

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxh.002687

香芹酚对 2 型糖尿病小鼠星形胶质细胞损伤的保护作用

鲁翠芳¹, 杨斌², 姚冬梅¹, 李震亮¹, 李红艳¹, 崔志成¹, 薛满忠¹

(1. 唐山中心医院呼吸内科, 唐山 063006; 2. 华北理工大学附属医院神经重症病房, 唐山 063000)

【摘要】目的:探讨香芹酚对自发性 2 型糖尿病 db/db 小鼠星形胶质细胞损伤的保护作用。**方法:**选择 8 周龄雄性 db/db 小鼠 20 只, 随机分为模型组和香芹酚组, 每组 10 只, 随机抽取 10 只 db/m 小鼠为对照组。香芹酚组小鼠给予香芹酚(20 mg/kg)灌胃, 对照组和模型组分别给予等量生理盐水灌胃, 每天灌胃 1 次, 连续给药 6 周。利用免疫组化法标记胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP), 观察不同分组中海马 CA1 区星形胶质细胞形态的病理改变。免疫组化法检测对照组、模型组和香芹酚组海马 CA1 区脂质运载蛋白-2(lipocalin 2, LCN2)、水通道蛋白-4(aquaporin 4, AQP4)表达的阳性细胞数量。采用 TUNEL 法检测海马 CA1 区 LCN2、AQP4 与星形胶质细胞凋亡的关系。应用 RT-PCR 和 Western blot 检测对照组、模型组和香芹酚组海马 CA1 区 LCN2、AQP4、核转录因子-κB(nuclear factor kappa B, NF-κB)、嗜中性白细胞碱性磷酸酶-3(neutrophilic alkaline phosphatase-3, NALP3)的表达。**结果:**模型组空腹血糖(glucose, GLU)、高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)、甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)表达量较对照组明显升高, 而香芹酚组较模型组 GLU、HDL、TG、TC 的表达量明显降低(均 $P < 0.05$)。免疫组化显示, 模型组 GFAP 标记的星形胶质细胞数量增加且体积增大, 分枝增多、变长; 香芹酚组可改善星形胶质细胞的形态, 减少星形胶质细胞的数量(均 $P < 0.01$)。免疫组化表明, 模型组中 LCN2、NF-κB、NALP3 阳性细胞数量增加, 而 AQP4 阳性细胞数量减少; 香芹酚组 AQP4 阳性细胞数量增加, LCN2、NF-κB、NALP3 阳性细胞数量减少(均 $P < 0.01$)。TUNEL 染色显示, 模型组中 LCN2 与凋亡细胞均增加, AQP4 则明显减少; 香芹酚组与模型组相比, 凋亡细胞、LCN2 阳性细胞明显降低, AQP4 阳性细胞数量明显增加(均 $P < 0.01$)。RT-PCR 和 Western blot 结果显示, 与模型组相比, 香芹酚组降低海马 CA1 区中 LCN2、NALP3、NF-κB 表达, 增加 AQP4 的表达(均 $P < 0.01$)。**结论:**香芹酚对自发性 2 型糖尿病小鼠星形胶质细胞损伤具有保护作用, 其机制可能与降低 LCN2、NF-κB、NALP3 和增加 AQP4 表达有关。

【关键词】糖尿病; 香芹酚; 脂质运载蛋白-2; 水通道蛋白-4; 星形胶质细胞

【中图分类号】R741

【文献标志码】A

【收稿日期】2020-06-12

Protective effect of carvacrol on astrocytes damage in type 2 diabetic mice

Lu Cuifang¹, Yang Bin², Yao Dongmei¹, Li Zhenliang¹, Li Hongyan¹, Cui Zhicheng¹, Xue Manzhong¹

(1. Department of Respiratory Medicine, Tangshan Central Hospital; 2. Neurological Intensive Care Unit, North China University of Science and Technology Affiliated Hospital)

【Abstract】**Objective:** To investigate the protective effect of carvacrol on astrocytes injury in spontaneous type 2 diabetic db/db mice. **Methods:** Twenty eight-week-old male db/db mice were randomly divided into model group and carvacrol group, and 10 db/m mice were randomized to the control group. The carvacrol group mice were given 20 mg/kg intragastric administration of carvacrol, and the control group and the model group were respectively given the same amount of intragastric administration of saline, once a day, for 6 weeks. The morphological changes of astrocytes in CA1 area of hippocampus in different groups were observed by labeling glial fibrillary acidic protein(GFAP) through immunohistochemistry. The number of expressed positive cells of lipocalin 2(LCN2) and aquaporin 4(AQP4) in CA1 region of control group, model group, and carvacrol group were determined by immunohistochemistry. TUNEL was used to detect the relationship among LCN2, AQP4 and astrocyte apoptosis in CA1 region. RT-PCR and Western blot

作者介绍: 鲁翠芳, Email: Lcf861007@163.com,

研究方向: 神经细胞损伤机制。

通信作者: 杨斌, Email: 95494157@qq.com。

基金项目: 河北省医学科学研究课题计划资助项目(编号: 20191147、20201463)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20201104.1715.016.html>

(2020-11-09)

were used to detect the expression of LCN2, AQP4, nuclear factor kappa B(NF-κB) and neutrophilic alkaline phosphatase-3(NALP3) in CA1 area of hippocampus in control group, model group and carvacrol group. **Results:** The expression levels of glucose(GLU), high density lipoprotein(HDL), triglyceride(TG) and total cholesterol(TC) in the model group were significantly higher than those in the control group, while the expression

levels of GLU, HDL, TG and TC in the carvacrol group were significantly lower than those in the model group (all $P < 0.05$). Immunohistochemistry showed that the number of GFAP labeled astrocytes in the model group increased and the number of branches increased, while the carvacrol group could improve the morphology of astrocytes and reduce the number (all $P < 0.01$). Immunohistochemistry also showed that the number of positive cells of LCN2, NF- κ B and NALP3 in the model group increased, while the number of positive cells of AQP4 decreased. However, in the carvacrol group, the number of positive cells of AQP4 increased, and the number of positive cells of LCN2, NF- κ B and NALP3 decreased (all $P < 0.01$). TUNEL staining showed that LCN2 and apoptotic cells increased, while AQP4 decreased significantly in the model group, while the number of apoptotic cells and LCN2 positive cells and AQP4 positive cells increased in the carvacrol group compared with the model group (all $P < 0.01$). The results of RT-PCR and Western blot showed that the expression levels of LCN2, NALP3 and NF- κ B in hippocampus of carvacrol group were decreased, and the expression level of AQP4 was increased compared with those of model group (all $P < 0.01$). **Conclusion:** Carvacrol has protective effect on astrocytes injury in spontaneous type 2 diabetic mice, and its mechanism may be related to the decrease of LCN2, NF- κ B and NALP3, and the increase of AQP4 expression level.

[Key words] diabetes; carvacrol; lipocalin 2; aquaporin 4; astrocyte

糖尿病性脑病是糖尿病并发症中一种严重的神经系统疾病。脂质运载蛋白-2(lipocalin 2, LCN2)是一种可由免疫细胞分泌的糖蛋白, LCN2 参与神经炎症以及促炎因子激活和转录过程, 可通过星形胶质细胞激活促进神经炎症^[1-3]。研究发现, 水通道蛋白-4(aquaporin 4, AQP4)是中枢神经系统中维持水分布和水平衡的重要因子, 主要存在于星形胶质细胞^[4]。AQP4 缺乏增加糖尿病小鼠模型中脑组织核转录因子- κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)的产生, 促进星形胶质细胞的损伤^[5-6]。由此可见, LCN2 与 AQP4 表达在神经炎症发展过程中密切相关, 但在自发性 2 型糖尿病星形胶质细胞损伤中的研究并不清楚。有研究显示, 香芹酚具有降低血糖、缓解糖尿病并发症进展的作用^[7]。本实验利用自发性 2 型糖尿病 db/db 小鼠, 选用香芹酚作为干预因素, 阐述 LCN2 与 AQP4 在海马 CA1 区表达的关系, 表明香芹酚对细胞损伤的保护作用。

1 材料方法

1.1 实验材料

自发性 2 型糖尿病 db/db 小鼠和正常 db/m 小鼠均购自常州卡文斯实验动物有限公司, 动物许可证号为 SCKK(苏)2011-2016。辣根酶标记山羊抗兔 IgG, PBS、DAB 显色液, 均购自北京中山金桥生物公司; 蛋白提取试剂盒、SDS-PAGE 蛋白凝胶电泳配胶试剂盒、蛋白上样缓冲液均购自北京雷根生物公司; GFAP、LCN2、AQP4 抗体购自 Abcam 公司; NALP3、NF- κ B 抗体购自 Gentex 公司; β -actin 抗体购自北京博奥森公司; LCN2、AQP4、NALP3、NF- κ B、GAPDH 引物序列由上海

生工合成; 实时荧光定量 PCR 检测试剂盒购自 Takara 公司; RNA 反转录试剂盒购自 Thermo Fisher Scientific 公司; 小鼠血清高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)、甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、葡萄糖(glucose, GLU)测试盒均购自南京建成生物公司; 香芹酚购自 Sigma-Aldrich 公司; 一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(红色荧光)购自碧云天生物技术公司; 血糖仪及试纸购自罗氏公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物培养 2 型糖尿病 db/db 小鼠和正常 db/m 小鼠体质量(35 ± 5) g, 8 周龄, 雄性, SPF 级。适应性饲养 1 周后, 剪尾取血法检测血糖, 以血糖(random blood glucose, RBG) ≥ 16.7 mmol/L 为条件筛选糖尿病小鼠 20 只, 随机分为模型组和香芹酚组, 每组 10 只。另设同周龄 db/m 小鼠 10 只为对照组。模型组和对照组灌胃生理盐水, 香芹酚组灌胃香芹酚 20 mg/kg^[8], 各组均每天灌胃 1 次, 连续给药 6 周。

1.2.2 动物取材 乙醚麻醉各组小鼠, 眼球取血, 离心取血清, -80°C 冻存, 脱颈处死小鼠, 摘取小鼠脑组织, 分别进行液氮冻存和 10% 中性福尔马林固定, 为后续实验做准备。

1.2.3 实验指标检测 按照 HDL、LDL、TG、TC、GLU 测试盒操作说明书进行操作, 溶化血清, 将各组血清添加至样本孔, 与试剂混匀, 37°C 孵育 5 min, 酶标仪检测波长 546 nm 光密度(optical density, OD)值, 再根据校准品浓度利用公式计算, 结果重复 3 次。

1.2.4 免疫组织化学法 石蜡包埋脑组织切片, 二甲苯脱蜡, 梯度乙醇至水, EDTA 缓冲液(pH 8.0)高压修复 3 min, 内源性过氧化物酶阻断剂 37°C 孵育 15 min, 孵育一抗 AQP4(1:100)、LCN2(1:100)、NALP3(1:100)、NF- κ B(1:100), 4°C 孵育过夜, 复温, PBS 洗 3 遍, 滴加二抗, 37°C 孵育 1 h, DAB 显色, 苏木素染色, 返蓝, 脱水, 封片。400 倍光镜下观察蛋白表达情况。应用 Image-Pro Plus 6.0 图像处理系统测量各组蛋白的平均光密度。

1.2.5 TUNEL法 切片脱蜡至水,滴加不含DNase蛋白酶K,37℃孵育25 min,PBS洗3次,滴加TUNEL工作液,37℃避光孵育60 min,PBS洗3次,抗荧光淬灭剂封片。荧光显微镜观察并采集图片,利用Image-Pro Plus 6.0图像分析软件进行数据分析。

1.2.6 Western blot 取新鲜脑组织海马区,液氮研磨,取上清。应用全蛋白提取试剂盒,各组添加裂解液,4℃放置5 min,剧烈震荡30 s,共计5个循环,离心去除细胞碎片及杂质,分装蛋白,应用BCA蛋白定量检测试剂盒定量,100℃煮蛋白10 min,上样进行SDS-PAGE电泳、转膜、封闭,孵育一抗LCN2(1:1 000)、AQP4(1:1 000)、NALP3(1:1 000)、NF- κ B(1:1 000)、 β -actin(1:1 000),4℃过夜;二抗孵育1 h,ECL暗室曝光,用Image J软件进行灰度值分析,结果以目的蛋白与 β -actin灰度值的比值表示其相对水平,结果重复3次。

1.2.7 RT-PCR方法 液氮研磨各组海马区,加入1 mL Trizol使其充分裂解,再加入200 μ L氯仿,剧烈震荡混匀30 s,室温静置30 min,4℃12 000 r/min离心15 min。取上层水相至无酶EP管,加入500 μ L异丙醇混匀,室温静置10 min。4℃12 000 r/min离心10 min,弃上清,加入75%乙醇洗涤,4℃7 500 r/min离心5 min,去上清,加入20 μ L RNA水重悬沉淀,测定浓度。定量制定RNA体系进行反转录,实时荧光定量PCR进行测定,比较 C_t 值($2^{-\Delta\Delta C_t}$)进行数据分析。Primer 5.0设计引物序列见表1。

表1 引物序列

名称	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
LCN2	CCTAAGCCCTTGTGGTGTGT	CAGACTGGAGAGGCCAAGAC
AQP4	AGAACCAAGGCGTAAACC	TCCCTGAAATGACTGAGAAA
NF- κ B	CCCCGCAGACTATCAATCCC	ACTTACTGCCCCCTTCAGA
NALP3	CCCCGTGAGTCCCATT	GACGCCAGTCCAACAT
GAPDH	GTGAAGGTCGGTGTGAACG	TCGTTGATGGCAACAACTC

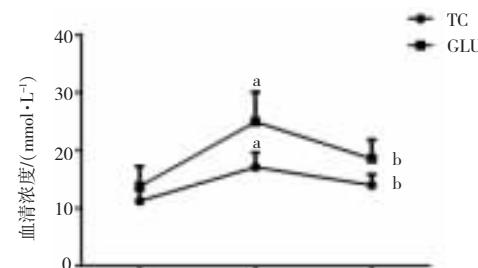
1.3 统计学处理

所有数据均采用SPSS 17.0软件进行统计学分析。计量资料均采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两样本均数比较采用t检验,多个样本均数比较用方差分析,率比较采用卡方检验,相关性采用Pearson相关性分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

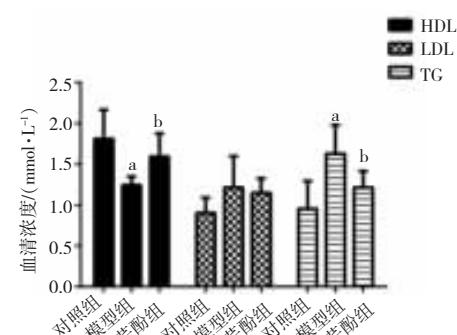
2 结果

2.1 各组小鼠GLU、HDL、LDL、TG、TC的变化情况

收集不同分组小鼠血清,检测GLU、HDL、LDL、TG、TC的表达量,结果显示不同处理组间GLU、HDL、TG、TC表达量差异均有统计学意义($F=11.487$ 、 6.824 、 7.476 、 11.889 ,均 $P<0.05$)。模型组GLU、HDL、TG、TC的表达量较对照组明显升高,香芹酚组较模型组GLU、HDL、TG、TC的表达量明显降低(均 $P<0.05$)。不同处理组间LDL表达量差异无统计学意义($P>0.05$),提示香芹酚对低密度脂蛋白的作用并不明显(图1)。



A. 小鼠血清中 GLU、TC 表达水平



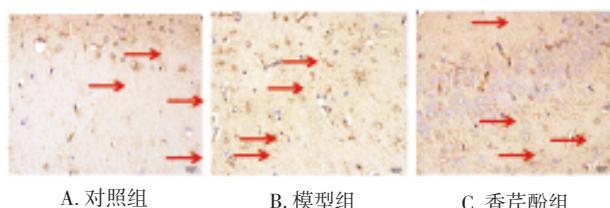
B. 小鼠血清中 HDL、LDL、TG 表达水平

注:a:与对照组相比较, $P<0.05$;b:与模型组相比较, $P<0.05$

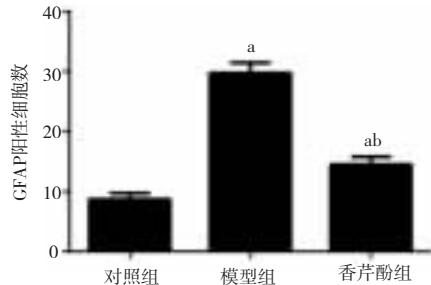
图1 各组小鼠GLU、HDL、LDL、TG、TC表达水平($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.2 各组小鼠星形胶质细胞的病理学改变

利用免疫组化法观察对照组、模型组和香芹酚组中GFAP标记的星形胶质细胞,结果显示不同处理组间GFAP标记的星形胶质细胞数量差异具有统计学意义($F=256.955$, $P<0.01$)。模型组较对照组中星形胶质细胞体积增大、分枝增多、数量增多,而香芹酚组较模型组星形胶质细胞体积、分枝长度和细胞数量明显减少(均 $P<0.05$)(图2)。



A. 对照组 B. 模型组 C. 香芹酚组

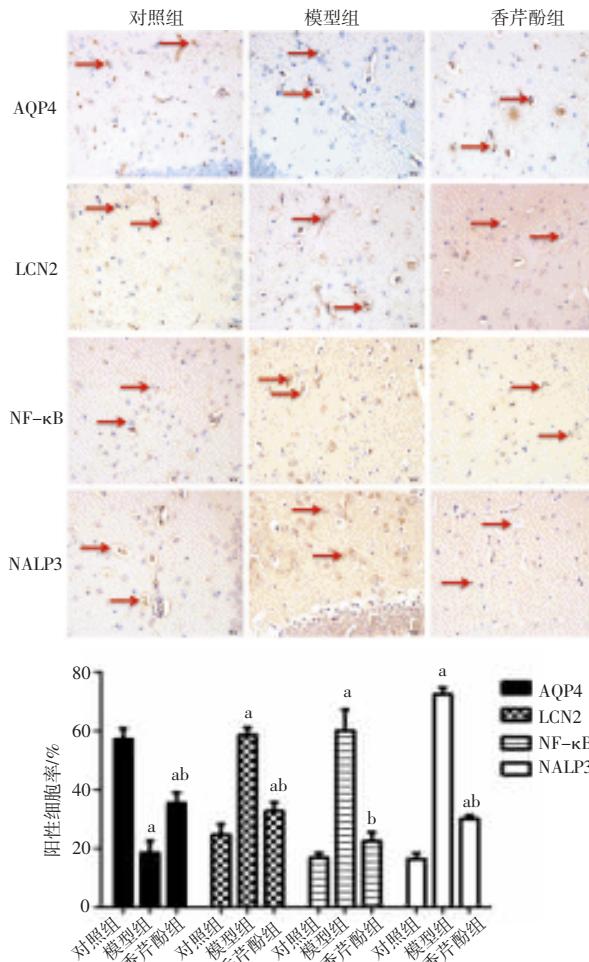


注:a:与对照组相比较, $P<0.05$;b:与模型组相比较, $P<0.05$

图2 各组小鼠GFAP阳性细胞的变化($\bar{x} \pm s, n=4, 400 \times$)

2.3 免疫组化法检测 AQP4、LCN2、NF-κB、NALP3 在各组小鼠脑组织中的表达水平

免疫组化结果显示 AQP4 和 LCN2 主要在细胞胞浆中表达。不同处理组间 AQP4、LCN2、NF-κB、NALP3 阳性细胞率差异均有统计学意义 ($F=77.153, 98.323, 77.531, 769.244$; 均 $P<0.01$)。模型组与对照组相比, LCN2、NF-κB、NALP3 阳性细胞数量增加, AQP4 阳性细胞数量减少。香芹酚组与模型组相比, AQP4 阳性细胞数量明显增加, 并且 LCN2、NF-κB、NALP3 阳性细胞数量明显减少(均 $P<0.05$)(图 3)。

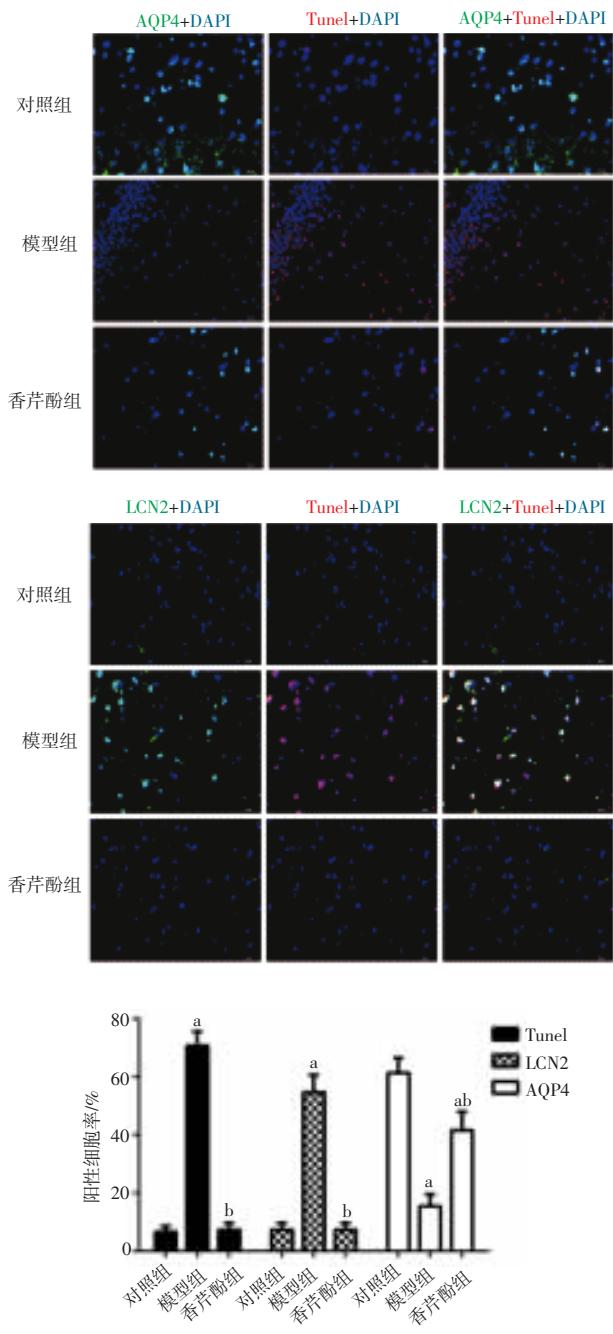


注:a,与对照组相比较, $P<0.05$;b:与模型组相比较, $P<0.05$

图3 免疫组化检测 AQP4、LCN2、NALP3、NF-κB 阳性表达的细胞数量($\bar{x} \pm s, n=3, 400 \times$)

2.4 LCN2 和 AQP4 表达与凋亡细胞的关系

检测不同分组海马 CA1 区凋亡细胞与 LCN2 和 AQP4 表达的关系, 结果显示红色标记的凋亡细胞在模型组中明显增加, 香芹酚能够明显降低凋亡细胞数量。结果还显示, 不同处理组间凋亡细胞中 Tunel、LCN2、AQP4 阳性细胞率差异均有统计学意义 ($F=355.375, 142.957, 56.525$, 均 $P<0.01$), 模型组中凋亡细胞 LCN2 的表达明显升高, 而 AQP4 的表达明显减少; 香芹酚能够逆转 LCN2 和 AQP4 两者的表达水平(均 $P<0.05$)(图 4)。

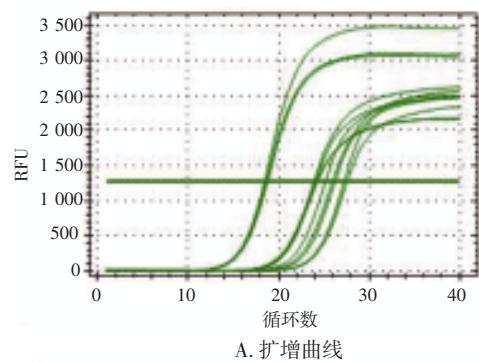


注:a,与对照组相比较, $P<0.05$;b:与模型组相比较, $P<0.05$

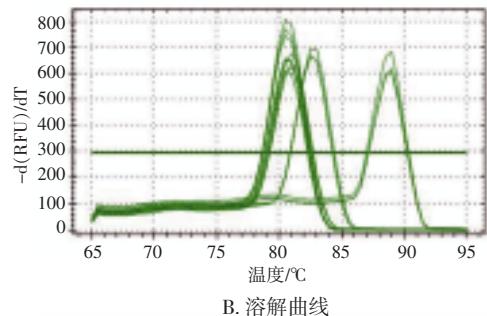
图4 不同分组 LCN2、AQP4 阳性细胞与海马 CA1 区细胞凋亡的关系($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.5 RT-PCR 和 Western blot 检测 AQP4、LCN2、NALP3、NF-κB 在各组海马区中的表达水平

与正常对照组比较, 模型组小鼠海马 CA1 区 LCN2、NALP3、NF-κB mRNA 和蛋白表达水平明显升高(均 $P<0.01$), AQP4 的表达水平明显降低($P<0.01$)。香芹酚明显降低小鼠海马区 LCN2、NALP3、NF-κB mRNA 和蛋白表达水平, 增加 AQP4 的表达水平(图 5、图 6)。应用 Pearson 相关性分析, LCN2 与 AQP4 在模型组中的蛋白表达呈负相关($r=-0.989, P<0.01$), 见表 2。



A. 扩增曲线



B. 溶解曲线

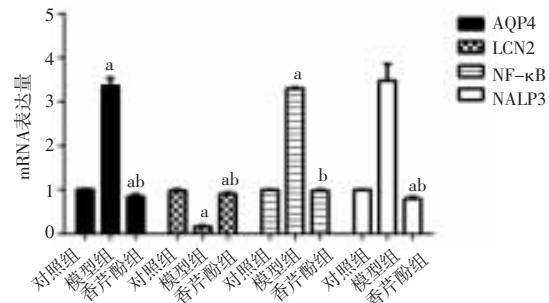
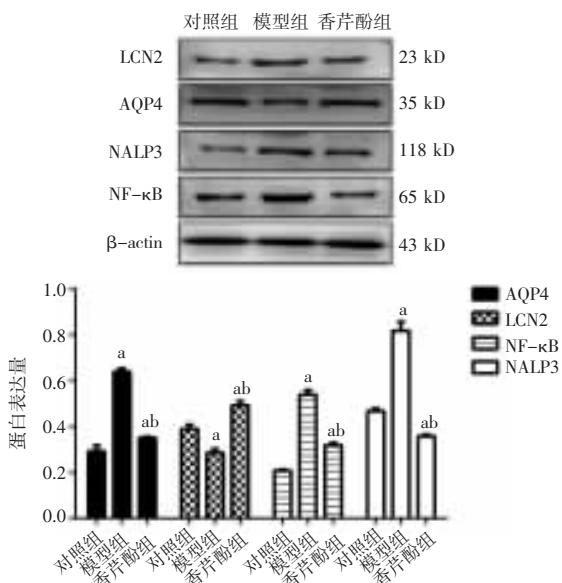
注:a, 与对照组相比较, $P < 0.05$; b: 与模型组相比较, $P < 0.05$ 图 5 RT-PCR 检测各组海马区 LCN2、AQP4、NALP3、NF-κB mRNA 表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=3$)注:a, 与对照组相比较, $P < 0.05$; b: 与模型组相比较, $P < 0.05$ 图 6 Western blot 法各组海马区 LCN2、AQP4、NALP3、NF-κB 蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

表 2 LCN2 和 AQP4 在模型组中蛋白表达的相关性

		因子	表达量
因子	Pearson 相关性	1.000	-0.989 ^a
	明显性(双侧)		0.000
	N	6	6
表达量	Pearson 相关性	-0.989 ^a	1.000
	明显性(双侧)		0.000
	N	6	6

注:a, $P < 0.01$

3 讨 论

糖尿病脑神经细胞损伤是糖尿病神经系统中严重的病理性改变。星形胶质细胞作为脑组织海马区中重要的功能细胞,在糖尿病脑病中发挥重要作用^[9-10]。诸多研究表明,香芹酚对糖尿病的各组织器官均能起到保护作用^[11-12]。它可以明显降低 T1DM 和 T2DM 小鼠的血糖水平,并抑制心脏重构^[8]。香芹酚能减少脑缺血小鼠海马神经元细胞的死亡,抑制铁蛋白沉着^[13]。Ezhumalai M 等^[14]研究发现,香芹酚能够降低 C57BL/6J 糖尿病小鼠血浆和组织 TC、TG,改善非酒精性脂肪肝。本研究应用香芹酚干预自发性 2 型糖尿病 db/db 小鼠,结果显示香芹酚能够明显降低 2 型糖尿病 db/db 小鼠空腹血糖和相关血脂指标。此外,香芹酚能够缓解氧化应激、炎症、凋亡以及糖尿病引起的认知障碍的发展^[15]。本研究采用免疫组化法标记 GFAP 观察不同分组中海马 CA1 区星形胶质细胞形态变化,结果显示模型组中 GFAP 标记的星形胶质细胞体积增大,分枝增多、变长,数量增多,而香芹酚能够明显减少海马 CA1 区 GFAP 标记的阳性细胞数量,提示香芹酚可能具有保护糖尿病小鼠星形胶质细胞损伤的作用。

在 db/db 糖尿病小鼠脑神经细胞病变时,AQP4、LCN2 分别通过不同的表达方式参与神经炎症的进展^[1,5],LCN2 可以作为中枢神经系统多种细胞类型的趋化因子诱导剂参与神经炎症因子的激活和促炎因子的转录过程,通过 JAK2/STAT3 和 IKK/NF-κB 途径上调 CXCL10 诱导胶质细胞发生迁移^[16-17]。对于损伤信号 NLRP3 与 NF-κB 信号来说,AQP4 同样也参与信号通路并发挥作用^[18]。AQP4 蛋白主要存在于星形胶质细胞、心室管膜细胞的星形胶质细胞体内^[19]。AQP4 表达的降低与星形胶质细胞炎症因子的升高密切相关^[20-21],但 AQP4、LCN2 在海马区星形胶质细胞损伤的具体作用机制尚不清楚。本实验结果显示,模型组海马区 LCN2、NALP、NF-κB

mRNA 和蛋白表达明显升高,但 AQP4 表达明显降低,且 LCN2 和 AQP4 表达呈负相关。在应用香芹酚后能明显降低 LCN2、NLRP3、NF-κB mRNA 与蛋白表达水平和增加 AQP4 表达,提示 LCN2 高表达、AQP4 低表达与 CA1 区神经细胞的凋亡密切相关,而香芹酚可能通过 NLRP3/NF-κB 信号通路明显降低 LCN2 和增加 AQP4 的表达水平进而改善神经细胞的凋亡,香芹酚对自发性 2 型糖尿病小鼠脑损伤具有神经保护作用。

本实验利用中药数据库(<http://119.3.41.228:8000/temid/>)检索到治疗糖尿病常用药物佩兰中的主要成分——香芹酚具有降血糖、降血脂和保护神经细胞的作用^[22-23]。本实验选择更为贴近临床 2 型糖尿病患者的自发性 2 型糖尿病 db/db 小鼠模型,观察香芹酚对海马 CA1 区星形胶质细胞的影响。本实验初步表明,香芹酚对神经细胞具有保护作用,可调控 LCN2 和 AQP4 的表达,进而改善神经细胞的凋亡。但本实验并没有对 NLRP3 和 NF-κB 进行干预,未进一步探讨香芹酚的详细作用机制,未来将进一步阐述。

综上所述,香芹酚对自发性 2 型糖尿病 db/db 小鼠星形胶质细胞损伤具有保护作用,其机制可能通过 NLRP3/NF-κB 信号通路降低 LCN2 和增加 AQP4 的表达水平进而起到保护糖尿病小鼠星形胶质细胞损伤的作用,为糖尿病脑病的防治提供新的参考。

参 考 文 献

- [1] Bhushal A, Rahman MH, Lee IK, et al. Role of hippocampal lipocalin-2 in experimental diabetic encephalopathy[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2019, 10:25.
- [2] 蒋建军,杨 进,金永梅,等.丙咪嗪经酸性鞘磷脂酶/神经酰胺通路抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NLRP3 炎症小体的激活[J].安徽医科大学学报,2019,54(7):1042-1046.
- [3] Dekens DW, de Deyn PP, Sap F, et al. Iron chelators inhibit amyloid-β-induced production of lipocalin 2 in cultured astrocytes[J]. *Neurochem Int*, 2019, 132: 104607.
- [4] Wu J, Ding DH, Wang XY, et al. Regulation of aquaporin 4 expression by lipoxin A4 in astrocytes stimulated by lipopolysaccharide[J]. *Cell Immunol*, 2019, 344: 103959.
- [5] Ward R, Li W, Abdul Y, et al. NLRP3 inflammasome inhibition with MCC950 improves diabetes-mediated cognitive impairment and vasoneuronal remodeling after ischemia[J]. *Pharmacol Res*, 2019, 142: 237-250.
- [6] 何济民,郑晓梅,张 烨,等. TNF-α 与 Ca²⁺在大鼠创伤性脑水肿中的相关性研究[J].安徽医科大学学报,2018,53(6):875-880.
- [7] Ezhumalai M, Radhiga T, Pugalendi KV. Antihyperglycemic effect of carvacrol in combination with rosiglitazone in high-fat diet-induced type 2 diabetic C57BL/6J mice[J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 385(1/2): 23-31.
- [8] Hou N, Mai YP, Qiu XX, et al. Carvacrol attenuates diabetic cardiomyopathy by modulating the PI3K/AKT/GLUT4 pathway in diabetic mice[J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 998.
- [9] Ahn KC, Learman CR, Dunbar GL, et al. Characterization of impaired cerebrovascular structure in APP/PS1 mouse brains[J]. *Neuroscience*, 2018, 385: 246-254.
- [10] Harrison L, Pfuhlmann K, Schriever SC, et al. Profound weight loss induces reactive astrogliosis in the arcuate nucleus of obese mice[J]. *Mol Metab*, 2019, 24: 149-155.
- [11] Bayramoglu G, Senturk H, Bayramoglu A, et al. Carvacrol partially reverses symptoms of diabetes in STZ-induced diabetic rats[J]. *Cytotechnology*, 2014, 66(2): 251-257.
- [12] Zerrouki M, Benkaci-Ali F. DFT study of the mechanisms of nonenzymatic DNA repair by phytophenolic antioxidants[J]. *J Mol Model*, 2018, 24(4): 78.
- [13] Guan XY, Li XL, Yang XJ, et al. The neuroprotective effects of carvacrol on ischemia/reperfusion-induced hippocampal neuronal impairment by ferroptosis mitigation[J]. *Life Sci*, 2019, 235: 116795.
- [14] Ezhumalai M, Ashokkumar N, Pugalendi KV. RETRACTED: combination of carvacrol and rosiglitazone ameliorates high fat diet induced changes in lipids and inflammatory markers in C57BL/6J mice[J]. *Biochimie*, 2015, 110: 129-136.
- [15] Deng WJ, Lu H, Teng JF. Carvacrol attenuates diabetes-associated cognitive deficits in rats[J]. *J Mol Neurosci*, 2013, 51(3): 813-819.
- [16] Zhao YX, Zhang WJ, Jia Q, et al. High dose vitamin E attenuates diabetic nephropathy via alleviation of autophagic stress[J]. *Front Physiol*, 2018, 9: 1939.
- [17] Moschen AR, Adolph TE, Gerner RR, et al. Lipocalin-2: a master mediator of intestinal and metabolic inflammation[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2017, 28(5): 388-397.
- [18] Long HY, Wu SL, Zhu WN, et al. Antihyperuricemic effect of liquiritigenin in potassium oxonate-induced hyperuricemic rats[J]. *Bio-med Pharmacother*, 2016, 84: 1930-1936.
- [19] Arighi A, Di Cristofori A, Fenoglio C, et al. Cerebrospinal fluid level of aquaporin 4: a new window on glymphatic system involvement in neurodegenerative disease?[J]. *J Alzheimers Dis*, 2019, 69(3): 663-669.
- [20] Fukuda AM, Badaut J. Aquaporin 4: a player in cerebral edema and neuroinflammation[J]. *J Neuroinflammation*, 2012, 9: 279.
- [21] Mader S, Brimberg L. Aquaporin-4 water channel in the brain and its implication for health and disease[J]. *Cells*, 2019, 8(2): 90.
- [22] Jiang HX, Liu Q, Gao K. Benzofuran derivatives from *Eupatorium fortunei*[J]. *Nat Prod Res*, 2008, 22(11): 937-941.
- [23] Emery EC, Diakogiannaki E, Gentry C, et al. Stimulation of GLP-1 secretion downstream of the ligand-gated ion channel TRPA1[J]. *Diabetes*, 2015, 64(4): 1202-1210.

(责任编辑:唐秋姗)