度只有50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。nAChR的全细胞电流由接近饱和和浓度的氨基乙酰胆碱诱导,氨基乙酰胆碱是内源性激动剂乙酰胆碱的稳定类似物。

在不存在LL或存在5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  LL两种不同的情况下,GABA的剂量-反应曲线表明,LL抑制了激动剂GABA诱导的全细胞电流,而激动剂亲和力没有改变(图3):在LL不存在以及存在的情况下, $\text{EC}_{50}$ 值分别为(36.2  $\pm$  7.9)  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和(36.1  $\pm$  23.8)  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。因此,LL

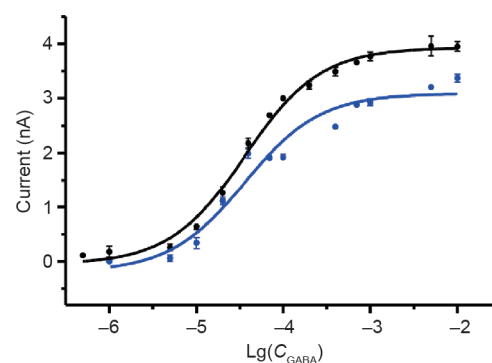


图3. 在表达小鼠 $\alpha 1\beta 3\gamma 2\text{L}$  GABA<sub>A</sub>受体的WSS-1细胞中,不存在(黑色)和存在(蓝色)5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  LL的两种情况下,GABA的剂量-反应曲线。不存在和存在LL时, $\text{EC}_{50}$ 的值分别为(36.2  $\pm$  7.9)  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和(36.1  $\pm$  23.8)  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。 $C_{\text{GABA}}$ : GABA的浓度。

是该受体的非竞争性抑制剂。

戊巴比妥是一种被美国食品药品监督管理局批准的用于治疗癫痫发作的抗惊厥类药物,在低浓度( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )时可增强GABA<sub>A</sub>R的功能,但在高浓度( $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )时可抑制GABA<sub>A</sub>R的功能[26,27]。因此,我们进一步测试了在25  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、75  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、500  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和1000  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下,LL对GABA<sub>A</sub>R的影响。然而,这些低浓度的LL均未对GABA<sub>A</sub>R产生任何影响(数据未显示)。

#### 3.2. LL对GABA<sub>A</sub>R的作用方式

戊四氮(PTZ),也称甲硝唑(metrazol),可引起惊厥,并已用于动物模型中作为诱发癫痫的一种方式。PTZ诱导的小鼠癫痫模型(即scMET小鼠模型)已通过诸如美国国立卫生研究院(NIH)癫痫治疗筛选程序<sup>†</sup>之类的程序,现已用于抗惊厥药物的常规筛选。我们

<sup>†</sup> <https://www.ninds.nih.gov/Current-Research/Focus-Research/Focus-Epilepsy/ETSP>.

想知道LL与PTZ是否作用于同一位点。结果表明,与单独使用LL或PTZ相比,当LL与PTZ共同使用时,其对GABA<sub>A</sub>R的抑制作用显著增加[图4(a)]。GABA<sub>A</sub>R上的PTZ结合位点与苦毒素结合位点相重叠[28,29]。此外,LL对GABA<sub>A</sub>R的拮抗作用是可逆的[图4(b)]。因此,LL在不同于PTZ/苦毒素的位点发挥其可逆的变构GABA<sub>A</sub>R调节作用。

### 3.3. 甲基丁香酚、草蒿脑和香茅醛是 GABA<sub>A</sub>R 和 nAChR 的弱抑制剂

ME在浓度大于100 μmol·L<sup>-1</sup> (高达10 mmol·L<sup>-1</sup>) 时,是一种GABA<sub>A</sub>R的浓度依赖性直接激动剂,同时,在低浓度的GABA (30 μmol·L<sup>-1</sup>) 存在时,它会敏化并增强GABA诱导的电流[30],这为其抗惊厥活性提供了可能的解释。考虑到LL在高剂量时也会对GABA<sub>A</sub>R有抑制作用,我们进一步拓展了此研究,以评估高浓度 (mmol·L<sup>-1</sup>量级) 下ME的拮抗活性。显然,高浓度 (10 mmol·L<sup>-1</sup>) 时,ME对GABA<sub>A</sub>R的拮抗作用较弱(图5)。在高浓度时,EG也有类似的作用(图5)。有趣的是,(*R*)-C和(*S*)-C对于α3β4 nAChR均呈弱抑制作用(数据未显示);而(*R*)-C似乎对GABA<sub>A</sub>R没有作用, (*S*)-C对于GABA<sub>A</sub>R有较弱的抑制作用(图5)。总之,ME、EG和(*S*)-C是GABA<sub>A</sub>R的弱拮抗剂,需要非常高的浓度才能使得GABA诱导电流产生变化。

## 4. 讨论

根据目前已有数据,我们很难对EG和(*R*)-C/(*S*)-C的主要靶点做出准确论断,尽管作用机制尚不明确,但

(*R*)-C/(*S*)-C已经在体内表现出了抗惊厥和镇痛作用,据推测,其作用可能是通过GABA<sub>A</sub>R调节发生的[31,32]。然而,在目前的体外研究中,EG和(*S*)-C对GABA<sub>A</sub>R和nAChR的拮抗作用较弱,这表明其主要的靶标可能位于其他位置。在低浓度下,ME表现为GABA<sub>A</sub>R的激动剂;在中等浓度时,又表现为GABA<sub>A</sub>R正变构调节物[30]。然而,我们已经证明高浓度时它可能是一种GABA<sub>A</sub>R的弱拮抗剂,这表明ME的作用非常复杂。

本研究的结果表明,LL是一种浓度依赖性GABA<sub>A</sub>R拮抗剂,可在GABA<sub>A</sub>R的PTZ/苦毒素位点之外调节其活性。在本研究中观察到的LL对GABA<sub>A</sub>R的抑制作用与先前的研究结果不同,LL在细胞和小鼠模型中具有抗惊厥活性[8,33],并对中枢神经系统(CNS)、感觉神经元[34]甚至周围神经具有抑制作用[35]。LL对GABA<sub>A</sub>R的抑制作用表明神经元具有兴奋性(如类癫痫活性),这或许为其作为杀虫剂的作用机制提供了可能的解释[5,6]。

虽然本研究的发现似乎与先前关于LL抗惊厥和镇静作用的研究相矛盾,但正如我们已提到的,LL具有多种靶标,包括*N*-甲基-*D*-天冬氨酸(NMDA)受体亚型[11,33,36]和电压门控的Na<sup>+</sup>和Ca<sup>2+</sup>通道[16,35]。研究还证明LL可以抑制神经肌肉接头处乙酰胆碱的释放以及微型终板电流衰减的动力学[37]。我们的结果表明,LL是神经元nAChR的有效抑制剂。考虑到肌肉类型与神经元nAChR之间的同源性以及许多变构调节剂的共享性[38],这一发现亦不足为奇。因此,有必要对LL的主要分子作用机制做进一步研究。正如其他研究[36]所建议的,我们可以假设nAChR、NMDA受体和(或)电压门控Na<sup>+</sup>和Ca<sup>2+</sup>通道是可能的靶点,特别是考

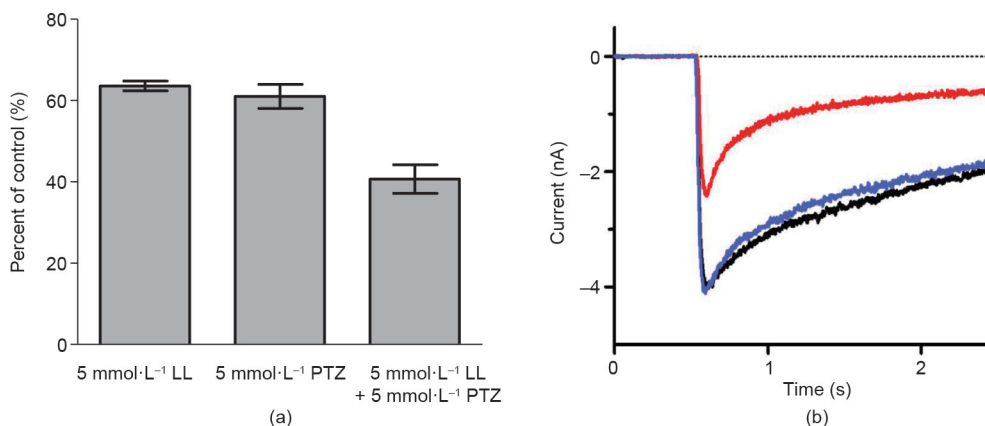


图4. (a) 与单独使用LL或PTZ相比,将LL与PTZ共同应用时,发现对小鼠α1β3γ2L GABA<sub>A</sub>R的抑制作用显著增加。(b) 分别由100 μmol·L<sup>-1</sup> GABA (对照,黑色)、5 mmol·L<sup>-1</sup> LL+100 μmol·L<sup>-1</sup> GABA (红色) 诱发的代表性全细胞电流记录,在处理1 min后仅用100 μmol·L<sup>-1</sup> GABA (蓝色) 恢复到原始对照电流。

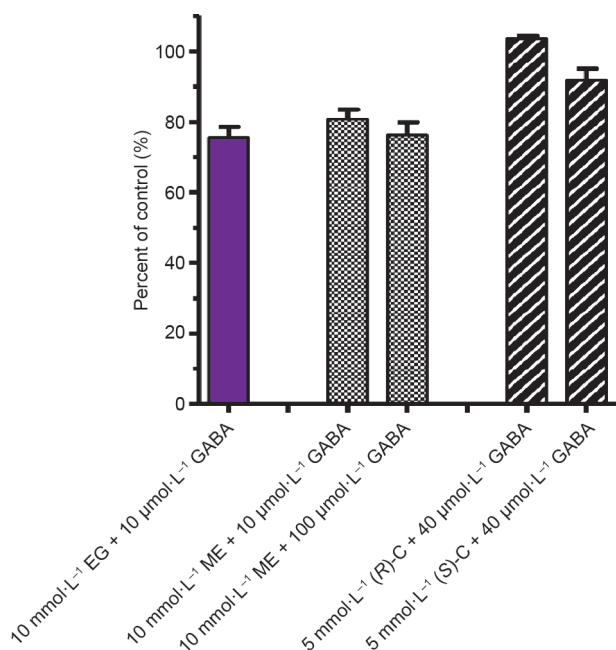


图5. 10 mmol·L<sup>-1</sup> ME分别与10 μmol·L<sup>-1</sup> GABA和100 μmol·L<sup>-1</sup> GABA共同施用, 对GABA<sub>A</sub>R的功能起弱抑制作用。将10 mmol·L<sup>-1</sup> EG和10 μmol·L<sup>-1</sup> GABA共同施用, 对GABA<sub>A</sub>R功能有抑制作用。当与40 μmol·L<sup>-1</sup> GABA共同施用, 5 mmol·L<sup>-1</sup> (R)-C不会抑制GABA<sub>A</sub>R诱导的电流; 而在共同施用40 μmol·L<sup>-1</sup> GABA的条件下, 5 mmol·L<sup>-1</sup> (S)-C则会对GABA<sub>A</sub>R呈弱抑制作用。

虑到NMDA受体和电压门控的Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>通道是许多其他抗惊厥药物的靶点[39]。

更重要的是, CNS中这些受体之间的共定位和串扰[40,41]使得其与小分子的相互作用不同于此处所使用的简单重组系统。有越来越多的证据证明兴奋性和一致性的神经递质受体之间存在共定位和串扰现象。正如已经被人们广泛研究的, 可以通过NMDA受体的激活来增强和抑制GABA<sub>A</sub>R功能, 反之亦然[42–45]。nAChR和GABA<sub>A</sub>R在大脑的许多区域也有共同定位, 据报道, nAChR的激活可以阻断GABA诱导的海马神经元电流[46]。然而, 此间的相互作用机制还没有被我们很好地了解。

精油由多种单萜类化合物组成(包括LL、ME、EG和香茅醛)。我们可以合理地假设LL以及其他单萜类化合物以不同的效力调节多个不同的受体和通道, 以达到协同效应[5]。单萜类化合物也可能调节不同神经递质受体之间的相互作用。研究中所观察到的单萜类化合物的作用模式可以对精油成分作为镇静剂、抗惊厥剂、局部麻醉剂和杀虫剂的使用提供一定的支持。这一结果值得进一步研究和开发作为人类治疗和植物杀虫剂的精油成分, 特别是单萜类化合物对各种昆虫神经受体所表现

出的选择性, 这一点在实际应用中尤为重要。

## Acknowledgements

This project was supported by grants from Bayer AG Crop Science (Grant4Targets 201701018), the National Center for Research Resources (5P20RR016467-11), and the National Institute of General Medical Sciences (P20GM103466) of the National Institutes of Health. The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the National Institutes of Health and Bayer AG Crop Science.

## Compliance with ethics guidelines

Amy S. Li, Akimasa Iijima, Junhao Huang, Qing X. Li, and Yongli Chen declare that they have no conflicts of interest or financial conflicts to disclose.

## References

- [1] Jeon S, Hur J, Jeong HJ, Koo BS, Pak SC. SuHeXiang Wan essential oil alleviates amyloid beta induced memory impairment through inhibition of tau protein phosphorylation in mice. *Am J Chin Med* 2011;39(5):917–32.
- [2] Agra MF, Baracho GS, Nurit K, Basilio IJ, Coelho VP. Medicinal and poisonous diversity of the flora of "Cariri Paraibano", Brazil. *J Ethnopharmacol* 2007;111(2):383–95.
- [3] Lawless J. The encyclopedia of essential oils: the complete guide to the use of aromatic oils in aromatherapy, herbalism, health, and well being. San Francisco: Conari Press; 2013.
- [4] Preedy VR, editor. Essential oils in food preservation, flavor and safety. Amsterdam: Academic Press; 2016.
- [5] Chang CL, Cho IK, Li QX. Insecticidal activity of basil oil, trans-anethole, estragole, and linalool to adult fruit flies of *Ceratitis capitata*, *Bactrocera dorsalis*, and *Bactrocera cucurbitae*. *J Econ Entomol* 2009;102(1):203–9.
- [6] Jankowska M, Rogalska J, Wyszowska J, Stankiewicz M. Molecular targets for components of essential oils in the insect nervous system – a review. *Molecules* 2017;23(1):34.
- [7] Letizia CS, Cocchiara J, Lalko J, Api AM. Fragrance material review on linalool. *Food Chem Toxicol* 2003;41(7):943–64.
- [8] de Almeida RN, Agra Mde F, Maior FN, de Sousa DP. Essential oils and their constituents: anticonvulsant activity. *Molecules* 2011;16(3):2726–42.
- [9] Nascimento SS, Araújo AA, Brito RG, Serafini MR, Menezes PP, DeSantana JM, et al. Cyclodextrin-complexed *Ocimum basilicum* leaves essential oil increases Fos protein expression in the central nervous system and produce an antihyperalgesic effect in animal models for fibromyalgia. *Int J Mol Sci* 2015;16(1):547–63.
- [10] De Sousa DP, Nóbrega FF, Santos CC, de Almeida RN. Anticonvulsant activity of the linalool enantiomers and racemate: investigation of chiral influence. *Nat Prod Commun* 2010;5(12):1847–51.
- [11] Batista PA, Werner MF, Oliveira EC, Burgos L, Pereira P, Brum LF, et al. Evidence for the involvement of ionotropic glutamatergic receptors on the antinociceptive effect of (–)-linalool in mice. *Neurosci Lett* 2008;440(3):299–303.
- [12] Hirai M, Ito M. Sedative effects of the essential oil and headspace air of *Ocimum basilicum* by inhalation in mice. *J Nat Med* 2019;73(1):283–8.
- [13] Melo FH, Moura BA, de Sousa DP, de Vasconcelos SM, Macedo DS, Fonteles MM, et al. Antidepressant-like effect of carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement of dopaminergic system. *Fundam Clin Pharmacol* 2011;25(3):362–7.
- [14] Melo FH, Venâncio ET, de Sousa DP, de França Fonteles MM, de Vasconcelos SM, Viana GS, et al. Anxiolytic-like effect of carvacrol (5-isopropyl-2-

- methylphenol) in mice: involvement with GABAergic transmission. *Fundam Clin Pharmacol* 2010;24(4):437–43.
- [15] Peana AT, De Montis MG, Sechi S, Sircana G, D'Aquila PS, Pippia P. Effects of (-)-linalool in the acute hyperalgesia induced by carrageenan, L-glutamate and prostaglandin E<sub>2</sub>. *Eur J Pharmacol* 2004;497(3):279–84.
- [16] Malcolm BJ, Tallian K. Essential oil of lavender in anxiety disorders: ready for prime time? *Ment Health Clin* 2018;7(4):147–55.
- [17] Greenfield LJ Jr. Molecular mechanisms of antiseizure drug activity at GABA<sub>A</sub> receptors. *Seizure* 2013;22(8):589–600.
- [18] Kamiński K, Obniska J, Chlebek I, Liana P, Pękala E. Synthesis and biological properties of new N-Mannich bases derived from 3-methyl-3-phenyl- and 3,3-dimethyl-succinimides. Part V *Eur J Med Chem* 2013;66:12–21.
- [19] Zheng C, Yang K, Liu Q, Wang MY, Shen J, Vallés AS, et al. The anticonvulsant drug lamotrigine blocks neuronal α4β2 nicotinic acetylcholine receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2010;335(2):401–8.
- [20] Xie X, Lancaster B, Peakman T, Garthwaite J. Interaction of the antiepileptic drug lamotrigine with recombinant rat brain type IIA Na<sup>+</sup> channels and with native Na<sup>+</sup> channels in rat hippocampal neurones. *Pflugers Arch* 1995;430(3):437–46.
- [21] Li QX, Chang CL. Basil (*Ocimum basilicum* L.) oils. In: Preedy VR, editor. *Essential oils in food preservation, flavor and safety*. Amsterdam: Academic Press; 2016. p. 231–8.
- [22] Wong G, Sei Y, Skolnick P. Stable expression of type I gamma-aminobutyric acidA/benzodiazepine receptors in a transfected cell line. *Mol Pharmacol* 1992;42(6):996–1003.
- [23] Davies PA, Hoffmann EB, Carlisle HJ, Tyndale RF, Hales TG. The influence of an endogenous β3 subunit on recombinant GABA<sub>A</sub> receptor assembly and pharmacology in WSS-1 cells and transiently transfected HEK293 cells. *Neuropharmacology* 2000;39(4):611–20.
- [24] Xiao Y, Meyer EL, Thompson JM, Surin A, Wroblewski J, Kellar KJ. Rat α3/β4 subtype of neuronal nicotinic acetylcholine receptor stably expressed in a transfected cell line: pharmacology of ligand binding and function. *Mol Pharmacol* 1998;54(2):322–33.
- [25] Udgaonkar JB, Hess GP. Chemical kinetic measurements of a mammalian acetylcholine receptor by a fast-reaction technique. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84(24):8758–62.
- [26] Akk G, Steinbach JH. Activation and block of recombinant GABA<sub>A</sub> receptors by pentobarbitone: a single-channel study. *Br J Pharmacol* 2000;130(2):249–58.
- [27] Steinbach JH, Akk G. Modulation of GABAA receptor channel gating by pentobarbital. *J Physiol* 2001;537(Pt 3):715–33.
- [28] Dibas MI, Dillon GH. The central nervous system convulsant pentylenetetrazole stimulates gamma-aminobutyric acid (GABA)-activated current in picrotoxin-resistant GABAA receptors in HEK293 cells. *Neurosci Lett* 2000;285(3):193–6.
- [29] Gurley D, Amin J, Ross PC, Weiss DS, White G. Point mutations in the M2 region of the alpha, beta, or gamma subunit of the GABAA channel that abolish block by picrotoxin. *Receptor Channel* 1995;3(1):13–20.
- [30] Ding J, Huang C, Peng Z, Xie Y, Deng S, Nie YZ, et al. Electrophysiological characterization of methyleugenol: a novel agonist of GABAA receptors. *ACS Chem Neurosci* 2014;5(9):803–11.
- [31] Melo MS, Sena LC, Barreto FJN, Bonjardim LR, Almeida JRGS, Lima JT, et al. Antinociceptive effect of citronellal in mice. *Pharm Biol* 2010;48(4):411–6.
- [32] de Sousa DP, Gonçalves JCR, Quintans-Júnior L, Cruz JS, Araújo DA, de Almeida RN. Study of anticonvulsant effect of citronellol, a monoterpene alcohol, in rodents. *Neurosci Lett* 2006;401(3):231–5.
- [33] Elisabetsky E, Brum LFS, Souza DO. Anticonvulsant properties of linalool in glutamate-related seizure models. *Phytomedicine* 1999;6(2):107–13.
- [34] Narusuye K, Kawai F, Matsuzaki K, Miyachi E. Linalool suppresses voltagegated currents in sensory neurons and cerebellar Purkinje cells. *J Neural Transm (Vienna)* 2005;112(2):193–203.
- [35] Leal-Cardoso JH, da Silva-Alves KS, Ferreira-da-Silva FW, dos Santos-Nascimento T, Joca HC, de Macedo FH, et al. Linalool blocks excitability in peripheral nerves and voltage-dependent Na<sup>+</sup> current in dissociated dorsal root ganglia neurons. *Eur J Pharmacol* 2010;645(1–3):86–93.
- [36] Brum LF, Elisabetsky E, Souza D. Effects of linalool on [<sup>3</sup>H] MK801 and [<sup>3</sup>H] muscimol binding in mouse cortical membranes. *Phytother Res* 2001;15(5):422–5.
- [37] Re L, Barocci S, Sonnino S, Mencarelli A, Viviani C, Paolucci G, et al. Linalool modifies the nicotinic receptor-ion channel kinetics at the mouse neuromuscular junction. *Pharmacol Res* 2000;42(2):177–82.
- [38] Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M, Rogers SW. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 2009;89(1):73–120.
- [39] Rogawski MA, Löscher W. The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nat Rev Neurosci* 2004;5(7):553–64.
- [40] Cong D, Tang Z, Li L, Huang Y, Wang J, Chen L. Cross-talk between NMDA and GABAA receptors in cultured neurons of the rat inferior colliculus. *Sci China Life Sci* 2011;54(6):560–6.
- [41] Chisari M, Zorumski CF, Mennerick S. Cross talk between synaptic receptors mediates NMDA-induced suppression of inhibition. *J Neurophysiol* 2012;107(9):2532–40.
- [42] Chen QX, Stelzer A, Kay AR, Wong RK. GABA<sub>A</sub> receptor function is regulated by phosphorylation in acutely dissociated guinea-pig hippocampal neurones. *J Physiol* 1990;420(1):207–21.
- [43] Chen QX, Wong RK. Suppression of GABA<sub>A</sub> receptor responses by NMDA application in hippocampal neurones acutely isolated from the adult guinea-pig. *J Physiol* 1995;482(Pt 2):353–62.
- [44] Zhu WJ, Vicini S, Harris BT, Grayson DR. NMDA-mediated modulation of gamma-aminobutyric acid type A receptor function in cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 1995;15(11):7692–701.
- [45] Stelzer A, Slater NT, ten Bruggencate G. Activation of NMDA receptors blocks GABAergic inhibition in an *in vitro* model of epilepsy. *Nature* 1987;326(6114):698–701.
- [46] Zhang J, Berg DK. Reversible inhibition of GABAA receptors by α7-containing nicotinic receptors on the vertebrate postsynaptic neurons. *J Physiol* 2007;579(Pt 3):753–63.