

# D-阿洛糖下调半乳糖凝集素-3 抑制 AMPK/mTOR 通路减轻脑缺血再灌注损伤

罗耀文<sup>1,2</sup>,程俊凯<sup>2</sup>,张敏<sup>2</sup>,苟茂荣<sup>2</sup>,李娟<sup>2</sup>,张磊<sup>2</sup>,高大宽<sup>2</sup>

**摘要** 目的 探讨 D-阿洛糖(D-allose)对小鼠脑缺血再灌注损伤(CIRI)的神经功能恢复、半乳糖凝集素-3(Gal-3)、腺苷一磷酸活化蛋白激酶/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(AMPK/mTOR)及部分炎症因子表达的影响。方法 C57BL/6 雄性小鼠 50 只,随机分为对照组(Con 组)、假手术组(Sham 组)、脑缺血再灌注损伤组(MCAO 组)、脑缺血再灌注损伤+D-阿洛糖组(MCAO+D-allose 组)及脑缺血再灌注损伤+改良柑橘果胶组(MCAO+MCP 组)。采用线栓法建立大脑中动脉闭塞/再灌注(MCAO/R)模型。造模成功后对小鼠进行 Longa 神经功能评分及转棒行走评分;采用 TTC 染色法观察脑梗死灶体积;通过 Western blot 及 RT-PCR 技术检测 Gal-3、自噬相关分子的表达水平;免疫荧光技术检测脑组织中 Gal-3 的分布情况;试剂盒检测肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 、白细胞介素(IL)-8 分泌。结果 相较于 Con 组和 Sham 组,MCAO 模型可增加小鼠神经功能评分( $P < 0.01$ )、增加脑梗死体积( $P < 0.01$ )、上调 Gal-3 的表达并增强自噬( $P < 0.01$ )。给予 D-阿洛糖及 Gal-3 抑制剂 MCP 治疗后可改善神经功能障碍、减小脑梗死体积( $P < 0.01$ ),并降低 Gal-3 的表达( $P < 0.01$ ),抑制 AMPK 磷酸化,促进 mTOR 磷酸化,抑制自噬( $P < 0.01$ )。结论 D-阿洛糖可有效促进 CIRI 小鼠神经功能恢复和减小脑梗死灶体积,其机制可能是通过下调 Gal-3 的表达进而抑制组织损伤后细胞过度自噬,并减少 TNF- $\alpha$ 、IL-8 等炎症因子释放,从而发挥神经保护作用。

**关键词** 脑缺血再灌注损伤;D-阿洛糖;半乳糖凝集素-3;自噬;AMPK/mTOR 通路

**中图分类号** R-33;R 651.1;R 452

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2023)09-1467-07  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.09.006

缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)是导致患者

高残死率的重要原因之一<sup>[1]</sup>。目前,通过血管内治疗及搭桥技术实现缺血区域再灌注是临床最常用的治疗方式<sup>[2]</sup>,虽然可以保护因缺血缺氧而受损的神经元,但会引起脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia-reperfusion injury, CIRI)<sup>[3]</sup>。因此,探寻有效防治措施减轻 CIRI,改善预后,并阐明其机制有极其重要的临床意义。然而,现有治疗 CIRI 的药物疗效均不佳<sup>[4]</sup>。D-阿洛糖(D-allose)是一种具有较高生物安全性的稀有单糖。在皮瓣移植等缺血再灌注损伤中,D-阿洛糖显示出强效抗氧化、抗炎作用<sup>[5]</sup>。半乳糖凝集素-3(galectin-3, Gal-3)属于半乳糖凝集素凝集素家族,高表达可活化中枢及外周多种免疫细胞,与炎症反应密切相关<sup>[6]</sup>。本实验应用 D-阿洛糖治疗脑缺血再灌注损伤,并探究其通过调控 Gal-3 的表达干预 AMPK/mTOR 通路,进而影响神经细胞自噬和炎症因子释放。

## 1 材料与方法

**1.1 主要试剂和仪器** 栓塞用线、动物用异氟烷购自瑞沃德生命科技有限公司。D-阿洛糖购自日本香川大学。MCP 购自美国 Econugenics 公司。TTC 染料购自北京索莱宝科技有限公司。RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒及 SYBR GREEN 均购自日本 Takara 公司。SDS 凝胶配制试剂盒、RIPA 裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒购自碧云天生物技术有限公司。Gal-3、 $\beta$ -actin、LC3、Beclin-1、AMPK、P-AMPK、mTOR、P-mTOR 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司。HRP 二抗购自西安壮志生物科技有限公司。HRP 化学发光底物购自美国 Millipore 公司。凝胶成像分析系统、实时荧光定量 PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司。TNF- $\alpha$ 、IL-8 ELISA 试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司。qPCR 引物由本课题组自行设计并由北京擎科生物科技有限公司合成。

**1.2 实验动物** 实验用 C57BL/6 清洁、健康、雄性小鼠 50 只(7~8 周龄、体质量 20~25 g)购自空军军医大学实验动物中心,饲养于空军军医大学第一

2023-06-26 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81971227);陕西省自然科学基金研究计划项目(编号:2019KW-039)

作者单位:<sup>1</sup>西安医学院研究生处,西安 710068

<sup>2</sup>中国人民解放军空军军医大学西京医院神经外科,西安 710032

作者简介:罗耀文,男,硕士研究生;

高大宽,男,副教授,副主任医师,硕士生导师,责任作者,  
E-mail:dakgao@fmmu.edu.cn

附属医院神经外科实验室 SPF(无特定病原体)级动物房,动物房环境温度约 25 ℃,湿度约 50%,12 h/12 h 明暗交替,棒状固体饲料及自来水喂养,自由进食进水。本研究所有动物实验操作均通过空军军医大学动物伦理委员会审查(编号: IACUC-20220122)。

**1.3 动物分组与模型建立** 将 50 只雄性小鼠随机分为对照组(Con 组),假手术组(Sham 组),脑缺血再灌注损伤组(MCAO 组),脑缺血再灌注损伤 + D-阿洛糖组(MCAO + D-allose 组),脑缺血再灌注损伤 + 改良柑橘果胶组(MCAO + MCP 组),每组 10 只。Con 组不做任何处理。除 Sham 组外,其余各组均于异氟烷吸入麻醉后正中切开颈部皮肤,分离出颈总动脉(CCA)、颈内动脉(ICA)、颈外动脉(ECA),结扎 CCA 近心端及 ECA,CCA 远心端挂线备用,用无创动脉夹夹闭 ICA,于 CCA 上两根线之间剪一小口并插入线栓,拉紧备用线,放开动脉夹,经由 ICA 向深部插入线栓,使之阻断大脑中动脉(MCA)血流。缺血 2 h 后小心拔出线栓,恢复血供,造成缺血区再灌注。Sham 组仅充分暴露 CCA、ICA、ECA 后缝合皮肤。MCAO + D-allose 组小鼠于手术操作结束后腹腔注射 D-阿洛糖溶液(0.4 mg/g)<sup>[7]</sup>。MCAO + MCP 组小鼠于造模当天开始给予 MCP 灌胃[(0.7 mg/(g · d))]直至处死。再灌注后 48 h 对小鼠进行行为学评价。

**1.4 Longa 法检测神经功能缺失情况,转棒行走检测运动情况** 神经功能缺失评分根据 Longa 法进行评分,具体评分标准:① 0 分:没有神经功能损伤的症状;② 1 分:提起鼠尾,损伤对侧前肢内收屈曲;③ 2 分:小鼠于平板上爬行时向损伤对侧划圈;④ 3 分:站立时向对侧倾倒;⑤ 4 分:右侧肢体偏瘫,不能自发行走,意识丧失。神经功能缺失体征评分在 1~4 分的小鼠认为 MCAO 模型成功。

转棒行走测评:将小鼠放置于转棒器上,以 3 r/min 的转速,评估其动态平衡功能:① 0 分:转动过程中小鼠可在棒上平稳行走;② 1 分:转动开始后 60 s 以上小鼠不会从棒上掉下来;③ 2 分:转动开始后 60 s 内小鼠从棒上掉下来;④ 3 分:小鼠无法稳定在静止的棒上。

**1.5 TTC 染色检测梗死灶体积** 过量麻醉后断头取脑,-80 ℃冰箱中冷冻 5~10 min。将脑组织置于切片器中切取冠状位脑片,每片厚度约 2 mm,将脑片放入 2% 红四氮唑溶液(TTC)中 37 ℃避光孵育 30 min。取出脑片后拍照记录染色情况。缺血区

域为 TTC 染色呈白色的区域,正常区域为 TTC 染色呈红色的区域。

**1.6 免疫荧光检测相关蛋白分子定位情况** 小鼠神经功能评分结束后,用肝素生理盐水,4% 多聚甲醛溶液心脏灌注后取脑。于 4 ℃多聚甲醛溶液(4%)中浸泡 24 h。进行脱水,石蜡包埋后冠状连续切片。切片行脱蜡,抗原修复等处理后用血清封闭,4 ℃过夜孵育一抗,清洗后加入荧光二抗,37 ℃避光孵育 2 h,随后使用含 DAPI 染料的封片剂封片。在荧光显微镜下观察并采集图像。

**1.7 ELISA 法测定炎症因子 TNF-α、IL-8 表达** 按照 ELISA 试剂盒说明书标准流程测定缺血脑组织中炎症因子 TNF-α、IL-8 的表达水平。用 4 ℃ PBS 冲洗小鼠脑组织,称重后将组织与 1:9 重量体积比的 PBS 加入匀浆器中,于冰上充分研磨。然后将匀浆液于 5 000 r/min 离心 5~10 min,取上清检测。利用酶标仪测定结果。

**1.8 Western blot 检测相关蛋白表达情况** 过量麻醉处死后取脑,收集缺血区组织,提取总蛋白,用 BCA 法测定蛋白浓度,SDS-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳,电泳完成后转移到硝酸纤维素膜(NC 膜)上,与 Gal-3(1:1 000)、LC-3(1:1 000)、Beclin-1(1:1 000)、AMPK(1:1 000)、P-AMPK(1:1 000)、mTOR(1:1 000)、P-mTOR(1:1 000)、β-actin(1:2 000)抗体结合,然后与 HRP 二抗结合,化学发光法显色,成像系统拍照。应用 Image J 图像分析软件分析灰度值。

**1.9 RT-PCR 检测相关基因 mRNA 表达情况** 使用 RNA 提取试剂盒提取组织中总 RNA,使用反转录试剂盒将其反转录为 cDNA,以 cDNA 为模板,按 SYBR GREEN 试剂说明书进行扩增检测。以 GAPDH 为内参,采用 2<sup>-ΔΔCt</sup>法计算对应基因表达量。引物序列详见表 1。

表 1 PCR 引物序列(5'-3')

引物名称	序列(5'-3')
Gal-3	F:5'-GTTGGGGCTTTGGCTGTATG-3'
	R:5'-TAGGTGAGCATCGTTGACCG-3'
Beclin-1	F:5'-GCTACCCGCTGCCTAGATG-3'
	R:5'-AACTCTGGAGGTCTCGTCT-3'
AMPK	F:5'-CTGCCATACATGTCCTCGGT-3'
	R:5'-CCACCTCTCAAGAGCTCGAC-3'
mTOR	F:5'-GCCTTCACAGATACCCA-3'
	R:5'-TAAACTCGGACCTGACC-3'
GAPDH	F:5'-TATGCACCTCACACGCCAT-3'
	R:5'-TGTACGGTCTAGGGATGCT-3'

**1.10 统计学处理** 应用 SPSS 统计软件对数据进行处理。实验数据计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间均数比较采用单因素方差分析(one way ANOVA),组间两两比较采用 *Dunnnett-t* 检验进行统计分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 D-阿洛糖改善小鼠脑 CIRI 神经功能评分及缩小脑梗死体积** 与 Con 组相比,Sham 组小鼠的 Longa 神经功能评分,转棒行走评分及脑梗死体积均未见差异( $P > 0.05$ )。MCAO 组小鼠的 Longa 神经功能评分( $F = 200.348, P < 0.01$ ),转棒行走评分( $F = 190.125, P < 0.01$ )及脑梗死体积( $F = 1487.393, P < 0.01$ )均高于 Con 组和 Sham 组。在给予 D-阿洛糖治疗后,小鼠 Longa 神经功能评分( $F = 51.429, P < 0.01$ ),转棒行走评分( $F = 16.2, P < 0.01$ )及脑梗死体积( $F = 112.133, P < 0.01$ )相较于 MCAO 组均有改善。与 MCAO + D-allose 组相比,MCAO + MCP 组 Longa 神经功能评分,转棒行走评分未见差异( $P > 0.05$ ),脑梗死体积减小( $F = 99.225, P < 0.01$ )。见图 1。神经功能评分、转棒行走评分、梗死灶体积具体数值详见表 2。

**2.2 D-阿洛糖减少小鼠脑 CIRI 后 Gal-3 的表达** 与 Con 组相比,Sham 组 Gal-3 蛋白表达量及 mRNA 表达量均无差异( $P > 0.05$ ),免疫荧光染色未见

表 2 行为学评分及脑梗死灶体积( $n = 3, \bar{x} \pm s$ )

组别	Longa 神经功能评分	转棒行走评分	梗死灶体积 (%)
Con	0.3 ± 0.46	0.2 ± 0.40	0.3 ± 0.46
Sham	0.3 ± 0.47	0.3 ± 0.46	0.8 ± 0.60
MCAO	3.5 ± 0.50	2.8 ± 0.40	35.2 ± 2.67
MCAO + D-allose	1.5 ± 0.67	1.9 ± 0.53	23.6 ± 1.91
MCAO + MCP	1.5 ± 0.50	1.6 ± 0.49	15.2 ± 1.66

Gal-3 阳性细胞增多;MCAO 组可见 Gal-3 蛋白( $F = 1058.369, P < 0.01$ )及 mRNA 表达量升高( $F = 867.126, P < 0.01$ ),Gal-3 阳性细胞数量增加。与 MCAO 组相比,MCAO + D-allose 组 Gal-3 蛋白表达量( $F = 59.658, P < 0.01$ )及 mRNA 表达量降低( $F = 30.194, P < 0.01$ ),损伤区组织 Gal-3 阳性细胞减少。与 MCAO + D-allose 组相比,MCAO + MCP 组 Gal-3 蛋白表达量( $F = 58.729, P < 0.01$ )及 mRNA 表达量下降( $F = 20.217, P < 0.01$ ),损伤区域 Gal-3 阳性细胞数减少。见图 2。

**2.3 D-阿洛糖下调 Gal-3 抑制自噬相关通路** 与 Con 组相比,Sham 组自噬相关分子蛋白及 mRNA 表达均无差异( $P > 0.05$ ),MCAO 组自噬相关蛋白 LC3、Beclin-1 蛋白表达量及 Beclin-1 转录水平均增加( $P < 0.01$ ),AMPK/mTOR 通路中蛋白 P-AMPK/AMPK 增加,AMPK 转录水平增加( $P < 0.01$ ),蛋白 P-mTOR/mTOR 减少,mTOR 转录水平减少( $P < 0.01$ )。

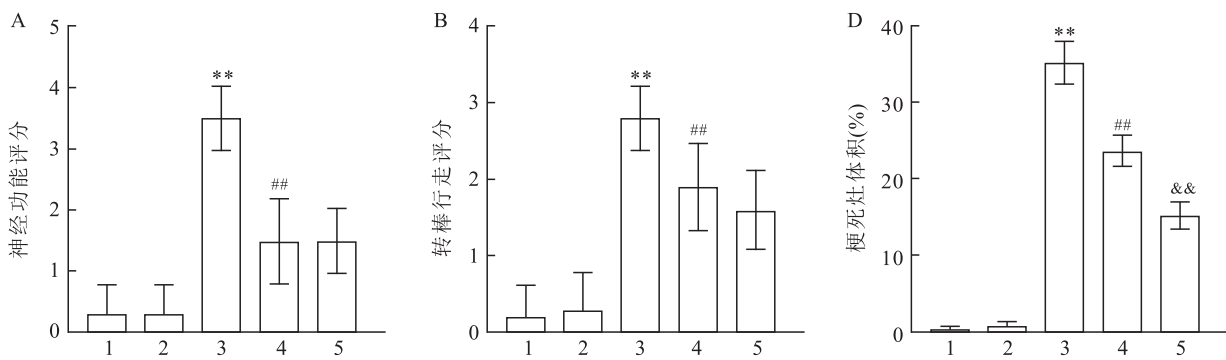
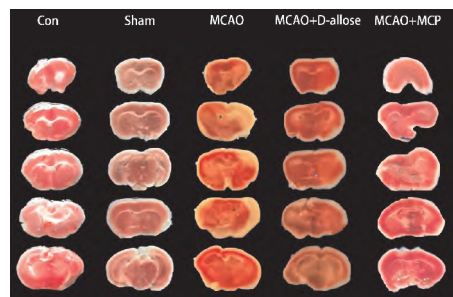


图 1 D-阿洛糖对 CIRI 后组织形态及行为学的影响

A:神经功能评分;B:转棒行走评分;C:脑组织 TTC 染色结果;D:梗死灶体积占总体积的百分比;1: Con 组;2: Sham 组;3: MCAO 组;4: MCAO + D-allose 组;5: MCAO + MCP 组;与 Con 组比较, \*\*  $P < 0.01$ ;与 MCAO 组比较,##  $P < 0.01$ ;与 MCAO + D-allose 组比较, &&  $P < 0.01$



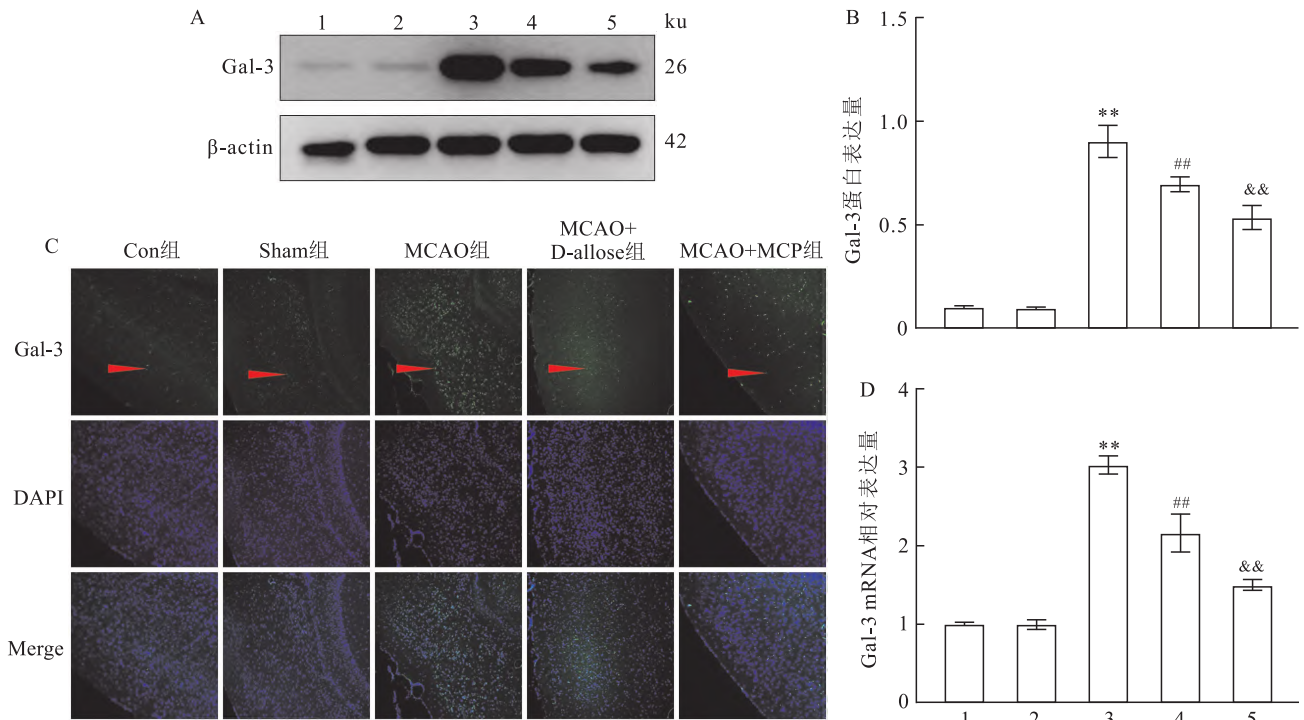


图2 D-阿洛糖对 Gal-3 表达的影响

A: Western blot 检测 Gal-3 在脑组织中的表达情况;B:Gal-3 在脑组织中表达的定量分析;C:各组小鼠脑组织的 Gal-3 免疫组织学图像免疫荧光染色 ×40;(DAPI: 4',6-二脒基-2-苯基吲哚),红色箭头指向 Gal-3 阳性细胞;D. RT-PCR 检测 Gal-3 mRNA 的表达情况;1:Con 组;2:Sham 组;3:MCAO 组;4:MCAO + D-allose 组;5: MCAO + MCP 组;与 Con 组比较: \*  $P < 0.01$ ; 与 MCAO 组比较: #  $P < 0.01$ ; 与 MCAO + D-allose 组比较: &&  $P < 0.01$

与 MCAO 组相比, MCAO + MCP 组与 MCAO + D-allose 组均可减少蛋白 LC3、Beclin-1、P-AMPK/AMPK, Beclin-1、AMPK mRNA 的过高表达 ( $P < 0.01$ ), 促进蛋白 P-mTOR/mTOR, mTOR mRNA 表达 ( $P < 0.01$ )。MCAO + MCP 组与 MCAO + D-allose 组比较, MCP 对于 Beclin-1 的蛋白表达和 Beclin-1 mRNA 表达的抑制作用更强 ( $P < 0.01$ ), D-阿洛糖对于 LC3 表达的抑制以及 P-mTOR/mTOR 的蛋白表达和 mTOR mRNA 表达的促进作用更明显 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 而对于 P-AMPK/AMPK 蛋白及

AMPK mRNA 表达, MCP 与 D-阿洛糖无差异 ( $P > 0.05$ )。见图 3、表 3。

**2.4 D-阿洛糖减少小鼠脑 CIRI 后炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-8 含量** 与 Con 组相比, Sham 组炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-8 表达无差异 ( $P > 0.05$ ); MCAO 组炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-8 均升高 ( $F = 1977.139, P < 0.01$ ;  $F = 2609.198, P < 0.01$ )。MCAO + D-allose 组两种炎症因子均下降 ( $F = 168.101, P < 0.01$ ;  $F = 782.743, P < 0.01$ )。与 MCAO + D-allose 组比较, MCP 减少 TNF- $\alpha$  分泌的作用较强 ( $F = 26.9, P <$

表3 自噬相关蛋白表达及 mRNA 表达 ( $n = 30, \bar{x} \pm s$ )

指标	MCAO 组		MCAO + D-allose 组		MCAO + MCP 组			
	* F 值	* P 值	# F 值	# P 值	# F 值	# P 值	& F 值	& P 值
P-mTOR/mTOR	446.839	<0.01	52.373	<0.01	106.576	<0.01	224.783	<0.01
P-AMPK/AMPK	22.896	<0.01	68.069	<0.01	125.720	>0.05	17.984	<0.01
LC3 II/LC3 I	237.839	<0.01	718.83	<0.01	614.418	<0.01	7.686	<0.05
Beclin-1/ $\beta$ -actin	807.931	<0.01	137.401	<0.01	286.385	<0.01	54.852	<0.01
Beclin-1 mRNA	596.801	<0.01	57.406	<0.01	128.462	<0.01	83.345	<0.05
AMPK mRNA	220.286	<0.01	43.709	<0.01	75.398	<0.01	41.828	>0.05
mTOR mRNA	1086.993	<0.01	113.906	<0.01	648.450	<0.01	224.783	<0.05

\* 表示与 Con 组比较; # 表示与 MCAO 组比较; & 表示与 MCAO + D-allose 组比较

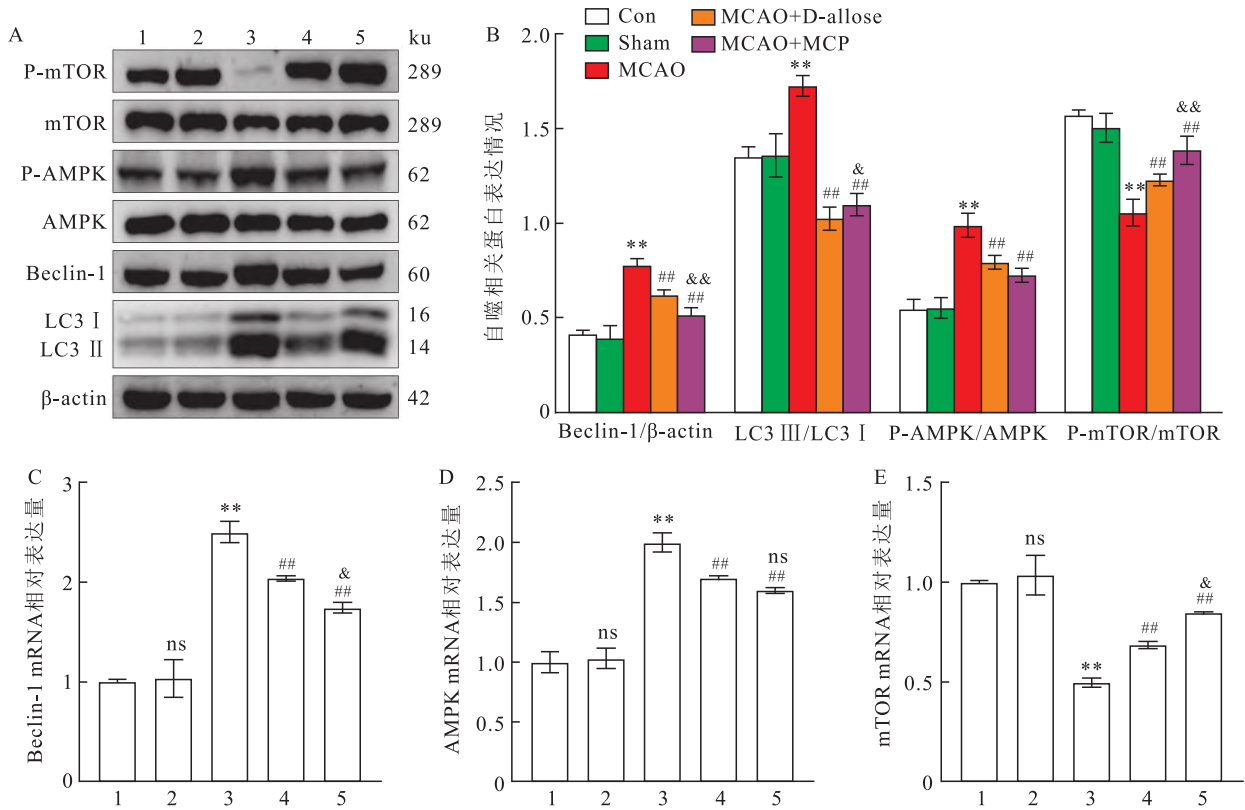


图3 D-阿洛糖对自噬相关分子及 AMPK/mTOR 通路表达的影响

A: Western blot 检测自噬相关分子表达; B: 自噬相关分子表达的定量分析; C: RT-PCR 检测 Beclin-1 mRNA 表达情况; D: RT-PCR 检测 AMPK mRNA 表达情况; E: RT-PCR 检测 mTOR mRNA 表达情况; 1: Con 组; 2: Sham 组; 3: MCAO 组; 4: MCAO + D-allose 组; 5: MCAO + MCP 组; 与 Con 组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 MCAO 组比较: ##  $P < 0.01$ ; 与 MCAO + D-allose 组比较: &  $P < 0.05$ , &&  $P < 0.01$

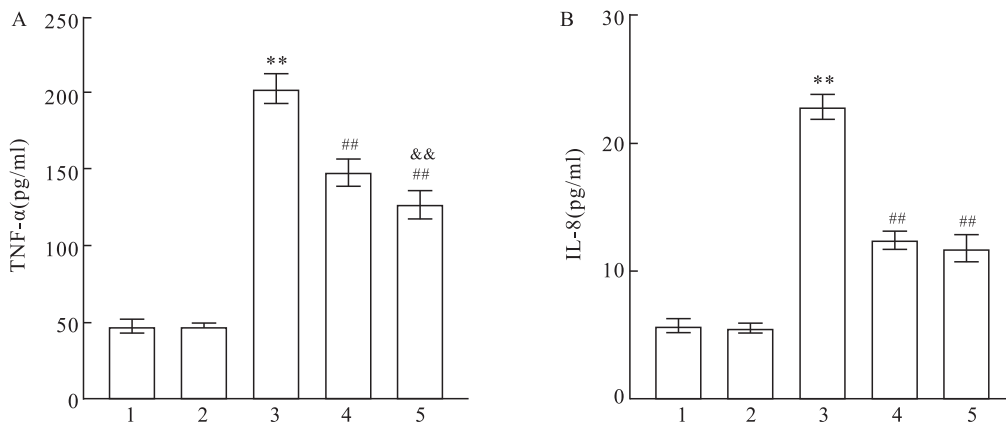


图4 D-阿洛糖对 TNF-α 及 IL-8 表达的影响

A: ELISA 法检测脑组织中 TNF-α 的表达量; B: ELISA 法检测脑组织中 IL-8 的表达量; 1: Con 组; 2: Sham 组; 3: MCAO 组; 4: MCAO + D-allose 组; 5: MCAO + MCP 组; 与 Con 组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 MCAO 组比较: ##  $P < 0.01$ ; 与 MCAO + D-allose 组比较: &&  $P < 0.01$

0.01), 减少 IL-8 分泌的作用无差异 ( $P > 0.05$ )。见图 4。

### 3 讨论

目前, 中老年人群中 IS 的发病率日趋增加, 其

致残、致死率高, 给社会及家庭造成沉重经济负担<sup>[8]</sup>, 多年来一直是全球重点防治的疾病。已有研究<sup>[9]</sup>证实多种因素可共同导致 IS 的发生发展, 但具体发病机制尚未完全阐明。目前, 临床上针对 CIRI 研发的各类药物的疗效均不尽人意, 促使科研工作

者在更深入探究其发病机制的同时,还不断进行新药的研发和治疗方法的创新。

D-阿洛糖是从灌木植物中提取的一种稀有糖,具有广泛的生理活性<sup>[10]</sup>,已成为器官移植和缺血性疾病研究的热点药物。在 CIRI 研究中发现 D-阿洛糖可降低缺血区 MPO 及 COX-2 的表达,也可通过降低 MMP-9,激活 PPAR $\gamma$  通路发挥保护血脑屏障的作用<sup>[7]</sup>。本实验中,对小鼠行为学的研究表明缺血再灌注后可出现运动障碍,感觉减退等程度不等的神经功能损伤体征给予 D-阿洛糖治疗的小鼠神经功能缺失评分低于对照组,组织学研究表明 D-阿洛糖可减少脑梗死面积,并显著改善缺血侧脑组织的病理形态。提示 D-阿洛糖有助于改善脑损伤引起的神经功能障碍。

Gal-3 是  $\beta$ -半乳糖苷酶凝集素,属于嵌合体样半乳糖蛋白,其大多是由脑内的巨噬细胞或激活的小胶质细胞分泌的<sup>[11]</sup>。有研究<sup>[12]</sup>发现缺血缺氧后大脑中 Gal-3 的表达升高提示其参与了大脑损伤后的多种炎症反应,提示 Gal-3 促进 CIRI 恶性发展。本研究中给予 CIRI 小鼠 0.4 g/Kg D-阿洛糖治疗后可显著降低脑组织中 Gal-3 的转录及蛋白表达,其机制可能是通过减少缺血缺氧损伤后免疫细胞过量激活并减少 Gal-3 分泌而实现的。该实验结果提示, Gal-3 促进 CIRI 的病理进程,可能是 CIRI 潜在治疗靶点。

自噬具有维持细胞完整及正常代谢的重要功能,可对细胞内环境进行监控,维持内环境稳定,但自噬也是一把“双刃剑”,适度的发生会起到神经保护作用,但过度自噬会加重细胞损害<sup>[13]</sup>。AMPK/mTOR 通路是自噬发生过程中的经典信号通路,AMPK 被磷酸化激活后抑制 mTOR 磷酸化,进而促进自噬的发生<sup>[14]</sup>。该研究中发现给予 D-阿洛糖治疗后可抑制自噬的发生进一步减轻 CIRI 的程度,而用 Gal-3 抑制剂 MCP 的使用证明 D-阿洛糖通过下调 Gal-3 的表达进而抑制自噬的激活过程。

CIRI 后,无菌性炎症反应在脑损伤中起重要作用,其中包括许多炎症细胞因子。给予 D-阿洛糖后可减少损伤大脑中炎症因子 TNF- $\alpha$  和 IL-8 表达水平。已有临床和动物实验证实了 D-阿洛糖可以减少脑损伤后的黏附分子、细胞因子的产生<sup>[15]</sup>。实验结果提示 D-阿洛糖对 CIRI 的保护是通过下调 Gal-3 的表达、抑制自噬及减少炎症因子的释放而起作用。

D-阿洛糖在再灌注同时给药亦有明显的抗脑 CIRI 损伤作用,扩大脑卒中的治疗窗,具有潜在的临床应用价值。

综上所述,小鼠 MCAO 术后会导致脑缺血再灌注损伤。D-阿洛糖对小鼠 CIRI 引起的神经功能缺失、脑梗塞和脑水肿均有改善作用,提示 D-阿洛糖是一种潜在的 CIRI 保护剂。

### 参考文献

- [1] 中华医学会神经病学分会,中华医学会神经病学分会脑血管病学组,中华医学会神经病学分会神经血管介入协作组. 中国急性缺血性卒中早期血管内介入诊疗指南 2022[J]. 中华神经科杂志, 2022,55(6): 565-80.
- [2] 张艳,周霞,王幼萌,等. 急性缺血性脑卒中机械取栓术后出血转化及其对预后的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2022,57(6): 987-90.
- [3] Lambertsen K L, B Finsen, B H Clausen. Post-stroke inflammation-target or tool for therapy? [J]. *Acta Neuropathol*, 2019,137(5): 693-714.
- [4] Kim W, H Y Jung, D Y Yoo, et al. *Gynura procumbens* root extract ameliorates ischemia-induced neuronal damage in the hippocampal CA1 region by reducing neuroinflammation [J]. *Nutrients*, 2021,13(1): 181.
- [5] Ju J, R Hou, P Zhang. D-allose alleviates ischemia/reperfusion (I/R) injury in skin flap via MKP-1 [J]. *Mol Med*, 2020,26(1): 21.
- [6] Nishikawa H, L Liu, F Nakano, et al. Modified citrus pectin prevents blood-brain barrier disruption in mouse subarachnoid hemorrhage by inhibiting galectin-3 [J]. *Stroke*, 2018,49(11): 2743-51.
- [7] Huang R, Zhang C, Wang X, et al. PPAR $\gamma$  in ischemia-reperfusion injury: overview of the biology and therapy [J]. *Front Pharmacol*, 2021,12: 600618.
- [8] 彭斌,吴波. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2018 [J]. 中华神经科杂志, 2018,51(9): 666-82.
- [9] 代晨阳,魏强,计海霞,等. 合肥市一社区脑卒中高危人群危险因素筛查分析 [J]. 安徽医科大学学报, 2021,56(1): 148-52.
- [10] Chen Z, J Chen, W Zhang, et al. Recent research on the physiological functions, applications, and biotechnological production of D-allose [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018,102(10): 4269-78.
- [11] 向菁,郑龙. 半乳糖凝集素-3 在脑卒中中的作用的研究进展 [J]. 医学理论与实践, 2020,33(24): 4076-7,4150.
- [12] Ren Z, Liang W, Sheng J, et al. Gal-3 is a potential biomarker for spinal cord injury and Gal-3 deficiency attenuates neuroinflammation through ROS/TXNIP/NLRP3 signaling pathway [J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(12): BSR20192368.

- [13] D'Arcy M S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy[J]. *Cell Biol Int*, 2019,43(6): 582 – 92.
- [14] Chun Y, Kim J. AMPK-mTOR signaling and cellular adaptations in hypoxia[J]. *Int J Mol Sci*, 2021,22(18): 9765.
- [15] Zhang M, Fu Y H, Luo Y W, et al. D-allose protects brain microvascular endothelial cells from hypoxic/reoxygenated injury by inhibiting endoplasmic reticulum stress[J]. *Neurosci Lett*, 2023, 793: 137000.

## D-allose alleviate cerebral ischemia-reperfusion injury by down-regulating galectin-3 inhibition of the AMPK/mTOR pathway

Luo Yaowen<sup>1,2</sup>, Cheng Junkai<sup>2</sup>, Zhang Min<sup>2</sup>, Gou Maorong<sup>2</sup>, Li Juan<sup>2</sup>, Zhang Lei<sup>2</sup>, Gao Dakuan<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Postgraduate Office, Xi'an Medical University, Xi'an 710068;

<sup>2</sup>Dept of Neurosurgery, Xijing Hospital, Air Force Medical University of PLA, Xi'an 710032)

**Abstract Objective** To investigate the effects of D-allose on the restoration of neurological function, Galectin-3 (Gal-3), adenosine monophosphate-activated protein kinase/mammalian target of rapamycin (AMPK/mTOR) and the expression of some inflammatory factors in ischemia-reperfusion injury (CIRI) mice. **Methods** A total of 50 male mice were randomly divided into control group (Con group), sham group (Sham group), cerebral ischemia-reperfusion injury group (MCAO group), cerebral ischemia-reperfusion injury + D-allose group (MCAO + D-allose group) and cerebral ischemia-reperfusion injury + modified citrus pectin group (MCAO + MCP group). The middle cerebral artery occlusion/reperfusion (MCAO/R) model (reperfusion after 2 hours of MCA ischemia) was established by thread embolism. After successful modeling, the neurological function of mice was evaluated Longa score and rotated rod walking. TTC staining was used to observe the volume of cerebral infarction foci. The expression levels of Gal-3 and autophagy-related molecules were detected by Western blot and RT-PCR. Immunofluorescence was applied to detect the distribution of Gal-3 in brain tissue, and TNF- $\alpha$ , IL-8 secretion was detected with ELISA KIT. **Results** Compared with Con group and Sham group, the MCAO model represented significant increase in the Longa neurofunction score ( $P < 0.01$ ), cerebral infarction volume ( $P < 0.01$ ), Gal-3 expression and manifested enhanced autophagy ( $P < 0.01$ ). After treatment with D-allose, it could significantly improve neurological dysfunction, reduce cerebral infarction volume ( $P < 0.01$ ), reduce the expression of Gal-3 ( $P < 0.01$ ), inhibit AMPK phosphorylation, promote mTOR phosphorylation, and inhibit autophagy ( $P < 0.01$ ). The use of the Gal-3 inhibitor MCP alone could also achieve the effect of inhibiting autophagy. **Conclusion** D-allose can effectively promote the recovery of neurological function and reduce the volume of infarct foci in CIRI mice. The mechanism may involve inhibiting excessive cell autophagy by downregulating the expression of Gal-3, and reducing the release of inflammatory factors such as TNF- $\alpha$  and IL-8, thereby exerting neuroprotective effects.

**Key words** cerebral ischemia reperfusion injury; D-allose; Galectin-3; autophagy; AMPK/mTOR signaling pathway