

. 实验研究 .

香芹酚通过抑制脑水肿与氧化应激反应保护大鼠  
颅脑损伤

李国亮 邸 方 杨亚东

【摘要】目的 探讨香芹酚对大鼠颅脑损伤(TBI)的保护作用及其机制。方法 SD 大鼠 50 只,随机分为 5 组:假手术组、模型组、低剂量香芹酚(10 mg/kg)组、中剂量香芹酚(20 mg/kg)组、高剂量香芹酚(40 mg/kg)组,每组 10 只。Feeney 氏自由落体法制备 TBI 模型,造模后 1、3、7 d 采用改良神经功能损害程度评分(mNSS)评估神经功能,干湿法测定脑组织含水量;ELISA 法检测氧化应激因子丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)、过氧化氢酶(CAT)以及化学定量法检测一氧化氮(NO)含量及一氧化氮合酶(NOS)活性。结果 香芹酚能显著改善大鼠 TBI 后神经功能,显著减轻 TBI 后脑水肿,显著降低损伤脑组织 MDA、NO 和 NOS 含量,显著增加损伤脑组织 SOD、CAT 和 GSH 含量。结论 香芹酚可通过减轻大鼠 TBI 后脑水肿、抑制氧化应激从而发挥神经保护作用。

【关键词】 颅脑损伤;香芹酚;氧化应激;神经保护;大鼠

【文章编号】 1009-153X(2016)05-0283-04 【文献标志码】 A 【中国图书资料分类号】 R 651.1+5

Carvacrol protects against traumatic brain injury in rats through suppressing the brain edma and oxidative stress

LI Guo-liang<sup>1</sup>, DI Fang<sup>1</sup>, YANG Ya-dong<sup>2</sup>. 1. Department of Neurosurgery, People's Hospital of Dongxihu District of Wuhan City, wuhan 430040, China; 2. Intensive Care Unit, Central Hospital of Huanggang City, Huanggang 438000, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of carvacrol on trauma-injured brain and its mechanism in rats. Methods Animal models of traumatic brain injury was established by Freeney free-falling method in 40 SD rats, which were randomly divided into 4 groups of 10 animals each, including control group, experimental group A, in which each rat received the intraperitoneal injection of 10 mg/kg of carvacrol every day for 7 days, experimental group B, in which each rat did injection of 20 mg/kg, the experimental group C, in which each rat did injection of 40 mg/kg. The other 10 rats underwent sham operation in sham group. The neurological functions were evaluated by modified neurological severity score (mNSS) in all the groups 1, 3 and 7 days after the injury. The water content in the injured cerebral tissues was determined 7 days after the injury. The contents of malondialdehyde (MDA), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD),and glutathione (GSH) in the injured brain tissues were detected by ELISA and the content of NO and the activity of NO synthase (NOS) in the injured cerebral tissues were measured 7 days after the injury. Results The mNSS and water contents in the injured cerebral tissues significantly decreased in all the experimental groups compared to those in the control group ( $P<0.05$ ). MDA、CAT、SOD and GSH activities in the injured cerebral tissues significantly decreased in carvacrol groups compared with those in the control group 7 days after the injury ( $P<0.05$ ). The content of NO and the activity of NOS in the injured cerebral tissues were significantly lower in all the experimental groups than those in the control group ( $P<0.05$ ). Conclusions It is suggested that carvacrol protects trauma-injured brain probably through suppressing the brain edema and oxidative stress.

【Key words】 Carvacrol; Traumatic brain injury; Oxidative stress; Neuroprotection; Rats

颅脑损伤(trumatic brain injury, TBI)已成为青年人致死、致残的重要因素。TBI 后继发性损伤,如脑水肿、氧化应激反应和炎症反应等是 TBI 死亡的主要原因<sup>[2-6]</sup>。香芹酚是一种单帖酚,广泛存在于各种天然植物中,具有广谱抗菌、抗氧化、抗炎症反应

以及抗细胞凋亡等作用<sup>[7-10]</sup>。本研究通过建立大鼠 TBI 模型,探讨葛香芹酚对大鼠 TBI 的保护作用及其机制。

1 材料和方法

1.1 动物和分组 Sprague-Dawley 雄性大鼠 50 只(华中科技大学同济医学院实验中心提供,250~300 g),随机分为 5 组;假手术组,模型组,低、中、高剂量香芹酚组,每组 10 只。低、中、高剂量香芹酚组每天腹腔注射香芹酚注射液,剂量分别为 10、20、40 mg/kg;

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2016.05.009  
作者单位: 430040,武汉市东西湖区人民医院神经外科(李国亮、邸方);438000 湖北,黄冈市中心医院重症医学科(杨亚东)  
通讯作者: 杨亚东, E-mail: lglwaike@126.com

假手术组和模型组腹腔注射同体积生理盐水。

1.2 TBI模型的制作 1%戊巴比妥钠(0.5g/kg)腹腔注射麻醉大鼠后固定于Freeny's自由落体架中,中线切开头皮,剥离骨膜并暴露颅骨,紧靠冠状缝后利用微型电钻开直径约为5 mm的圆形创口,将50 g打击器25 cm高度自由落下撞击骨窗。TBI模型的制作完成后骨蜡封闭骨窗,大鼠头皮清创缝合。术中无菌操作,术后单笼饲养。假手术组只做圆形创口。神经功能缺损评分>2分,表明造模成功。

1.3 神经功能评估 根据文献[8]方法,采用改良神经功能损害程度评分(modified neurological severity score,mNSS)评价大鼠伤后1、3、7 d的神经功能缺损状况。mNSS评分包括:肢体运动测试(提尾提起大鼠和平放各3分),平衡木测试6分,感觉测试(浅感觉和深感觉各1分),反射反应以及异常活动4分;最高分数18分,最低分数0分。分数越高,表明神经功能缺损越严重。

1.4 损伤脑组织含水量的测定 造模后7 d,分离相应脑组织约120 mg,用滤纸吸尽表面血渍后,随后将取出的脑组织放入80℃烘箱中放置72 h后再次称重。含水量可反映损伤脑组织水肿情况。损伤脑组织含水量=[(湿重-干重)/湿重]×100%。

1.5 损伤脑组织氧化应激因子含量及活性的测定 造模后7 d,将各组脑组织取出,标准稀释液进行稀释,按照ELISA试剂盒(南京建成公司)说明书进行操作,酶标仪进行检测,计算丙二醛(malondialdehyde,MDA)含量及过氧化氢酶(catalase,CAT)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)、还原型谷胱甘肽(glutathione,GSH)浓度。

1.6 一氧化氮(nitric oxide,NO)含量及一氧化氮合酶(nitric oxide synthase,NOS)活力测定 造模后7 d,将各组脑组织取出称重,加冰冷生理盐水研磨成10%组织匀浆,在2 000转/min,4℃下离心20 min,取上清液于-20℃冰箱中冷藏待测。测定按试剂盒内的说明操作,并按试剂盒内的说明计算一氧化氮含量和一氧化氮合酶活性。

1.7 统计学分析 用SPSS 17.0软件分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析或t检验进行分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 香芹酚对大鼠TBI神经功能的影响 TBI后mNSS明显升高( $P<0.05$ ),而香芹酚治疗后,mNSS明显下降( $P<0.05$ ),提示香芹酚能改善颅脑损伤的神经功

能。见表1。

2.2 香芹酚对大鼠TBI后脑组织含水量的影响 TBI后脑组织含水量[(82.5±6.4)%]明显高于假手术组[(69.8±5.9)%; $P<0.05$ ]。低、中、高剂量香芹酚组损伤脑组织含水量分别为(77.5±6.9)%、(74.2±5.8)%、(72.7±6.6)%,与模型组相比,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ )。见图1。

2.3 香芹酚对大鼠损伤脑组织氧化应激反应的影响 大鼠TBI后MDA含量明显升高( $P<0.05$ ),而CAT、SOD、GSH含量明显降低( $P<0.05$ );香芹酚治疗后,各氧化应激因子得到明显逆转( $P<0.05$ )。见图2。

2.4 香芹酚对大鼠损伤脑组织NO含量及NOS活性的影响 大鼠TBI后NO含量及NOS活性明显升高( $P<0.05$ );香芹酚治疗后,损伤脑组织NO含量及NOS活性明显下降( $P<0.05$ )。见图3。

3 讨论

TBI分为原发性脑损伤和继发性脑损伤两种不同病理改变,继发性脑损伤是指在原发性脑损伤的基础上,发生一系列病理生理改变,如脑组织各种物质代谢异常或细胞凋亡等。研究表明,脑水肿、氧化应激反应、炎症反应及细胞凋亡是引起TBI后继发

表1 香芹酚对颅脑损伤大鼠神经功能的影响(分, $\bar{x}\pm s$ )

组别	造模后mNSS		
	1 d	3 d	7 d
假手术组	0	0	0
模型组	13.4±0.8*	10.8±0.9*	8.5±0.7*
低剂量香芹酚组	10.9±0.8#	8.7±0.9#	6.9±0.7#
中剂量香芹酚组	9.1±0.7#	8.1±0.6#	6.4±0.5#
高剂量香芹酚组	8.9±0.7#	6.2±0.5#	5.7±0.4#

注:与假手术组相应值比,\* $P<0.05$ ;与模型组相应值比,  
# $P<0.05$ ;mNSS:改良神经功能损害程度评分

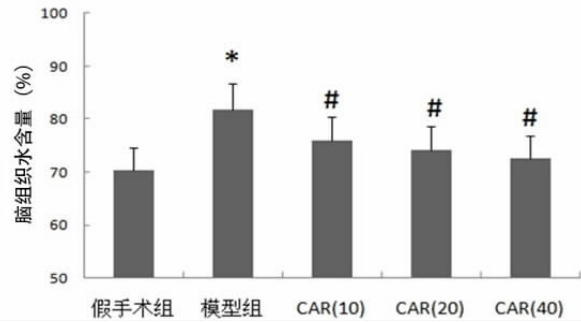


图1 香芹酚对大鼠损伤脑组织含水量的影响

注:与假手术组相应值比,\* $P<0.05$ ;与模型组相应值比,# $P<0.05$ ;  
CAR:香芹酚

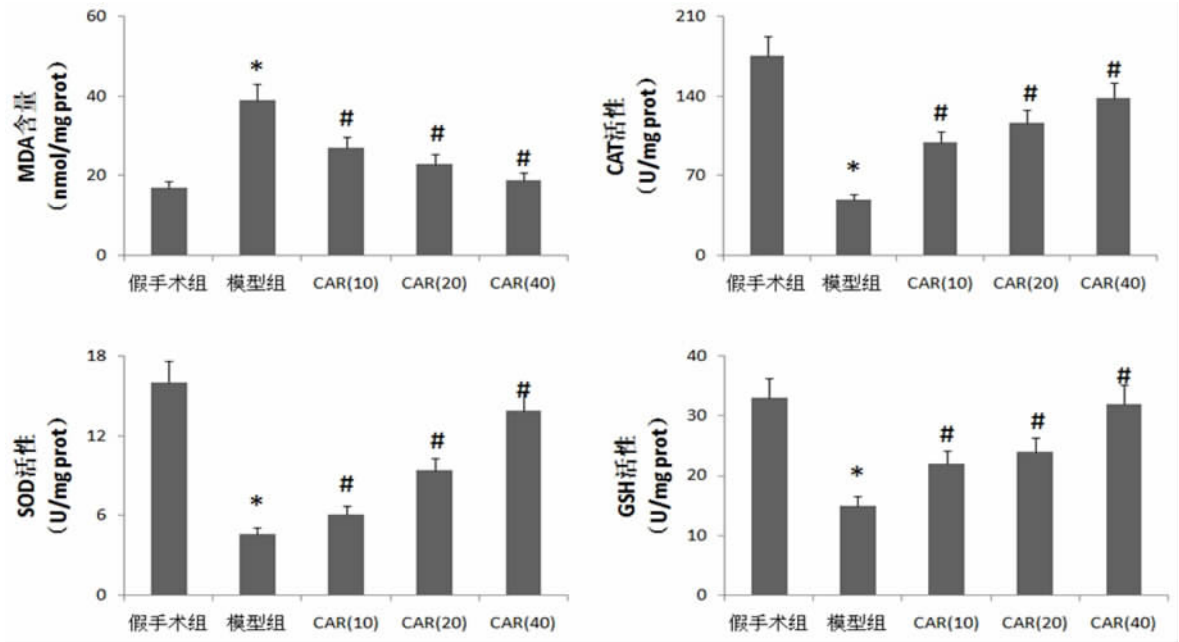


图2 香芹酚对大鼠损伤脑组织氧化应激反应的影响

注:与假手术组相应值比,\* $P<0.05$ ;与模型组相应值比,# $P<0.05$ ;CAR:香芹酚;MDA:丙二醛;CAT:过氧化氢酶;SOD:超氧化物歧化酶;GSH:还原型谷胱甘肽

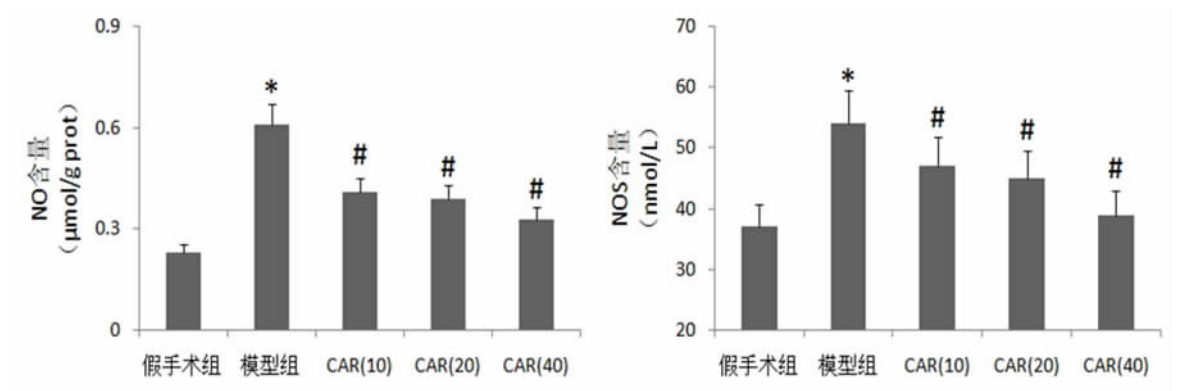


图3 香芹酚对大鼠损伤脑组织NO含量及NOS活性的影响

注:与假手术组相应值比,\* $P<0.05$ ;与模型组相应值比,# $P<0.05$ ;CAR:香芹酚;NO:一氧化氮;NOS:一氧化氮合酶

性脑损伤的主要原因<sup>[12]</sup>。香芹酚,化学名为4-异丙基-2-甲基苯酚,是广泛存在于各种天然植物中的一种单帖酚<sup>[18]</sup>。既往的研究表明,香芹酚具有广谱抗菌及抗氧化等作用<sup>[13]</sup>。并且,香芹酚对人体无毒,不会引起各种过敏反应,因而受到越来越多的研究者对其展开深入研究。

脑水肿是TBI继发性脑损伤的重要机制之一<sup>[14]</sup>,其原因为原发性脑损伤及损伤后内源性脑损伤因子的继发性损伤,引起挫伤区及周围组织含水量增加所致。本研究发现,通过Feeney氏自由落体法可引起大鼠明显脑组织水肿,而香芹酚治疗后,脑水肿明显减轻,提示香芹酚具有抑制损伤脑组织水肿作用。

TBI后继发氧化应激反应是引起脑组织损伤的

重要因素之一<sup>[15]</sup>,继发损伤可产生并释放大量氧自由基,引发脂质过氧化反应,破坏生物膜结构的完整性和通透性,最终导致细胞变性、凋亡和坏死。MDA是脂质氧化的最终产物,因此,MDA含量可直接反映体内氧自由基产生和释放水平,其表达的高低可间接反映细胞受自由基攻击的程度<sup>[16]</sup>。SOD是细胞内主要的抗氧化酶,也是细胞内主要的自由基清除剂,可保护细胞对抗氧自由基对机体的损害,SOD水平的高低,可反映出内源性氧自由基清除系统功能<sup>[17]</sup>。CAT是一种酶类清除剂,存在于细胞的过氧化氢体内,可促使 $\text{H}_2\text{O}_2$ 分解为分子氧和水,清除体内的过氧化氢,从而使细胞免于遭受 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的毒害,是过氧化物酶体的标志酶,是生物防御体系的关键酶之



一。GSH 过氧化物酶也是机体内的一种重要的抗氧化酶,可催化过氧化氢分解,其表达水平的高低可间接反映机体清除氧自由基的能力。本研究发现,TBI 后脑组织 MDA 含量明显上升,而 CAT、SOD、GSH 含量明显下降,而香芹酚治疗后这些指标明显逆转,提示香芹酚具有抑制氧化应激反应的作用。

NO 参与多种生理、病理机制,在颅脑内发挥着细胞间信使的作用,NO 在 NOS 催化下,由精氨酸分解产生,是一种具有自由基性质的不稳定气体,因此,NO 的含量与 NOS 活性密切相关<sup>[18]</sup>。神经元型 NOS 主要存在于脑和神经细胞的细胞质内<sup>[19]</sup>。内皮型 NOS 主要存在于血管内皮细胞的细胞膜上,神经元型 NOS 和内皮型 NOS 又被统称为结构型 NOS,在损伤颅脑内可催化生成的低浓度的 NO,发挥着调节细胞间信息传递等生理功能。诱导型 NOS 在细胞正常情况下几乎不表达,在内毒素与炎症因子的作用下得以激活,诱导型 NOS 活性可维持数小时至数天,可生成的高浓度 NO,与体内活性氧发生反应,可生成 ONOO<sup>-</sup>和 N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 等物质,可分别可诱导细胞的氧化损伤和亚硝基化的损伤。神经元型 NOS 的特异性抑制剂硝基吡唑能显著抑制伤后早期脑组织 NO 含量和脑组织 NOS 活性升高,因此,神经元型 NOS 来源的 NO 是参与 TBI 后继发性损伤的发病机制的重要一员。本研究发现,TBI 后脑组织 NO、总 NOS 明显上升,而香芹酚治疗后明显逆转,提示香芹酚具有抑制氧化应激反应的作用。

总之,香芹酚能够显著改善 TBI 大鼠的神经功能,其机制可能与抑制脑水肿和氧化应激反应有关。

#### 【文献参考】

- [1] Corps KN, Roth TL, McGavern DB. Inflammation and neuroprotection in traumatic brain injury [J]. *JAMA Neurol*, 2015, 72(3): 355–362.
- [2] 骆良钦,陈祥荣,李亚松,等. JNK 信号通路在大鼠创伤性脑损伤后炎症反应中的作用[J]. *中华神经医学杂志*, 2014, 12(13): 1233–1238.
- [3] 白立曦,宋锦宁. 创伤性脑损伤后氧化应激损伤机制研究进展[J]. *中华脑科疾病与康复杂志*, 2013, 5(3): 325–328.
- [4] 李志伟,王著军,徐旭,等. TNF- $\alpha$ 、LPS、IL-6、PAT 与颅脑损伤后急性凝血功能障碍的相关性[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2015, 20: 25–27.
- [5] 隗世波,周游,刘青云,等. 颅脑损伤患者血浆硫化氢含量的变化及其意义[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2014,

- 19: 223–224, 228.
- [6] 张卫民,雷鹏. rhEPO 对大鼠颅脑损伤后的损伤脑组织 NF- $\kappa$ B 表达和血清 TNF- $\alpha$  水平的影响[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2014, 19: 290–293.
- [7] Ultee A, Kiss EP, Smid EJ. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(10): 4606–4610.
- [8] Kisko G, Roller S. Carvacrol and p-cymene inactivate *Escherichia coli* O157: H7 in apple juice [J]. *BMC Microbiol*, 2005, 5: 36.
- [9] Beena, Kumar D, Rawat DS. Synthesis and antioxidant activity of thymol and carvacrol based Schiff bases [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23(3): 641–645.
- [10] Lima MD, Quintans-Junior LJ, de Santana WA, *et al.* Antiinflammatory effects of carvacrol: evidence for a key role of interleukin-10 [J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 699 (1–3): 112–117.
- [11] Chen J, Li Y, Wang L, *et al.* Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats [J]. *Stroke*, 2001, 32(4): 1005–1011.
- [12] Irimia A, Van Horn JD. Functional neuroimaging of traumatic brain injury: advances and clinical utility [J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2015, 11: 2355–2365.
- [13] Baser KH. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils [J]. *Curr Pharm Des*, 2008, 14(29): 3106–3019.
- [14] Wu W, Tian R, Hao S, *et al.* A pre-injury high ethanol intake in rats promotes brain edema following traumatic brain injury [J]. *Br J Neurosurg*, 2014, 28(6): 739–745.
- [15] Wang JW, Wang HD, Cong ZX, *et al.* Puerarin ameliorates oxidative stress in a rodent model of traumatic brain injury [J]. *J Surg Res*, 2014, 186(1): 328–337.
- [16] Kontos HA, Wei EP. Superoxide production in experimental brain injury [J]. *J Neurosurg*, 1986, 64(5): 803–807.
- [17] Afonso V, Champy R, Mitrovic D, *et al.* Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases [J]. *Joint Bone Spine*, 2007, 74(4): 324–329.
- [18] 史建国,姜勇,岳洪胜,等. 急性颅脑损伤患者血清一氧化氮、脑型肌酸激酶同工酶及神经元特异性烯醇化酶动态监测的意义[J]. *临床神经病学杂志*, 2007, 3(20): 240.
- [19] 王斌,苏喜生,张声华. 一氧化氮合酶的结构及其催化机理[J]. *有机化学*, 2005, 3(25): 342–345.

(2015-12-22 收稿, 2016-02-25 修回)