基础研究 文章编号：0253-3626（2011）06-0904-03

二烯丙基硫醚对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用和治疗时间窗

林雪梅，赵 涌，赵 敬，陈晏林，李 斓，喻姗姗，巫静娴
（重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心，重庆 400016）

【摘 要】目的：研究二烯丙基硫醚（Diallyl sulfide，DAS）对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用和治疗时间窗。方法：DAS 的保护作用研究，采用线栓法制备大鼠大脑中动脉阻断（Middle cerebral artery occlusion，MCAO）局灶性脑缺血模型，分别在造模前 7 d 采用腹腔注射法连续给予 DAS 25、50、100、200 mg/kg，制备 MCAO 模型，缺血 2 h，再灌注 24 h，评价大鼠神经功能状态、脑水肿、脑梗死面积；DAS 的治疗时间窗研究，采用 MCAO 局灶性脑缺血再灌注模型，分别在缺血 1 h、再灌注损伤后 2、4、6 h 腹腔注射 DAS 50 mg/kg，缺血 2 h，再灌注 24 h，评价神经功能状态、脑水肿和脑梗死面积模型。结果：DAS 50 mg/kg，能最大程度的改善大鼠脑缺血再灌注后神经功能评分，减轻脑水肿和减少脑梗死面积；缺血后 1 h 开始用药，神经功能缺损评分明显减少，脑水肿及脑梗死面积也明显下降，再灌注 2、4 h 后给药，疗效下降，6 h 给药，则无明显作用。结论：DAS 对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤有保护作用，有效时间窗在缺血后 1 h 到再灌注损伤后 2 h 内。

【关键词】二烯丙基硫醚；脑缺血再灌注损伤；神经保护；时间窗
【中国图书分类法分类号】R743.3 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-02-20

Protective effect of diallyl sulfide on cerebral ischemia/reperfusion injury in rats and therapeutic window of opportunity

LIN Xue-mei, ZHAO Yong, ZHAO Jing, CHEN Yan-lin, LI Lan, YU Shan-shan, WU Jing-xian
(*Molecular Medicine and Tumor Research Center, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the protective effect of diallyl sulfide and the therapeutic window of opportunity for diallyl sulfide following focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. *Methods*: For the protective effect of diallyl sulfide, focal cerebral ischemia-/reperfusion models in rats were induced by the transient occlusion of the middle cerebral artery (MCAO) for 2 h, followed by reperfusion for 24 h, and the animals were administered DAS25, 50, 100, 200 mg/kg, ip, q d × 7 d before transient MCAO. The neurological deficit score, infarct size and brain edema were examined. For the therapeutic window of opportunity, the MCAO model was induced by transient occlusion for 2 h and reperfusion for 24 h. The drugs were administered at 1h after the onset of ischemia and 2, 4, 6 h after reperfusion respectively. The neurological deficit score, infarct size and brain edema were examined. *Results*: DAS 50 mg/kg, ip, q d × 7 d before MCAO significantly reduced the neurological deficit score, infarct size and brain edema. The administration of DAS beginning at 1 h after the onset of ischemia significantly reduced neurological deficit sore, infarct size and brain ischemia; starting at 2, 4 h after reperfusion, the neuroprotective effects decreased, and starting at 6 h after reperfusion did not result in significant reduction of the above indexes for brain tissue. *Conclusion*: Diallyl sulfide has protective effect on cerebral ischemia/reperfusion injury. The therapeutic window of opportunity of diallyl sulfide in transient focal cerebral ischemia injury is between 1 h after the onset of ischemia and 2 h after reperfusion.

【Key words】diallyl sulfide; cerebral ischemia/reperfusion injury; neuroprotective; therapeutic window of opportunity

大蒜素是草本植物大蒜中提取的主要有效成分，具有抗肿瘤、抗氧化、抗血小板聚集、清除自由基、降血脂、降血压及预防心血管疾病等生理学作用[1-6]。它是一种很不稳定的脂溶性物质，可转变成二烯丙基硫醚（Diallyl sulfide，DAS）、二烯丙基二硫醚（Diallyl disulfide，DADS）、二烯丙基三硫醚（Diallyl trisulfide，DATS）。多项研究证实，大蒜素可通过其抗氧化、抗炎症[7-9]等机制，对脑缺血再灌注损伤起到脑保护作用。也有临床研究表明大蒜素对急性脑梗塞具有较好的治疗效果[6,10]。DAS 是大蒜素的主要有效成分之一。已有文献报道，DAS 可通过抗氧化作用对发生缺血再灌注损伤后的组织起到保护作用，比如肝、肾[11,12]，但在脑缺血再灌注损伤方面没有相关报道。因此，本研究采用大鼠大脑中动脉阻断（Middle cerebral artery occlusion，MCAO）局灶性脑缺血再灌注模型，探讨 DAS 对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用和有效治疗时间窗。

作者介绍：林雪梅（1986-），女，硕士，
研究方向：缺血性脑损伤研究。
通信作者：赵 涌，男，教授，Email：blys01@163.com。
基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：30900457、81070917）。

1 材料和方法

1.1 动物和药物的准备

成年健康雄性 Sprague-Dawley(SD)大鼠(由重庆医科大学实验动物中心提供)，重量 250~300 g，随机分成 6 组：假手术组(Sham)、缺血再灌注模型组(MCAO)、缺血再灌注模型+DAS 25 mg/kg 组(DAS 25+MCAO)、缺血再灌注模型+DAS 50 mg/kg 组(DAS 50+MCAO)、缺血再灌注模型+DAS 100 mg/kg 组(DAS 100+MCAO)、缺血再灌注模型+DAS 200 mg/kg 组(DAS 200+MCAO)。将 DAS(购自 sigma 公司，纯度≥97%)溶解于二甲基亚砜中。各用药组按上述剂量给药，ip，q d × 7 d；假手术组和模型组给与等体积的二甲基亚砜。

1.2 动物模型的制备

采用改良的 Longa 法[13]制备 MCAO 模型。使用 0.26 mm 鱼线(头端覆以石蜡，使头端成梭形)做为线栓。术前禁食 12 h，自由饮水，实验大鼠以 0.35%水合氯醛腹腔注射麻醉(0.1 ml/kg)，暴露左侧颈总动脉，线栓经颈总动脉插入颈内动脉，过颈动脉分叉处继续进线大约 2 cm 时稍感阻力，说明线栓已经到位，随即将线栓固定在颈总动脉上，缝合伤口。围手术期间采取严密消毒措施，并用红外线恒温灯将大鼠体温维持在 37℃±0.5℃。栓塞 2 h 后退出线栓再灌注 24 h。

1.3 神经病学评分

大鼠术毕清醒后，观察其行为学变化，按 Zea-longa 评分标准[13]将动物的行为变化分为 5 级：0 级：无神经缺损症状；1 分：不能伸展右侧前爪；2 分：行走时向右侧转圈；3 分：行走时向右侧倾倒；4 分：不能自发行走，意识丧失。1~3 分为有效模型。

1.4 脑组织含水量的测定

大鼠脑缺血再灌注 24 h 后，断头处死大鼠，取出全脑，去除脑表面的硬脊膜、小脑及脑干部分，立即用微量精密天平称取脑湿重，然后放置烘箱中，80℃烘 72 h 至恒重，称取干重。脑含水量(%)=(脑湿重-脑干重)/脑湿重×100%。

1.5 脑梗死体积的测量

采用 TTC 法氯化三苯基四氮唑(Triphenyltetrazolium choloride)检测大鼠脑梗死体积。脑缺血再灌注 24 h 后，立即处死大鼠，断头取出完整大脑，做脑组织冠状切片(2 mm/片)，迅速浸没在 2%TTC 溶液中，放入 37℃恒温箱中孵育 20 min，倒掉 TTC 溶液，用 10%甲醛固定。

1.6 大鼠脑缺血再灌注损伤治疗时间窗

SD大鼠，随机分为 6 组：假手术组(Sham)、缺血再灌注模型组(MCAO)、缺血再灌注模型+DAS(I-1 h)治疗组[DAS(I-1 h)+MCAO]、缺血再灌注模型+DAS(R-2 h)治疗组[DAS(R-2 h)+MCAO]、缺血再灌注模型+DAS(R-4 h)治疗组[DAS(R-4 h)+MCAO]、缺血再灌注模型+DAS(R-6 h)治疗组[DAS(R-6 h)+MCAO]。模型制备同 1.2 方法，各治疗用药组分别在缺血后 1 h，再灌注后 2、4、6 h 腹腔注射 DAS 50 mg/kg，缺血 2 h，再灌注 24 h。按前述的方法评价神经功能状态、干湿重法测定脑水肿和 TTC 染色测定脑梗死面积。

1.7 统计学处理

应用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。大鼠神经功能评分数据用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，脑梗死体积与脑含水量数据经平方根反正弦后用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。采用单因素方差分析(One way ANOVA)进行组间比较，$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同浓度 DAS 对神经行为评分、脑梗死体积和脑组织含水量的影响

不同浓度 DAS 均能在一定程度上改善大鼠脑缺血再灌注后神经功能状态，减轻脑水肿和脑梗死体积。当药物浓度增加到 50 mg/kg 时，达最佳效果，随药物浓度进一步增加，疗效逐渐下降。见表 1，图 1。

表 1 各浓度 DAS 对大鼠脑缺血再灌注后神经功能评分、脑梗死体积和脑含水量的影响($\bar{x}\pm s$，$n=6$)

组别	剂量(mg/kg)	神经功能评分	脑梗死体积	脑含水量
Sham	-	0	0	1.09 ± 0.01
MCAO	-	2.33 ± 0.21	0.63 ± 0.01	1.34 ± 0.04*
DAS25+MCAO	25	1.67 ± 0.21	0.59 ± 0.03	1.13 ± 0.01#
DAS50+MCAO	50	1.00 ± 0.40#	0.52 ± 0.01#	1.08 ± 0.01#
DAS100+MCAO	100	1.00 ± 0.37#	0.56 ± 0.01#	1.09 ± 0.01#
DAS200+MCAO	200	1.17 ± 0.40#	0.58 ± 0.02	1.11 ± 0.02#

注：与假手术组比较，*，$P<0.01$；与模型组比较，#，$P<0.05$



图 1 各组别大鼠脑梗死体积

2.2 DAS 对大鼠脑缺血再灌注损伤有效时间窗的影响

缺血开始后 1 h 经腹腔注射给药，大鼠神经功能评分与 MCAO 组比较明显减少($P<0.05$)，脑含水量和脑梗死体积也明显减少($P<0.01$)；再灌注后 2、4 h 经腹腔注射给药，大鼠脑含水量、脑梗死体积与 MCAO 组比较也明显减少($P<0.01$)；神经功能评分有所下降，但无统计学差异；但再灌注后 4 h给药与再灌注后 2 h 给药比较，大鼠脑梗死体积明显增多($P<0.01$)；再灌注后 6 h 给药，大鼠脑含水量与 MCAO 组比较减少($P<0.01$)；而神经功能评分和脑梗死体积有所下降，但无统计学差异。见表 2。

3 讨 论

脑卒中是一种复杂的疾病，80%属于缺血性的，源于血管闭塞或灌注压过低。闭塞的脑血管经溶栓治疗再通后，在短时间内其神经功能缺损体征和形态学改变会有所加重，形成脑缺血再灌注损伤。在动物实验中，脑组织从可逆性损伤到

表 2 DAS 治疗大鼠脑缺血再灌注时间对神经功能评分、脑梗死体积和脑含水量的影响（$\bar{x} \pm s$，$n=6$）

组别	神经功能评分	脑梗死体积	脑含水量
Sham	0	0	1.09 ± 0.01
MCAO	2.67 ± 0.33	0.68 ± 0.02	1.34 ± 0.04*
DAS（I-1 h）+MCAO	1.33 ± 0.33△	0.42 ± 0.04#	1.09 ± 0.01#
DAS（R-2 h）+MCAO	1.67 ± 0.33	0.51 ± 0.03#	1.08 ± 0.01#
DAS（R-4 h）+MCAO	1.67 ± 0.52	0.59 ± 0.06#▲	1.09 ± 0.01#
DAS（R-6 h）+MCAO	2.33 ± 0.33	0.64 ± 0.04	1.10 ± 0.01#

注：与 Sham 比较，*，$P<0.01$；与 MCAO 比较，#，$P<0.01$，△，$P<0.05$，与 DAS（R-2h）+MCAO 比较，▲，$P<0.01$

不可逆性损伤在恢复血流过程中比在缺血时更明显，此时药物的应用时机更为重要，因此在动物模型中建立有效时间窗作为评估药物作用是非常重要的[14]。

大蒜素作为一种具有良好发展前景的天然抗氧化药物和抗炎药物，在脑缺血再灌注损伤中的保护作用正逐渐引起研究者的关注。大量文献报道大蒜素对脑缺血再灌注损伤具有良好的保护作用。但不同文献，报道结果也各不相同。刘可云等[8]报道大蒜素对大鼠脑缺血再灌注损伤具有保护作用的有效浓度是 20 mg/kg，给药时间是在缺血后 2 h。同时 Sofiyan Saleem 等[15]研究结果表明，大蒜素治疗的有效浓度是 500 mg/kg，给药时间是在缺血前 30 min。而 Fahim Atif 等[16]人研究则显示，大蒜素治疗缺血再灌注损伤的有效浓度是 300 mg/kg，在缺血前 15 min 和缺血后 2 h 同时给药最佳。这可能与研究者所选取药物的纯度以及药物中所含各成分比例不同有关。

大蒜素的主要有效成分有 3 种：DAS、DADS、DATS。其中，DAS 作为大蒜素的主要有效成分之一，其在缺血再灌注损伤的防治作用中正逐渐引起研究者的关注。Immam 等[12]研究结果显示，在缺血前 12~15 h 采用腹腔注射 DAS（1.75 mmol/kg）可通过减少氧化应激，对大鼠肝缺血再灌注损伤起到保护作用。而在大鼠脑缺血再灌注损伤方面却没有相关报道。因此，本研究采用高纯度 DAS（纯度≥97%），制作大鼠 MCAO 模型，缺血 2 h，再灌注 24 h，设定 25、50、100、200 mg/kg 4 个药物浓度组，探讨 DAS 对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用。结果显示，各浓度 DAS 均能在一定程度上改善大鼠脑缺血再灌注后神经功能状态。当浓度达到 50 mg/kg（ip）时，药物保护作用达到最佳效果，随着药物浓度继续增加，疗效逐渐下降。因此我们选择 50 mg/kg DAS 进行后续的实验。

STAIR[17]在神经保护剂的临床前研究规范中建议，评价药物的疗效，应该在卒中发作后给药，并在治疗时间窗有效。临床上无论溶栓治疗还是神经保护治疗，在有效时间窗内开始给药可以有效减轻损伤，而超出此时间窗的治疗，无明显疗效。Jennifer 等[18]人在对急性卒中治疗的群体样本研究中发现，有 31%的卒中患者在发病后的 3 h 内到达医院进行治疗，约有 45%的病人在 6 h 内到达。因此本实验设定缺血后 1 h，再灌注后 2、4、6 h 4 个给药时间点，探讨 DAS 的最佳给药时间窗。本实验数据显示，DAS 在大鼠局灶性脑缺血 1 h 给药，有比较显著的治疗作用，在再灌注后 2、4 h 给药，也有治疗作用，但疗效已开始下降，且在再灌注后 4 h 给药，药效明显较再灌注后 2 h 给药差。而在再灌注后 6 h 给药，则无明显的治疗作用。因此 DAS 对大鼠局灶性脑缺血损伤治疗的有效时间窗是缺血后 1 h 到再灌注后 2 h 之内。

参 考 文 献

[1] Mnnu A，Yogeshwer S.Induction of apoptosis diallyl sulfide in DMBA-induced mouse skin tumors[J].Nutrition and Cancer，2002，44（1）：89-94.

[2] Hong Y S，Ham Y A，Choi J H.Effects of allyl sulfur compounds and garlic extract on the expression of Bcl-2，Bax，and p53 in non small cell lung cancer cell lines[J].Exp Mol Med，2000，32（3）：127-134.

[3] Prasad S，Kalra N，Srivastava S，et al.Regulation of oxidative stress-mediated apoptosis by diallyl sulfide in DMBA-exposed Swiss mice[J].Human&Experimental Toxicology，2008，27（1）：55-63.

[4] 蔡 飞，李彩蓉，吴基良，等.大蒜素对大鼠局灶性脑缺血后热休克蛋白的影响[J].医药导报，2005，24（3）：183-184.

[5] 郑燕华，陈崇宏.大蒜素对大鼠急性脑缺血再灌注损伤保护作用的研究[J].中国药理学通报，2004，20（7）：821-823.

[6] 史载祥，张久亮，毛建生，等.大蒜素注射液治疗急性脑梗死 101 例临床研究[J].中国中西医结合急救杂志，1999，6（9）：390-394.

[7] 郑燕华，陈崇宏.大蒜素对大鼠急性脑缺血再灌注损伤保护作用的研究[J].中国药理学通报，2004，20（7）：821-823.

[8] 刘可云，黄贤珍，黄德彬，等.大蒜素对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤保护作用的实验研究[J].湖北民族学院学报（医学版），2006，23（1）：11-13.

[9] Numagami Y，Sato S，Ohnishi S T.Attenuation of rat ischemic brain damage by aged garlic extracts:a possible protecting mechanism as antioxidants[J].Neurochem Int，1996，29（2）：135-143.

[10] 张久亮，刘 鑫，毛建生，等.大蒜素治疗急性脑梗塞的临床观察[J].北京中医药大学学报（中医临床版），2003，10（2）：23-26.

[11] Savas M，Yeni E，Ciftci H，et al.The antioxidant role of oral administration of garlic oil on renal ischemia-reperfusion injury[J].Ren Fail，2010，32（3）：362-367.

[12] Immam H S，Jancy M G，Thomas J T，et al.Protective effects of diallyl sulfide，a garlic constituent.on the warm hepatic ischemia-reperfusion injury in a rat model[J].Pharm Res，2008，25（10）：2231-2242.

[13] Longa E Z，Weinstein P R，Carlson S，et al.Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J].Stroke，1989，20（1）：84-91.

[14] Li D Q，Bao Y M，Zhao J J，et al.Neuroprotective properties of catalpol in transient global crebral ischemia in gerbils：dose-response，therapeutic time-window and long-term efficacy[J].Brain Res，2004，1029（2）：179-185.

[15] Sofiyan S，Muzamil A，Abdullah S A，et al.Behavioral and histologic neuroprotection of aqueous garlic extract after reversible focal cerebral ischemia[J].J Med Food，2006，9（4）：537-544.

[16] Fahim A，Seema Y，Sandeep K A.S-Allyl L-cysteine diminishes cerebral ischemia-induced mitochondrial dysfunctions in hippocampus [J].Brain Res，2009，1265（10）：128-137.

[17] Stroke therapy academic industry roundtable（STAIR）.Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and development[J].Stroke，1999，30（12）：2752-2758.

[18] Jennifer J M，Melinda A S，Darin B Z，et al.Population-based analysis of the impact of expanding the time window for acute strok treatment[J].Stroke，2007，38（12）：3213-3217.

（责任编辑：关蕴良）