

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.05.004

SIRT3 在氧糖剥夺再灌注损伤小鼠神经元中的表达及意义 *

王元欣^{1,2} 张 磊¹ 岳康异¹ 黑 悦¹ 鱼 洋¹ 武秀权¹ 蒋晓帆^{1Δ}

(1 第四军医大学西京医院神经外科 陕西 西安 710032; 2 扶风县人民医院神经外科 陕西 宝鸡 722200)

摘要 目的:通过建立体外脑缺血模型,探讨沉默信息因子 3(SIRT3)在小鼠皮层神经元氧糖剥夺再灌注(OGD/R)损伤后的表达和意义。**方法:**C57BL/6J 小鼠皮层神经元原代培养 7 天后,以氧糖剥夺不同时长(2 h、4 h、6 h、8 h)再灌注 24 h 作为观察时间点,利用细胞增殖-毒性检测试剂盒(Cell Counting Kit-8, CCK-8)检测细胞活力;小鼠乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒检测 LDH 释放;蛋白印迹法(Western blot WB)观察微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3-II)、活化凋亡蛋白 3(Cleaved caspase-3)、以及 SIRT3 的表达变化;免疫荧光下进一步观察 LC3-II、SIRT3 表达。**结果:**与正常组比,随着氧糖剥夺时间的延长,LDH 释放量呈台阶式升高($P < 0.01$),而神经元活性进展性下降($P < 0.01$);蛋白印迹结果发现在缺血损伤后 LC3-II 整体上调,并于 OGD 4h 达峰值,SIRT3 分子表达趋势与 LC3-II 相似均呈抛物线状,而 Cleaved caspase-3 整体上调;相应的,细胞免疫荧光结果显示缺血损伤后神经元胞体和突起中 LC3 呈点状高表达,与此同时 SIRT3 荧光强度亦增高。**结论:**神经元缺血时间越长损伤越重;LC3-II 和 SIRT3 表达呈现相似性;SIRT3 可能通过调控线粒体自噬参与了拮抗神经元缺血损伤的作用。

关键词:SIRT3; LC3; Cleaved caspase-3; 自噬; 凋亡

中图分类号:R-33; R743 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)05-817-05

The Expression and Significance of SIRT3 in Mouse Cortical Neurons after Oxygen - glucose Deprivation/Reperfusion*

WANG Yuan-xin^{1,2}, ZHANG Lei¹, YUE Kang-yi¹, HEI Yue¹, YU Yang¹, WU Xiu-quan¹, JIANG Xiao-fan^{1Δ}

(1 Department of Neurosurgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Department of Neurosurgery, Fufeng County People's Hospital, Baoji, Shaanxi, 722200, China)

ABSTRACT Objective: To verify the expression and significance of silent information regulator 3 (SIRT3) in cerebral ischaemia using the oxygen glucose deprivation/reperfusion (OGD/R) model in vitro. **Methods:** Primary cultured cortical neurons from C57BL/6J exposed to oxygen-glucose deprivation for 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, and followed by 24 h of reperfusion. Additionally, the cell viability was detected by Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay, the cytotoxicity was measured by LDH kit assay, the expression of LC3-II, cleaved caspase-3 and SIRT3 was determined by western blot and the levels of LC3-II and SIRT3 were further assayed by immunofluorescence. **Results:** The results showed that there was a time-dependent increase of LDH release and decrease of cell viability ($P < 0.01$). The results of Western blot demonstrated that LC3-II and SIRT3 increased and peaked at OGD 4h while the expression of Cleaved caspase-3 was elevated all the time. The results of immunofluorescence indicated that LC3-II and SIRT3 were significantly expressed in somas and neurites compared with the control. **Conclusion:** We observed that the expression of LC3 and SIRT3 changes in a similar pattern through a OGD/R model. Hence, SIRT3 might protects neurons against ischemic injury via regulating autophagy.

Key words: SIRT3; LC3-II; Cleaved caspase-3; Autophagy; Apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R743 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)05-817-05

前言

缺血性脑卒中(Ischemic Stroke IS)是目前我国的高发疾病,给社会和家庭带来沉重的负担。目前研究认为导致神经细胞损伤的主要机制有:自由基损伤、凋亡信号激活、炎症反应、钙离子超载等^[1,2]。但针对这些机制的治疗,均未达到预期的治疗效果^[3]。因此,我们不得不重新审视缺血性脑卒中背后的核心机制。神经元能量代谢活跃,含有大量线粒体,其功能正常依赖

于线粒体功能的稳定^[4]。SIRT3 是一类烟酰胺腺嘌呤二核苷酸依赖的组蛋白/非组蛋白去乙酰化酶之一,定位于线粒体,在肝脏、心肌、肾脏等高表达^[5]。参与能量代谢、细胞凋亡、生存信号通路的关键环节^[6-8]。研究表明 SIRT3 在老年性心肌反应性肥大、肿瘤及衰老等相关疾病中发挥保护作用^[8,9]。然而,SIRT3 在缺血性脑卒中中如何发挥作用及其机制,目前尚未得到明确肯定。本研究通过培养原代小鼠皮层神经元,采用氧糖剥夺再灌注损伤模型^[10],模拟缺血性脑卒中,研究 SIRT3 分子在脑缺血

* 基金项目:国家自然科学基金项目(8167050366)

作者简介:王元欣(1984-),硕士,主治医师,研究方向:缺血性脑卒中脑保护,E-mail: 284299419@qq.com

Δ 通讯作者:蒋晓帆,教授,主任医师,研究方向:脑损伤分子机制研究,E-mail: jiangxiaofan@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2017-09-21 接受日期:2017-10-18)

性损伤中的时空表达及意义。

1 材料和方法

1.1 主要设备和材料

二氧化碳(CO₂) 培养箱、厌氧培养箱购自于美国 Thermo; 怀孕 15-16 天的 C57BL/6J 孕鼠购自于第四军医大学动物中心; 兔源 LC3B 一抗、兔源 SIRT3 一抗、兔源β-Actin 一抗由美国 Abcam 提供, 兔源 Cleaved caspase-3 由美国 CST 提供, 山羊抗兔 IgG/ 辣根酶标记由中杉金桥提供; Neurobasal 培养基和 B27 神经元培养添加剂(NB 培养基)由 Gibco 提供; 多聚赖氨酸(Poly-L-Lysine, PLL)由美国 Sigma 提供。CCK-8 试剂盒由武汉博士德生物工程有限公司提供; 小鼠乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒由上海西唐生物科技有限公司提供。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 原代神经元培养 将孕 15~16 d 的 C57BL/6J 孕鼠颈椎脱臼处死, 75%酒精消毒后, 取出胎鼠, 快速在显微镜下剥离出大脑皮层, 剪碎后用 0.25 g/L 不含 EDTA 胰蛋白酶置于 37 °C 孵箱消化 20 min。弃去消化液, 加入含 20%胎牛血清的改良 Eagle 培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)终止消化。用玻璃滴管来回洗涤, 并轻轻吹打, 静置 5 min 后取上层培养液, 用血球计数板计数。接种于用 50 μg/mL PLL 包被过夜的 6 孔、96 孔塑料培养板中, 4~6 h 后全量换 NB 培养基, 2~3 d 半量换液, 待 7 d 后神经元成熟做相应处理。

1.2.2 体外培养神经元缺血再灌注损伤的制作及分组 待神经元成熟后, 对照组不做任何处理, 其它各组换成无糖 DMEM 培养基, 分别放置于 37 °C、95 %氮气、5 % CO₂ 孵箱内 2 h、4 h、6 h、8 h, 再更换 NB 培养基正常培养 24 h。

1.2.3 CCK-8 细胞活力测定 将原代神经元接种于 96 孔板中, 同体外培养神经元缺血再灌注损伤的制作、处理及分组, 加入 10 μL CCK-8 溶液后孵育 1-4 h 后酶标仪 450 nm 下测吸光度(optical density, OD), 实验重复 3 次。

1.2.4 LDH 释放检测 取 5 组细胞培养液, 利用 LDH 检测试

剂盒和酶标仪测定 LDH, 波长 490 nm。按照说明书, 以标准品 2000、1000、500、250、125、62.5、31.2、0 U/L 为横坐标, OD 值为纵坐标, 作出标准曲线。根据样品 OD 值在该曲线图上查出相应 LDH 含量。

1.2.5 WB 检测 LC3-II、Cleaved caspase-3、SIRT3 蛋白水平变化 收集各组处理过的神经元, 弃去培养皿中 NB 培养基, 用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)清洗后, 蛋白裂解液冰上裂解 15 min 后 4 °C 12000 rpm 离心 30 min。收集上清蛋白液, 采用 BCA 法定量, 12 %聚丙烯酰胺凝胶电泳, 分离蛋白后转移到硝酸纤维素膜上, 与 LC3-II (1: 3000)、Cleaved caspase-3 (1: 500)、SIRT3 (1: 400)、β-Actin (1: 3000) 抗体结合, 然后与辣根过氧化物酶标记的二抗结合, 显色压片后使用 Gel-Pro analyzer 软件进行图像分析。以目的蛋白与β-actin 的蛋白产物条带灰度值之比作为其蛋白水平的相对量。

1.2.6 免疫荧光检测 LC3、SIRT3 表达 4%多聚甲醛室温固定 20 min 后, PBS 洗涤 3 遍晾干, 固定于载玻片, 疏水笔画圈, 驴血清封闭 1 h, 加入一抗抗体(SIRT3 1:200)、4 °C 过夜, PBS 洗涤 3 遍, 加入驴抗兔荧光二抗抗体(1:1000)室温孵育 3 h, PBS 洗涤 3 遍, Hoechst 染料染核 5 min, PBS 洗涤 3 遍, 抗荧光淬灭剂封片后在荧光显微镜观察、拍片。

1.3 统计学分析

应用 Graphpad prism 5 软件及绘图软件对数据进行处理。连续变量以均数± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 各组间采用单因素方差分析进行统计学分析, 以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CCK-8 细胞活力测定和 LDH 释放检测

CCK-8 检测结果显示, 随着 OGD/R 损伤时间的延长, 可造成细胞活性呈进展性下降趋势, 各组间存在显著统计学差异(P<0.01, 图 1A)。而 LDH 值检测结果显示, 损伤时间的延长, LDH 量呈阶梯式升高, 各组间存在显著统计学差异(P<0.01, 图 1B)。

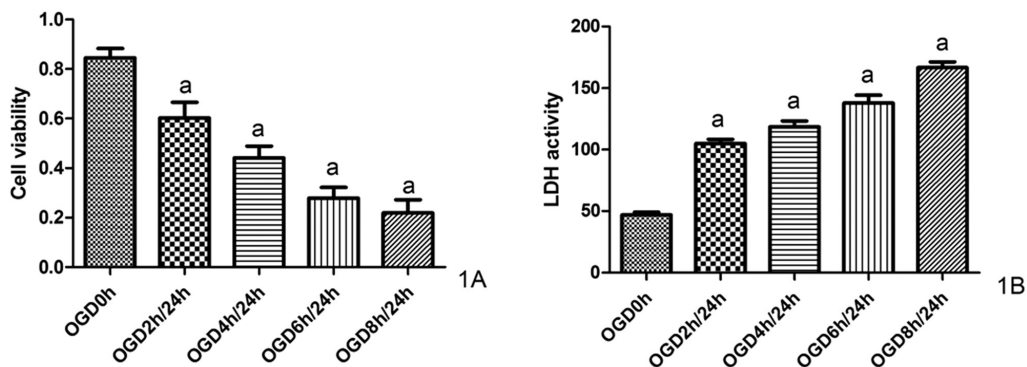


图 1 OGD/R 损伤对小鼠皮层神经元活性的影响和 LDH 释放检测

Fig.1 Effect of OGD/R treatment on mouse cortical neurons viability and LDH release detection

Note: A: neurons viability (* P<0.01 vs OGD0h). B: LDH activity (* P<0.01 vs OGD0h).

2.2 WB 检测 OGD/R 后神经元 LC3-II、Cleaved caspase-3、SIRT3 相对表达

根据 WB 结果提示, 在不同时长 OGD/R 后, LC3-II/LC3-I 较对照组均有所增高, 在 OGD4h/R24h 组达到高峰, 之后表达

下降(P<0.05), OGD8h/R24 组与正常组比较, 无显著统计学差异(见图 3A)。Cleaved caspase-3 在损伤发生后升高显著, 在 OGD4h/R24h 组之前与 LC3-II 表达趋势一致, 随后表达进入平台期, 但仍逐步增强(P<0.01, 见图 3B)。SIRT3 在各组损伤后,

表达较对照组均有增高,OGD4h/R24 h 与正常组比较有显著差异(见图 3C)。异 ($P<0.01$),OGD6h/R24 h 组和 OGD8h/R24 h 组较正常组无

表 1 各组神经元细胞活性和 LDH 释放量的比较($\bar{x} \pm s$)Table 1 The neurons viability by cck-8 and LDH activity in each group($\bar{x} \pm s$)

Group	neurons viability(OD Value, n=7)	LDH activity(n=3)
ODG0h	0.85± 0.04	46.96± 2.31
OGD2h/R24h	0.60± 0.06 ^a	105.1± 3.41 ^a
OGD4h/R24h	0.44± 0.05 ^a	118.6± 4.61 ^a
OGD6h/R24h	0.28± 0.04 ^a	138.0± 6.26 ^a
OGD8/R24h	0.22± 0.05 ^a	166.7± 4.62 ^a

注:与 OGD0h 组比较 ^a $P<0.01$ 。

Note: Compared with OGD0h ^a $P<0.01$.

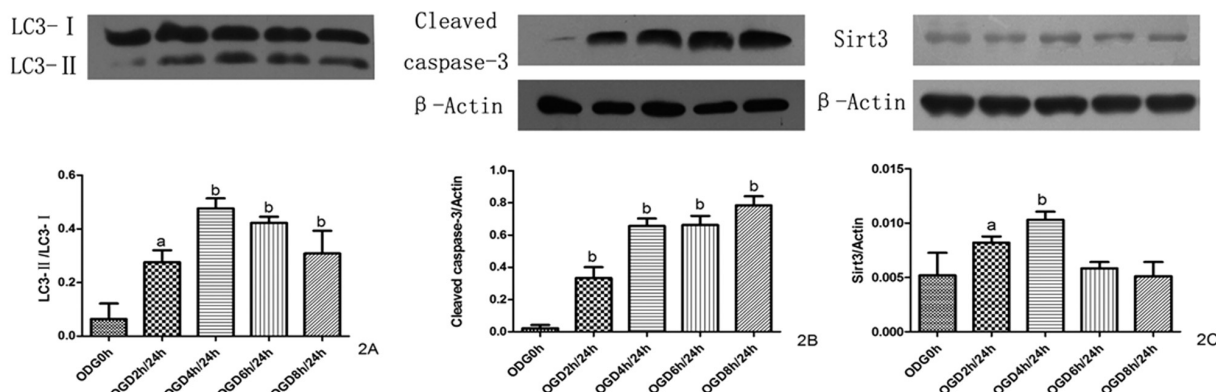


图 2 WB 法检测氧 OGD/R 后不同时间点 LC3-II、Cleaved caspase-3、SIRT3 相对表达量

Fig.2 The relative expression of LC3-II, Cleaved caspase-3 and SIRT3 at different time points after OGD/R treat detected by WB

Note: A: Statistical representation for the expression of LC3-II(^a $P<0.05$ vs OGD0h, ^b $P<0.01$ vs OGD0h).B: Statistical representation for the expression of Cleaved caspase-3 (^b $P<0.01$ vs OGD0h). C: Statistical representation for the expression of SIRT3(^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs OGD0h).

表 2 各组神经元细胞 LC3-II、Cleaved caspase-3、SIRT3 的相对表达变化($\bar{x} \pm s$)

Table 2 The relative expression of LC3-II, Cleaved caspase-3 and SIRT3 in each group

Group	LC3-II/LC3-I	Cleaved caspase-3/Actin	SIRT3/Actin
ODG0h	0.06± 0.06	0.02± 0.02	0.005± 0.0200
OGD2h/R24h	0.28± 0.05 ^a	0.33± 0.07 ^b	0.008± 0.0005 ^a
OGD4h/R24h	0.48± 0.04 ^b	0.66± 0.05 ^b	0.010± 0.0007 ^b
OGD6h/R24h	0.42± 0.02 ^b	0.66± 0.06 ^b	0.006± 0.0006
OGD8/R24h	0.31± 0.08 ^b	0.78± 0.06 ^b	0.005± 0.0013

注:与 OGD0h 组比较 ^a $P<0.05$ vs OGD0h, ^b $P<0.01$ vs OGD0h。

Note: Compared with OGD0h ^a $P<0.01$, ^b $P<0.01$ vs OGD0h.

2.3 荧光免疫组化检测 LC3-II、SIRT3 表达的结果

LC3-II 在正常神经元细胞膜、包浆及突起均匀分布, OGD4h/R24h 后正常细胞结构改变,荧光强度增加,可见大量散在红色强点,OGD8h/R24h 后包浆结构消失,荧光强度减弱,红色强点减少。SIRT3 定位于线粒体,正常神经元中荧光强度(+),OGD4h/R24h 后细胞荧光强度增加(++),OGD8h/R24h 后包浆结构消失,荧光强度亦相对减弱(+).Hoechst 染色,正常细胞核为蓝色、均质、圆满。ODG4h/R24h 后,部分核固缩,表现为亮蓝。OGD8h/R24h 后可见大量亮蓝色细胞核固缩,部分可见凋亡小体。

3 讨论

自噬、凋亡、坏死的动态过程一直近年来关注的焦点^[1]。在神经元缺血再灌注损伤中,脑组织血供受阻,脑组织开始出现不可逆坏死,而这时适度自噬会清除受损和无功能的细胞器,以维持神经元稳态和内环境。有研究认为凋亡与自噬可以相互转化,因此如何从凋亡程序转化为自噬程序,是修复神经元的关键^[2]。因此本研究分别给予小鼠原代皮层神经元缺氧剥夺 2 h、4 h、6 h、8 h 再灌注 24 h,以模拟神经元不同程度缺血缺氧损伤,探讨自噬、凋亡分子和 SIRT3 的时间和空间的表达关系。

研究表明,SIRT3 可通过调节反应性活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的产生发挥抗氧化作用^[9]。细胞中 ROS 主要来源于线粒体,SIRT3 是线粒体 ROS 的重要调节分子。而 ROS 是

脑缺血再灌注损伤的重要因素。基于这些,我们认为,SIRT3 参与了整个缺血性脑卒中的病理生理过程,是能量代谢和线粒体功能的关键靶点分子之一。

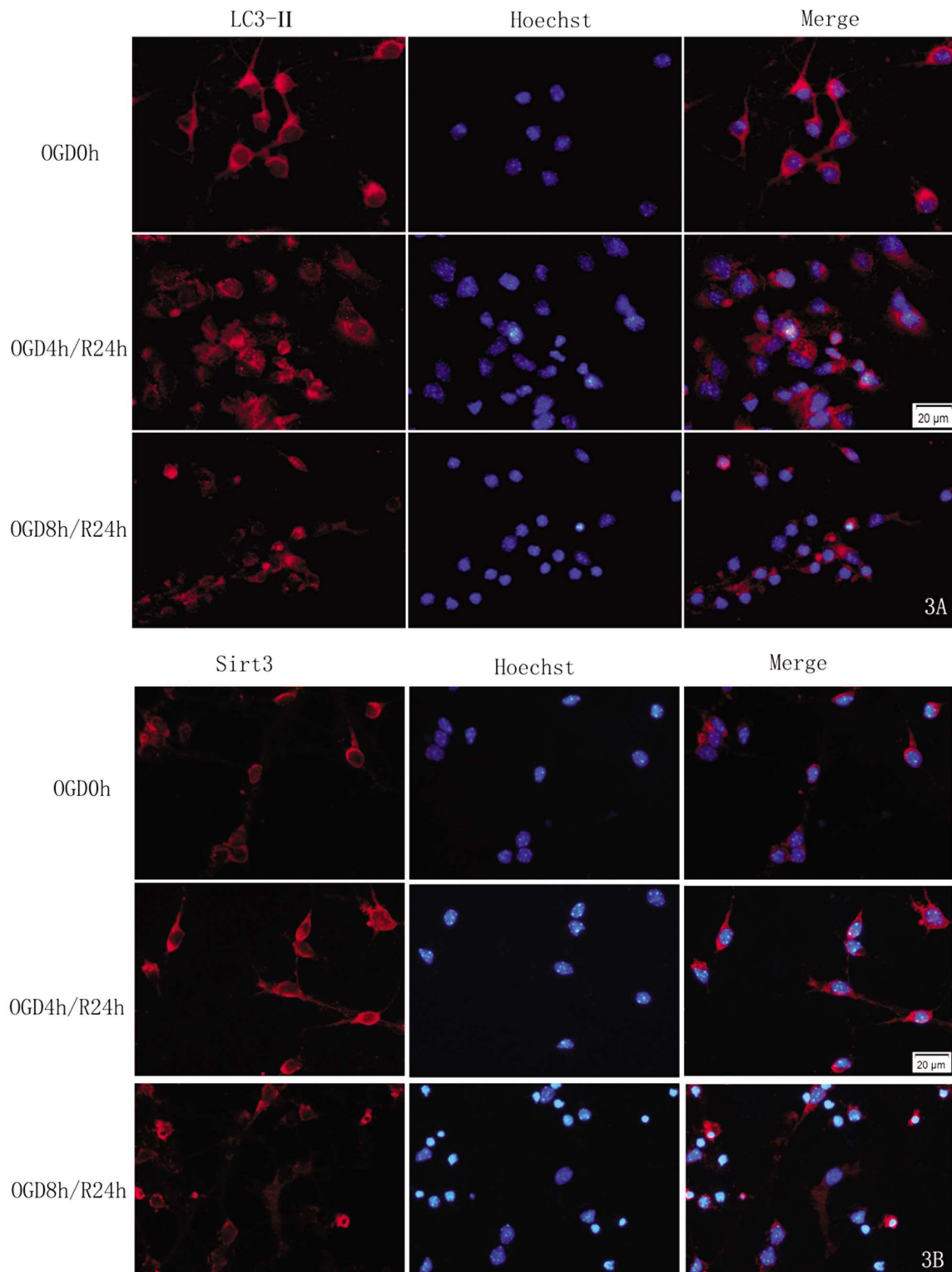


图3 荧光显微镜检测 LC3-II、SIRT3 的表达($\times 400$)

Fig.3 LC3-II and SIRT3 in OGD/R treated mouse cortical neurons during different time detected by immunofluorescence microscopy ($\times 400$)

本实验结果初步表明,在神经元 OGD/R 后,细胞随着损伤时间延长,细胞存活率下降,LDH 漏出率升高,差异非常显著。WB 结果表明,LC3-II 和 SIRT3 在缺血损伤后表达量逐渐上升,自噬被激活,在 4 小时达到峰值后随着时间的延长有所下

降,但整体仍高于正常对照组。作为自噬的标志分子,LC3- II 的表达的高低与发生自噬的程度成正比,显然 SIRT3 在自噬表达最高时其表达量亦最高。caspase-3 被认为是细胞发生凋亡时最终的效应分子,Cleaved caspase-3 表达水平反应了细胞的凋亡

状况^[13]。我们的 WB 结果提示, Cleaved caspase-3 蛋白表达在缺血损伤开始即出现明显增高, 在 OGD4 h/R24 h 以后出现平台期, 但表达仍逐渐增高。通过对细胞免疫荧光结果观察, 神经元在 OGD4 h/R24 h 有明显的自噬形态学改变, 即自噬标志分子 LC3-II 呈点状高荧光表达。而 SIRT3 亦在 OGD4 h/R24 h 时神经元胞质表达增高, 在 OGD8 h/R24 h 时表达降低, 与 LC3-II 表达趋势相似。在早期氧糖剥夺 / 再灌注应激情况下, 细胞会启动自噬机制来清除受损线粒体, 这时自噬足以避免大量凋亡因子释放进入胞质, 对细胞起到一定保护作用。而在氧糖剥夺 / 再灌注应激后期, 自噬相对降低, 而凋亡进一步增高, 细胞存活率降低, 表明神经元已进入不可逆转坏死阶段。所以, 我们认为, 缺血性脑卒中发生后, 时间窗亦是紧急救治的关键, 4 h 以内是进行半暗带神经元修复治疗的重点^[14]。在整个缺血缺氧 / 再灌注损伤中, SIRT3 表达伴随着 LC3-II 增高, 表明其参与了小鼠皮层神经元氧糖剥夺模型再灌注整个过程。

常泽明^[15]等通过动物模型研究认为, SIRT3 可能参与脑缺血再灌注损伤过程, 在大脑皮层内的表达随再灌注时间成抛物线改变。这也说明在体动物实验与我们的离体实验结果大致吻合。最新研究表明, 上调 SIRT3 表达, 可通过 Foxo3 激活线粒体自噬相关分子, 从而抑制血管内皮细胞的凋亡^[16,17]。研究显示白藜芦醇可改善脑缺血损伤, 起到神经元保护作用^[18,19], 而白藜芦醇可诱导 SIRT3 增高^[20], 且上调 SIRT3 可改善细胞存活率^[21]。这些结果进一步提示 SIRT3 作为线粒体能量代谢的关键分子, 可能在脑缺血再灌注中发挥重要的脑保护作用。

由此可见, 作为神经元 " 能量工厂 " 的线粒体, 其 SIRT3 可作为脑卒中后潜在干预靶点, 有待于我们进一步去研究。

参考文献(References)

- [1] Chavez J C, Hurko O, Barone F C, et al. Pharmacologic Interventions for Stroke: Looking Beyond the Thrombolysis Time Window Into the Penumbra With Biomarkers, Not a Stopwatch [J]. *Stroke*, 2009, 40 (10): e558-e563
- [2] Griessenauer C J, Fleming J B, Richards B F, et al. Timing and mechanism of ischemic stroke due to extracranial blunt traumatic cerebrovascular injury[J]. *J Neurosurg*, 2013, 118(2): 397-404
- [3] Amaro S, Chamorro A. Translational stroke research of the combination of thrombolysis and antioxidant therapy[J]. *Stroke*, 2011, 42(5): 1495-1499
- [4] Rugarli E I, Langer T. Mitochondrial quality control: a matter of life and death for neurons[J]. *EMBO J*, 2012, 31(6): 1336-1349
- [5] Onyango P, Celic I, McCaffery J M, et al. SIRT3, a human SIR2 homologue, is an NAD-dependent deacetylase localized to mitochondria [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(21): 13653-13658
- [6] Bell E L, Guarente L. The SirT3 divining rod points to oxidative stress [J]. *Mol Cell*, 2011, 42(5): 561-568
- [7] Finley L W, Carracedo A, Lee J, et al. SIRT3 opposes reprogramming of cancer cell metabolism through HIF1 α destabilization[J]. *Cancer Cell*, 2011, 19(3): 416-428
- [8] Albani D, Polito L, Forloni G. Sirtuins as Novel Targets for Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders: Experimental and Genetic Evidence [J]. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2010, 19(1): 11-26
- [9] Polito L, Kehoe P G, Forloni G, et al. The molecular genetics of sirtuins: association with human longevity and age-related diseases[J]. *Int J Mol Epidemiol Genet*, 2010, 1(3): 214-225
- [10] Zhang L, Zhang D, Zhao X, et al. Sevoflurane pre-conditioning increases phosphorylation of Erk1/2 and HO-1 expression via inhibition of mPTP in primary rat cortical neurons exposed to OGD/R[J]. *Journal of the Neurological Sciences*, 2017, 372: 171-177
- [11] Lalaoui N, Lindqvist L M, Sandow J J, et al. The molecular relationships between apoptosis, autophagy and necroptosis [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, 39: 63-69
- [12] Chen H, Tang B, Qu Y, et al. Progress and extensive meaning of mammalian target of rapamycin involved in restoration of nervous system injury[J]. *Zhongguo Xue Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, 2012, 26(5): 625-630
- [13] Lavrik I N, Golks A, Krammer P H. Caspases: pharmacological manipulation of cell death[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(10): 2665-2672
- [14] Green D R, Oguin T H, Martinez J. The clearance of dying cells: table for two[J]. *Cell Death Differ*, 2016, 23(6): 915
- [15] 常明则, 吴海琴, 乔琳, 等. 脑缺血再灌注后大鼠运动皮质 SIRT_3 的表达特点[J]. *陕西医学杂志*, 2014, (05): 526-528
- [16] Chang Ming-ze, Wu Hain-qin, Qiao Lin, et al. Expression of SIRT3 in the cerebral motor cortex of rats following cerebral ischemic reperfusion[J]. *Shaanxi Medicine Journal*, 2014, (05): 526-528
- [17] Das S, Mitrovsky G, Vasanthi H R, et al. Antiaging properties of a grape-derived antioxidant are regulated by mitochondrial balance of fusion and fission leading to mitophagy triggered by a signaling network of Sirt1-Sirt3-Foxo3-PINK1-PARKIN [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 2014: 345105
- [18] Luo X, Yang Z, Zheng S, Cao, et al. Retracted: Sirt3 activation attenuated oxidized low-density lipoprotein-induced human umbilical vein endothelial cells' apoptosis by sustaining autophagy [J]. *Cell Biol Int*, 2017, 41(8): 932
- [19] Cheng G, Zhang X, Gao D, et al. Resveratrol inhibits MMP-9 expression by up-regulating PPAR α expression in an oxygen glucose deprivation-exposed neuron model [J]. *Neuroscience Letters*, 2009, 451(2): 105-108
- [20] Dong W, Li N, Gao D, et al. Resveratrol attenuates ischemic brain damage in the delayed phase after stroke and induces messenger RNA and protein expression for angiogenic factors [J]. *Journal of vascular surgery*, 2008, 48(3): 709-714
- [21] Tauriainen E, Luostarinen M, Martonen E, et al. Distinct effects of calorie restriction and resveratrol on diet-induced obesity and fatty liver formation [J]. *Journal of nutrition and metabolism*, 2011, 2011: 525094
- [22] Kim S H, Lu H F, Alano C C. Neuronal Sirt3 Protects against Excitotoxic Injury in Mouse Cortical Neuron Culture [J]. *Plos one*, 2011, 6 (e147313)