

## 研究论文

# 急性脑缺血诱导的Sirt3蛋白表达下调通过破坏线粒体功能导致神经元损伤

范佳慧<sup>1</sup>, 宋慧萌<sup>1</sup>, 张霞<sup>2</sup>, 闫伟杰<sup>1</sup>, 韩松<sup>1</sup>, 尹艳玲<sup>1,\*</sup>

首都医科大学基础医学院<sup>1</sup>神经生物学系; <sup>2</sup>生理学与病理生理学系, 教育部神经退行性疾病重点实验室, 北京 100069

**摘要:** 本文旨在观察急性脑缺血对神经元沉默信息调节因子2相关酶类3 (silent mating type information regulator 2 homolog 3, Sirt3)蛋白表达水平的影响, 并阐明Sirt3在急性脑缺血中的病理意义。建立小鼠大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)和Wistar大鼠原代培养海马神经元氧糖剥夺(oxygen glucose deprivation, OGD)模型, 用Western blot检测Sirt3蛋白表达水平, 用携带Sirt3的慢病毒感染海马神经元后, 用CCK8试剂盒检测细胞存活率, 用免疫荧光染色法检测海马神经元线粒体功能, 用透射电子显微镜检测线粒体自噬情况。结果显示, 与常氧组相比, OGD1 h/复氧2 h (R2 h)和OGD1 h/R12 h组海马神经元Sirt3蛋白表达水平均显著下调; 与对侧正常脑组织相比, MCAO1 h/再灌注24 h (R24 h)和MCAO1 h/R72 h组小鼠大脑损伤侧半影区Sirt3蛋白表达水平均显著下调, 而假手术组两侧Sirt3蛋白表达水平之间无显著差异。OGD1 h/R12 h处理损伤海马神经元线粒体功能, 激活线粒体自噬, 降低细胞存活率, 而Sirt3过表达可减轻OGD1 h/R12 h对海马神经元的上述损伤作用。以上结果提示, 急性脑缺血后Sirt3蛋白表达下调可通过破坏线粒体功能稳态影响神经元存活, 纠正Sirt3蛋白可减轻急性脑缺血造成的损伤, 这可为防治缺血性脑卒中提供新思路。

**关键词:** Sirt3; 线粒体; 急性脑缺血; 大脑中动脉阻塞; 氧糖剥夺; 海马神经元

**中图分类号:** R338

## Acute cerebral ischemia-induced down-regulation of Sirt3 protein expression contributes to neuronal injury via damaging mitochondrial function

FAN Jia-Hui<sup>1</sup>, SONG Hui-Meng<sup>1</sup>, ZHANG Xia<sup>2</sup>, YAN Wei-Jie<sup>1</sup>, HAN Song<sup>1</sup>, YIN Yan-Ling<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Neurobiology; <sup>2</sup>Department of Physiology and Pathophysiology, Key Laboratory of Neurodegenerative Diseases of Ministry of Education, School of Basic Medical Sciences, Capital Medical University, Beijing 100069, China

**Abstract:** This study was aimed to determine the effect of acute cerebral ischemia on the protein expression level of silent mating type information regulator 2 homolog 3 (Sirt3) in the neurons and clarify the pathological role of Sirt3 in acute cerebral ischemia. The mice with middle cerebral artery occlusion (MCAO) and primary cultured rat hippocampal neurons with oxygen glucose deprivation (OGD) were used as acute cerebral ischemia models *in vivo* and *in vitro*, respectively. Sirt3 overexpression was induced in rat hippocampal neurons by lentivirus transfection. Western blot was utilized to measure the changes in Sirt3 protein expression level. CCK8 assay was used to detect cell viability. Immunofluorescent staining was used to detect mitochondrial function. Transmission electron microscope was used to detect mitochondrial autophagy. The results showed that, compared with the normoxia group, hippocampal neurons from OGD1 h/reoxygenation 2 h (R2 h) and OGD1 h/R12 h groups exhibited down-regulated Sirt3 protein expression levels. Compared with contralateral normal brain tissue, the ipsilateral penumbra region from MCAO1 h/reperfusion 24 h (R24 h) and MCAO1 h/R72 h groups exhibited down-regulated Sirt3 protein expression levels, while there was no significant difference between the Sirt3 protein levels on both sides of sham group. OGD1 h/R12 h treatment damaged mitochondrial function, activated mitochondrial

Received 2020-04-02 Accepted 2020-09-18

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31771292 and 31571162) and the Beijing Natural Science Foundation, China (No. 7202006).

\*Corresponding author. E-mail: yyling@ccmu.edu.cn

autophagy and reduced cell viability in hippocampal neurons, whereas Sirt3 over-expression attenuated the above damage effects of OGD1 h/R12 h treatment. These results suggest that acute cerebral ischemia results in a decrease in Sirt3 protein level. Sirt3 over-expression can alleviate acute cerebral ischemia-induced neural injuries by improving the mitochondrial function. The current study sheds light on a novel strategy against neural injuries caused by acute cerebral ischemia.

**Key words:** Sirt3; mitochondria; acute cerebral ischemia; middle cerebral artery occlusion; oxygen glucose deprivation; hippocampal neurons

缺血性脑卒中中以脑部缺血损伤症状为主要临床表现, 发病急, 且具有高致死率和致残率, 给人类健康和生命造成极大威胁<sup>[1]</sup>。研究显示, 采用溶血栓药物干预虽然可将卒中治疗时间窗扩大到发病后 4.5 h, 但目前仍缺乏有效的治疗措施<sup>[2, 3]</sup>。因此, 寻找急性卒中后的高效靶标是改善卒中长期预后的研究重点。现有研究表明, 脑卒中会触发复杂的细胞生化反应, 并最终导致缺血性脑卒中部位的神经元急性坏死、程序性坏死(坏死性坏死)、细胞凋亡和自噬<sup>[4, 5]</sup>。然而, 迄今为止, 脑卒中诱发的细胞死亡和神经功能障碍的确切机制尚不清楚, 阐明神经细胞死亡的细胞和分子机制将提供有效的分子靶标, 有助于脑卒中神经保护药物的研发。

Sirtuin 是高度保守的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD<sup>+</sup>) 依赖性 III 类组蛋白脱乙酰基酶, 可催化多种非组蛋白的脱乙酰基和 ADP 核糖基化<sup>[6]</sup>。由于其活性需要 NAD<sup>+</sup>, 因此 Sirtuin 水平代表细胞的氧化还原状态, 是公认的代谢应激传感器。在哺乳动物中已鉴定出 7 个 Sirtuin 同源物, 其中沉默信息调节因子 2 相关酶类 3 (silent mating type information regulator 2 homolog 3, Sirt3) 是一种依赖 NAD<sup>+</sup> 的 III 类脱乙酰基酶, 主要定位于线粒体中, 广泛分布于心脏、肾脏、脑及肝脏等富含线粒体的器官中, 其可对非组蛋白和组蛋白去乙酰化, 研究表明其在调控细胞寿命、细胞代谢、细胞周期及细胞凋亡等方面发挥重要的作用<sup>[7]</sup>。与此同时, 研究表明 Sirt3 在心肌缺血和神经退行性疾病中具有保护作用<sup>[8]</sup>, Sirt3 通过去乙酰化相关靶蛋白(如超氧化物歧化酶、亲环蛋白 D)上调 NAD<sup>+</sup> 水平, 改善线粒体功能, 抵抗氧化应激反应, 改善血管内皮细胞功能等, 在多种心血管疾病中起到了保护性作用<sup>[9]</sup>。Sirt3 激活剂 adjudin 可通过增加 FOXO3a 活性和抑制 Notch1 信号通路减弱脂多糖引起的神经症状, 抑制脑卒中急性期的神经炎症, 减少脑梗死体积和改善神经功能<sup>[10]</sup>。但目前对 Sirt3 蛋白的病理生理学功能报道之间存在矛盾, 有

研究指出 Sirt3 是自噬的负调节剂, 其被 SFA 激活会引起肝细胞的脂毒性<sup>[11]</sup>。也有研究显示, 在过表达 Sirt3 的细胞中, 突变体 p53 的泛素化升高, 表明 Sirt3 影响了泛素化介导的蛋白质降解<sup>[12]</sup>。目前对 Sirt3 在慢性脑卒中的作用及其机制尚不清楚, 限制了以 Sirt3 为靶点的治疗策略的推广。

自噬是一种进化保守的过程, 是指细胞成分被吞噬到双层膜的自噬体中, 随后被递送到溶酶体中进行降解。而线粒体自噬是一种特殊的降解受损线粒体的选择性自噬, 对维持线粒体功能和减少细胞死亡至关重要。脑需要大量的能量来维持神经元的正常功能, 因此富含线粒体。线粒体自噬保证了线粒体维持神经元细胞的正常功能, 并通过多种信号通路在缺血性损伤的进展中发挥重要作用。因此, 探索线粒体自噬在神经元中的调控作用可进一步为靶向调节线粒体自噬提供理论和实践依据。

Zhang 等<sup>[13]</sup> 研究显示, 在缺血性损伤中 Sirt3 蛋白可通过参与自噬过程发挥保护性作用, 因 Sirt3 蛋白主要位于线粒体上, 所以其可能通过调节线粒体功能参与疾病过程。Wu 等<sup>[14]</sup> 研究显示, Sirt3 通过激活线粒体自噬清除受损线粒体在缺血模型中发挥保护性作用。在肝缺血再灌注损伤中, Sirt3 激活 ERK-CREB 信号通路, ERK-CREB 信号通路可上调 bnip3 介导的线粒体自噬, 从而减轻线粒体损伤, 抑制线粒体依赖的肝细胞凋亡<sup>[15]</sup>。此外, 在神经退行性疾病(如阿尔茨海默病和帕金森氏病)中, 受损的异常线粒体会促进神经元损伤<sup>[16]</sup>; 在缺血性脑损伤中 AMPK-mTOR 通路参与了 Sirt3 诱导的神经保护作用<sup>[17]</sup>。Sirt3 主要调节线粒体蛋白乙酰化水平, 从而调控线粒体的相关功能。线粒体质量控制方式包括裂变与融合, 可造成线粒体生成和自噬降解, 线粒体质量控制过程的异常均可导致线粒体功能障碍和细胞死亡<sup>[18]</sup>。自噬在细胞缺血再灌注中的作用可能是通过线粒体自噬调控影响其下游的凋亡通路<sup>[19]</sup>。而 Sirt3 在缺血再灌注中的作用是否是通过线粒体自噬发挥作用有待我们进一步的研究。

本文旨在明确脑卒中后 Sirt3 蛋白表达水平的变化以及 Sirt3 蛋白对神经元的影响, 采用经典的氧糖剥夺 (oxygen glucose deprivation, OGD) 模型和大脑中动脉阻塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 模型, 从离体和在大体水平上进行研究, 以期对卒中的防治和改善长期预后提供新治疗思路和分子靶标。

## 1 材料与方法

**1.1 材料和试剂** 清洁级新生 Wistar 乳鼠 (雌雄不拘) 和雄性 C57BL/6J 小鼠 (北京维通利华公司提供)。动物实验方案通过首都医科大学伦理委员会审查批准 (伦理编号分别为 AEEI-2018-024, AEEI-2017-099)。兔源抗 Sirt3 抗体 (1:1 000, 5490, Cell Signaling Technology 公司), 兔源抗  $\beta$ -actin 抗体 (1:10 000, 60008-1-Ig, Proteintech 公司), HRP 标记的山羊抗兔 IgG (1:5 000, 7074, Cell Signaling Technology 公司), 0.25% 胰蛋白酶 (25200056, Gibco), 特级马血清 (S9050-200ml, Solarbio), 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, 10100147, Thermo Fisher Scientific 公司), *D*-多聚赖氨酸 (P1149-500MG, Sigma-Aldrich 公司), 无糖 DMEM 培养液 (11966025), 高糖、含丙酮酸 DMEM 培养液 (C11995500 BT)、Neurobasal 培养液 (21103049)、无血清 B27 细胞培养支持物 (17504044) 均购自 Gibco 公司, *L*-谷氨酰胺 (25030081, Invitrogen 公司), 37 °C 恒温培养箱、TMRM (tetramethylrhodamine, methyl ester, perchlorate)、Calcein AM (C34852) 均购自 Thermo Fisher Scientific 公司, TTC (T8877, Sigma Aldrich 公司)。Sirt3 过表达慢病毒和空载体购自武汉枢密脑科学技术有限公司。

**1.2 海马神经元培养和 OGD 模型** 原代培养海马神经元 (取自出生后 24 h 内 Wistar 乳鼠), 将乳鼠置于 HBSS 溶液中, 断头取全脑, 分离出海马, 将取下的海马组织切成约 1 mm<sup>3</sup>, 0.25% 胰蛋白酶 37 °C 消化 15 min, 用含 10% 马血清、10% FBS 和谷氨酰胺的 DMEM 清洗, 加入 DMEM (含 10% 马血清、10% FBS、谷氨酰胺) 轻柔吹打约 10 次后静置 2~3 min, 用 200 目细胞筛过滤后取细胞悬液, 重复 3 次; 种植于 *D*-多聚赖氨酸 (0.1 g/L) 预处理的培养皿中。细胞在常氧 (5% CO<sub>2</sub>、95% O<sub>2</sub> 混合气体)、37 °C 饱和湿度培养箱中培养 4~6 h 后, 换为 Neurobasal 培养基 (含 2% B27 和 2 mmol/L *L*-谷氨

酰胺) 培养, 每 3 d 进行半量换液。细胞培养 8 d 成熟后, 将培养基换为无糖 DMEM 培养基, 置于通有混合气体 (2% O<sub>2</sub> 和 95% N<sub>2</sub>)、37 °C 饱和湿度的培养箱中 1 h (下文以 OGD1 h 标示), 制备细胞缺氧模型; 取出细胞后将无糖培养基换回 Neurobasal 培养基, 常氧 37 °C 饱和湿度培养箱继续培养 (复氧) 2 或 12 h, 制备细胞 OGD 模型 (OGD1 h/R2 h 和 OGD1 h/R12 h 组)<sup>[20]</sup>。常氧组原代海马神经元置于含 5% CO<sub>2</sub>、95% O<sub>2</sub> 混合气体、37 °C 饱和湿度培养箱中培养 8 d 后, 即可用于后续实验。

**1.3 MCAO 模型制备** 成年雄性 C57BL/6J 小鼠麻醉固定, 自颈部行 1 cm 长切口, 暴露右颈总动脉、颈外动脉及颈内动脉, 结扎颈总动脉近心端和颈外动脉远心端; 在颈总动脉上两线结间打一松结, 将线栓从颈外动脉插入颈内动脉进而到达大脑中动脉 (深度约 12.0 mm), 血管阻塞 1 h 后拔出线栓, 缝合皮肤。假手术组只进行手术操作, 不插入线栓。整个手术过程平均 15 min 完成, 术后保持小鼠体温, 自由饮水、进食<sup>[21]</sup>。

**1.4 慢病毒转染** 在原代海马神经元培养至第 5 天时进行慢病毒感染。各组细胞随机用空载体 rLV-CMV-CFP-P2A-Puro-WPRE 或过表达载体 rLV-CMV-Sirt3-CFP-P2A-Puro-WPRE 按感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 1 或 2 感染, 分为常氧空载体组、常氧 Sirt3 过表达组、OGD1 h/R12 h 空载体组和 OGD1 h/R12 h Sirt3 过表达组。加入病毒 24 h 后, 全量换培养基并继续培养神经元。培养至第 8 天, 按 1.2 节方法常氧或 OGD 处理后, 进行后续实验。

**1.5 用 CCK8 试剂盒测量细胞存活率** 为了评估 OGD/R 处理后过表达 Sirt3 对原代海马神经元存活率的影响, 将细胞以 2 × 10<sup>5</sup> 细胞/孔的密度种植在 96 孔板上。OGD/R 处理组在复氧 11 h 时加入 10  $\mu$ L CCK8 溶液, 对照组平行加入 CCK8 溶液, 避光孵育培养板 1 h, 测量 450 nm 处的吸光度, 计算各组细胞存活率。

**1.6 TTC 染色** 通过腹腔内注射 10% 水合氯醛处死动物, 小心剥下脑组织, 将其置于脑片模具的冠状部分, 切成 1 mm 厚的脑片, 然后迅速置于由等渗磷酸盐缓冲溶液配制的 2% TTC 溶液中。染色 10 min 后, 正常脑组织呈玫瑰红色, 梗死的脑组织变白。用扫描仪 (DeskJet 2130 series, HP) 扫描脑切片, 并使用 Image J 软件进行分析。

**1.7 线粒体功能检测** Calcein AM 是一种可对活



细胞进行标记的染色试剂, 它可穿透细胞膜进入细胞内被酯酶剪切形成 Calcein, 以此形式停留在细胞内, 发出强的绿色荧光。TMRM 可测量线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP), 以此反映线粒体功能<sup>[22]</sup>。各组海马神经元用 50 nmol/L TMRM 和 200 nmol/L Calcein AM 37 °C 下恒温避光孵育 30 min, 然后用 HBSS 洗涤。用高内涵仪器 (HCS Studio Cellomics Scan Version 6.4.3, Thermo Scientific) 捕获细胞的实时图像, 对 TMRM 和 Calcein 荧光强度进行定量分析。

**1.8 Western blot 检测** 蛋白样品的制备、SDS-PAGE 和 Western blot 实验步骤参照文献<sup>[23]</sup>。提取原代神经元细胞总蛋白, 取 10~50  $\mu$ g 总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 然后转至 PVDF 膜上。经 10% 脱脂牛奶孵育 1 h 后, 用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。抗 Sirt3 抗体 4 °C 孵育过夜, 抗  $\beta$ -actin 抗体室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次, 每次 10 min。然后山羊抗兔二抗室温孵育 1 h。TBST 洗 3 次, 每次 10 min。用超敏 ECL 化学发光试剂盒 (P10200, 苏州新赛美生物科技有限公司) 发光, 曝片、显影、定影。用  $\beta$ -actin 作为内参蛋白, 计算样品中目标蛋白的相对表达水平。

**1.9 透射电镜观察** 各组细胞样本在 2% 多聚甲醛和 2.5% 戊二醛的混合物中放置 2 h, PB 洗涤 3 次后, 1% 锇酸和 1.5% 铁氰化钾混合物固定 1 h, 1% 乙酸双氧铀室温下染色 1 h, 30%、50%、70%、80% 和 90% 乙醇溶液梯度脱水, EPON812 孵育 8 h 后进行包埋, 60 °C 烤箱中固化 24 h。将聚合的细胞样品切成薄片, 1% 乙酸双氧铀染色 20 min, 柠檬酸铅染色 5 min, 制备 70 nm 厚的超薄切片, 使用 Tecnai Spirit 120 kV 透射电子显微镜 (Thermo Fisher Scientific 公司) 以 80 kV 加速电压获取显微图像, 观察线粒体自噬情况。

**1.10 统计学分析** 数据以 mean  $\pm$  SD 形式表示, 用 GraphPad Prism 6 软件进行统计检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 法,  $P < 0.05$  时认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 离体和在体实验结果均提示急性缺血导致 Sirt3 蛋白表达水平显著下降

结果显示, 相对常氧组, OGD1 h/R2 h 和 OGD1 h/R12 h 组海马神经元内 Sirt3 蛋白表达水平显著

下调 (图 1A)。TTC 染色结果显示, 本研究小鼠 MCAO 模型制备成功, 脑片上红色部分是正常组织, 白色部分是缺血造成的梗死部分 (图 1B)。MCAO1 h/R24 h 和 MCAO1 h/R72 h 处理后, 大脑损伤侧半影区内 Sirt3 蛋白表达水平相对损伤对侧正常脑组织均显著降低, 而假手术组两侧 Sirt3 蛋白表达水平之间无显著差异 (图 1C)。光镜观察结果显示, 与常氧组相比, OGD1 h 和 OGD1h/R12 h 海马神经元的形态有不同程度的损伤, 可见胞体的部分破坏 (图 1D)。

### 2.2 Sirt3 蛋白是维持神经元生存的关键蛋白

上文结果显示急性脑缺血导致 Sirt3 蛋白表达水平显著下调, 但尚需明确 Sirt3 蛋白下调对急性脑缺血后神经元的影响, 因此本研究进一步探讨了 Sirt3 蛋白的生物学作用。采用慢病毒载体携带 Sirt3 过表达质粒转染原代海马神经元, 因为慢病毒转染过程中可能对细胞有损伤, 用空白对照组可能不能说明 Sirt3 的作用, 所以采用空载体组作为对照。Western blot 结果显示, 与 MOI = 1 相比, MOI = 2 时 Sirt3 蛋白过表达效率较高 (图 2A)。

与 OGD1 h/R12 h 空载体组相比, OGD1 h/R12 h Sirt3 过表达组海马神经元存活率显著上调 (图 2B), 提示 Sirt3 蛋白表达水平对神经元存活有显著影响, 急性脑缺血后造成的 Sirt3 蛋白减少可能是缺血致神经元损伤的关键机制之一。

### 2.3 Sirt3 过表达对各组线粒体功能的作用

为观察 Sirt3 减少对线粒体功能的影响, 本研究利用高内涵成像系统观察 TMRM 和 Calcein 荧光水平, 以确定 Sirt3 过表达对急性缺血后神经元线粒体活性的影响。与常氧空载体组相比, OGD1 h/R12 h 空载体组海马神经元 TMRM 和 Calcein 荧光水平均显著降低; 而 Sirt3 过表达可以逆转 OGD1 h/R12 h 处理造成的线粒体功能损伤, 表现为 OGD1 h/R12 h Sirt3 过表达组 Calcein 和 TMRM 的荧光强度相对 OGD1 h/R12 h 空载体组均明显增强, 提示 Sirt3 蛋白通过调节神经元线粒体功能参与神经元活性的维持 (图 3)。

### 2.4 Sirt3 过表达可以抑制缺血造成的线粒体自噬增加

Sirt3 过表达后可以维持神经元存活, 保护线粒体功能, 但 Sirt3 是否可以通过调节线粒体自噬发挥作用尚不清楚, 为明确此作用, 本研究利用电子透射电镜观察神经元中线粒体自噬水平。结果显示, 与常氧组相比, OGD1 h/R12 h 组海马神经元中线

粒体自噬显著增多，而 OGD1 h/R12 h Sirt3 过表达组海马神经元线粒体自噬减少，和常氧组之间无显

著差异，表明 Sirt3 过表达抑制缺血造成的线粒体自噬增加的趋势 (图 4)。

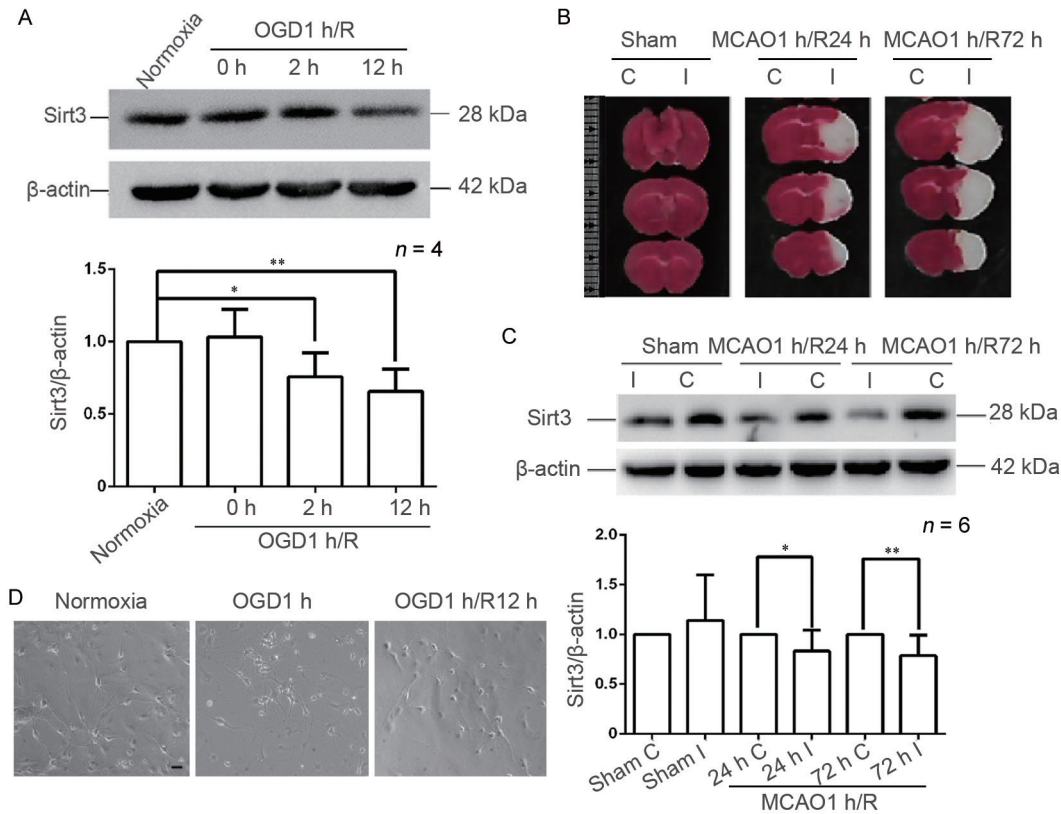


图 1. 急性缺血对各组Sirt3蛋白表达水平的作用

Fig. 1. Effects of acute ischemia on protein expression level of Sirt3 in different groups. *A*: Effect of oxygen glucose deprivation (OGD) on protein expression level of Sirt3 in cultured rat hippocampal neurons detected by Western blot. *B*: Brain slices of Sham, MCAO1 h/R24 h and MCAO1 h/R72 h groups after TTC staining. *C*: Effects of MCAO on protein expression level of Sirt3 in mice detected by Western blot. *D*: Morphology of neurons under light microscope. Scale bar, 100  $\mu$ m. Mean  $\pm$  SD. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ . MCAO, middle cerebral artery occlusion; C, contralateral; I, ipsilateral.

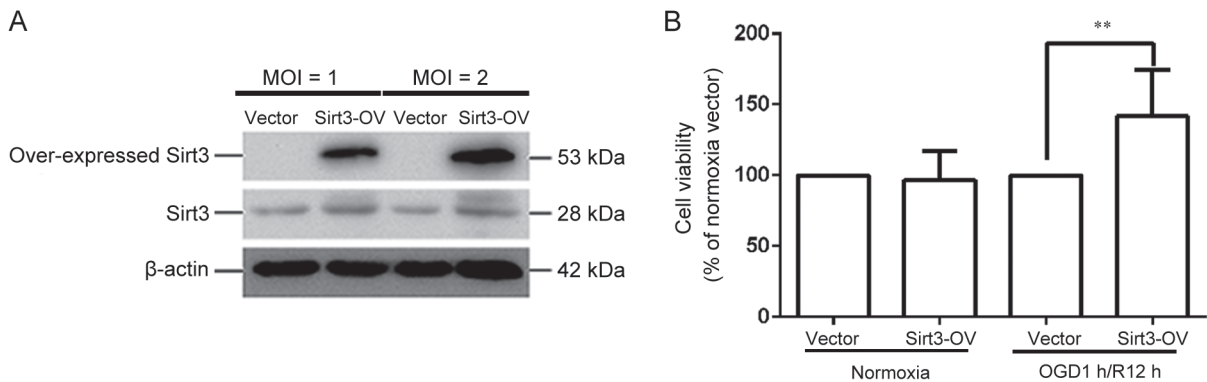


图 2. Sirt3蛋白过表达对各组神经元细胞活性的影响

Fig. 2. Effects of over-expression of Sirt3 on cell viability in different groups. *A*: Over-expression of Sirt3 protein in hippocampal neurons detected by Western blot when multiplicity of infection (MOI) = 1 or 2. *B*: Cell viability detected by CCK8. Mean  $\pm$  SD,  $n = 6$ . \*\* $P < 0.01$ . Sirt3-OV, Sirt3 over-expression group.

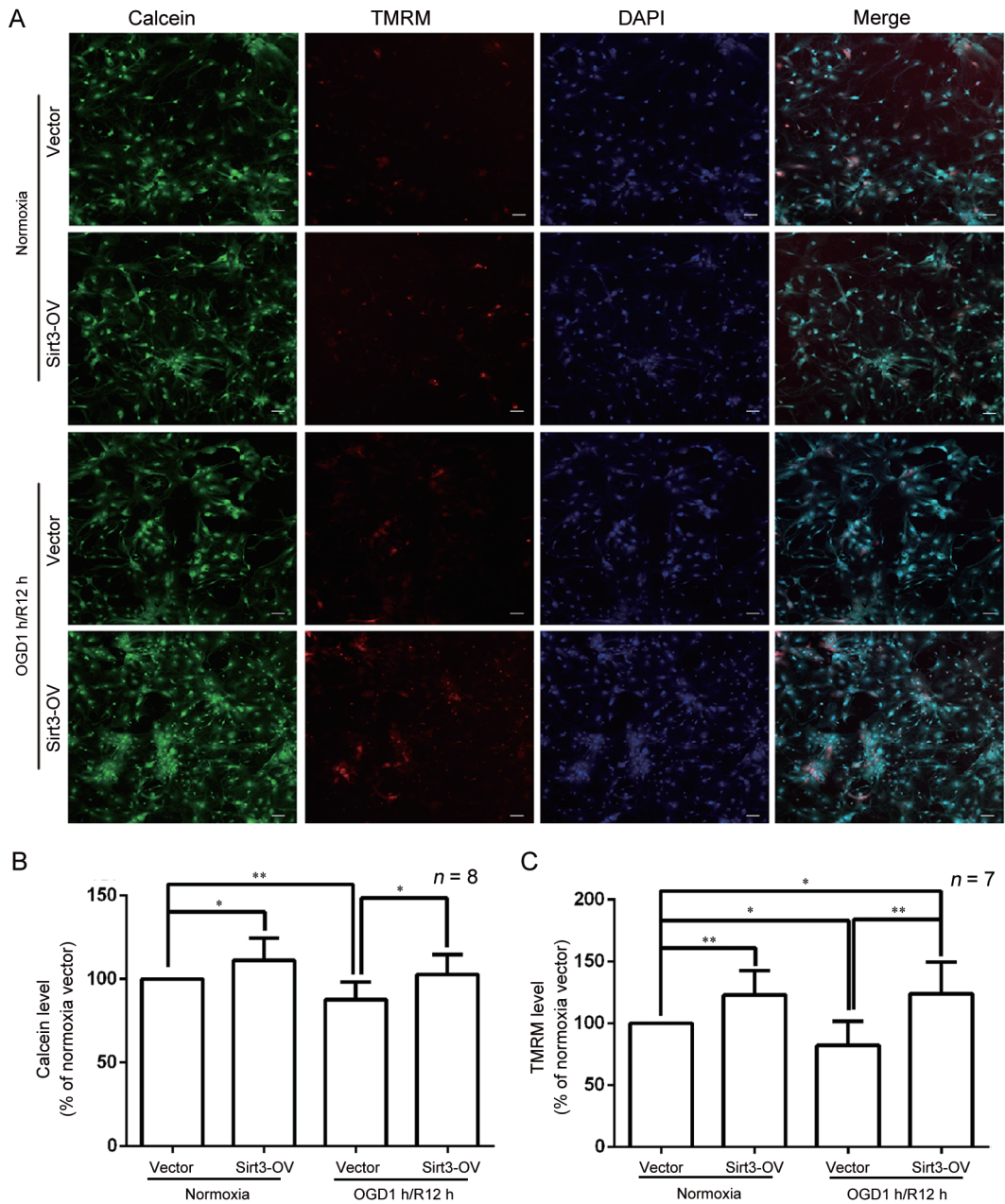


图 3. Sirt3过表达对各组线粒体功能的作用

Fig. 3. Effects of over-expression of Sirt3 on mitochondrial function in different groups. *A*: Representative images of neurons after Calcein and TMRM staining. *B*, *C*: Results of Calcein AM (*B*) and TMRM (*C*) staining. Scale bar, 100  $\mu$ m. Mean  $\pm$  SD. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ . Sirt3-OV, Sirt3 over-expression group.

### 3 讨论

本研究结果显示,无论是在在体动物还是在离体细胞水平,急性缺血均引起 Sirt3 蛋白表达水平下调,同时,在海马神经元上过表达 Sirt3 可以减轻 OGD 对神经元的损伤,提示 Sirt3 蛋白表达水平降低对神经元具有损伤作用。同时,本研究结果是在将缺血再灌注的时程在在体动物水平上延长至

72 h,在离体细胞水平上延长至 12 h 的情况下得到的,提示 Sirt3 蛋白低表达长期存在,为其干预提供了可能性及必要性。

缺血再灌注损伤的主要机制与线粒体功能障碍引起的能量饥饿和氧化应激有关<sup>[24]</sup>。氧化应激涉及多种线粒体分子,如呼吸链复合体、解耦联蛋白、抗氧化蛋白和脱乙酰基酶。由于线粒体功能障碍是



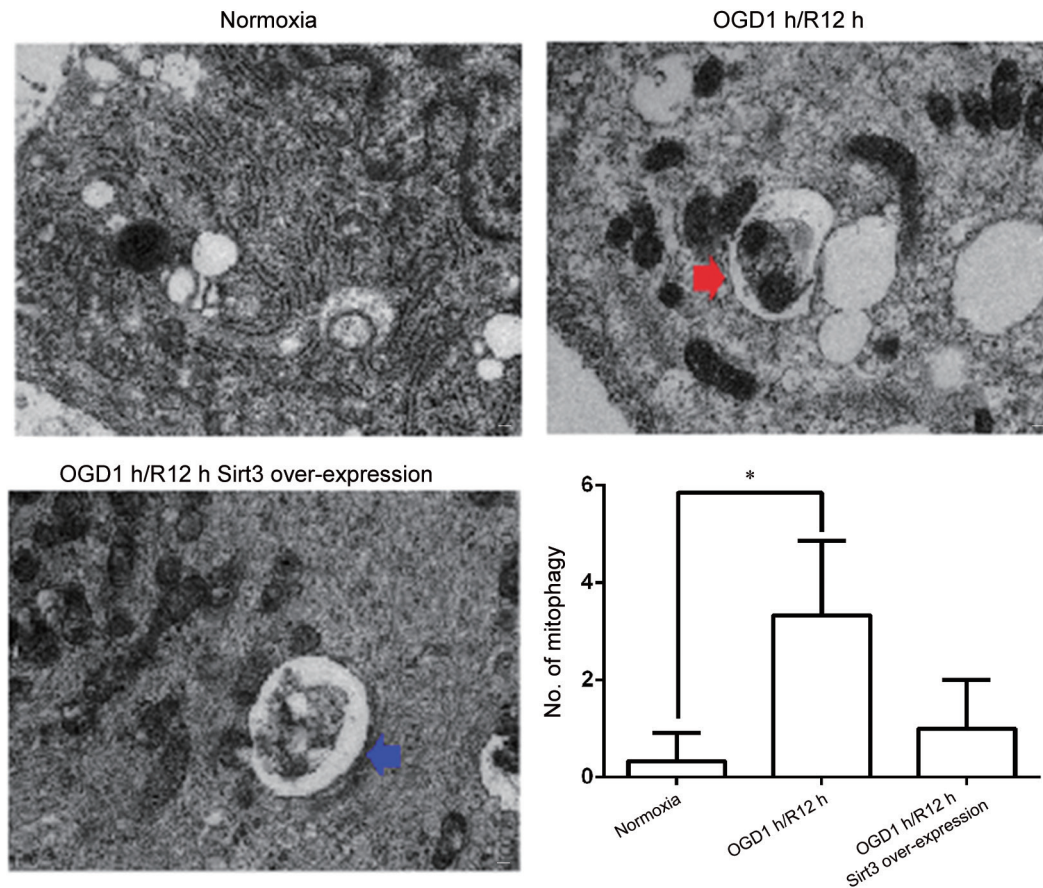


图 4. Sirt3过表达对缺血造成的线粒体自噬的作用

Fig. 4. Effects of Sirt3 over-expression on mitochondrial autophagy (mitophagy) caused by ischemia detected by transmission electron microscopy. The red arrow indicates the autophagosome containing injured mitochondrion, and the blue one indicates the autophagosome containing other components. Scale bar, 1  $\mu$ m. Mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ . \* $P < 0.05$ .

许多神经退行性疾病的致病核心过程，而 Sirt3 对维持线粒体功能有重要作用，因此研究人员将焦点放在神经元线粒体 Sirt3 蛋白上，认为其相关研究是了解神经退行性疾病发病机制和治疗策略的关键<sup>[25]</sup>。本研究应用两个活细胞染料 TMRM 和 Calcein AM 观察 Sirt3 对神经元线粒体功能的影响，结果显示在 OGD1 h/R12 h 处理后，Sirt3 过表达海马神经元 TMRM 和 Calcein 的荧光强度都较空载体组显著增强。OGD 造成线粒体功能障碍导致神经元损伤，而上调的 Sirt3 蛋白通过保护线粒体功能对神经元活性发挥保护作用。目前的研究结果尚未提示 Sirt3 保护线粒体功能的具体分子机制，在未来的研究中我们将深入加以探讨。

在缺血再灌注损伤中，Sirt3 可能起多种作用。一方面，Sirt3 对神经细胞具有保护作用；另一方面，Sirt3 也可以促进神经酰胺的产生，从而引起呼吸链

复合体功能缺陷和活性氧的产生，并加剧缺血性损伤<sup>[26]</sup>。此外，Zhou 等<sup>[27]</sup> 研究显示小鼠缺血 30 min 后服用酮类药物 ( $\beta$ - 羟基丁酸盐和乙酰乙酸盐)，SIRT3-FoxO3a-SOD2 通路激活，可以减轻氧化应激并增强电子传递链复合体 I 活性，从而减少梗死体积并改善神经功能。Dai 等<sup>[7]</sup> 研究显示，过表达 Sirt3 不仅可以降低 OGD 相关的氧化应激，还可通过调节 AMPK-mTOR 途径维持线粒体功能和线粒体膜电位。Ma 等<sup>[28]</sup> 研究显示，Sirt3 参与抑制心肺转流和缺血再灌注脑损伤中的神经炎症。Darwesh 等研究显示，环氧树脂烯酸类似物 SA-26 在心肌缺血再灌注损伤中通过维持线粒体 Sirt3 活性减轻有害的 NLRP3 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor family pyrin domain containing 3) 炎症反应<sup>[29]</sup>。本研究显示 Sirt3 在急性缺血后出现蛋白水平持续降低，其过表达呈现神经元保护作用，提示

Sirt3 是急性缺血后神经元损伤的有效靶标, 其确切保护机制尚需深入探讨。

线粒体自噬已被证明有助于细胞存活, 能通过清除受损的线粒体消除凋亡信号的来源或降低活性氧水平。在哺乳动物细胞中已经发现了线粒体自噬调控的多种途径, 涉及 BNIP3L、ULK1、ATG7、PINK1 和 Parkin。线粒体自噬与多种疾病相关, 包括帕金森氏病和缺血再灌注损伤<sup>[30]</sup>。Yu 等研究显示, Sirt3 可通过激活线粒体自噬来清除受损的线粒体<sup>[31]</sup>。本研究结果显示, Sirt3 过表达后可以抑制 OGD 造成的线粒体自噬增加, 结合我们前期报道的 Sirt3 可以保护线粒体功能的结果<sup>[32]</sup>, 提示 Sirt3 通过保护线粒体, 降低过度激活的线粒体自噬, 从而保护神经元。目前 Sirt3 在缺血再灌注损伤中对线粒体自噬的调控机制尚不清楚, 有待我们进一步的研究。

综上所述, 急性脑缺血后 Sirt3 蛋白表达下调可通过破坏线粒体功能稳态影响神经元存活, 纠正 Sirt3 蛋白下调可减轻急性脑缺血损伤。但关于 Sirt3 在神经退行性疾病尤其是脑卒中的相关机制研究还不全面, 具体的通路和参与的分子机制尚需深入探讨, 才能为临床治疗提供分子靶标和基础数据支撑。

### 参考文献

- 1 Regenhardt RW, Das AS, Lo EH, Caplan LR. Advances in understanding the pathophysiology of lacunar stroke: A review. *JAMA Neurol* 2018; 75(10): 1273–1281.
- 2 Sidorova-Darmos E, Sommer R, Eubanks JH. The role of SIRT3 in the brain under physiological and pathological conditions. *Front Cell Neurosci* 2018; 12: 196.
- 3 Anamika, Khanna A, Acharjee P, Acharjee A, Trigun SK. Mitochondrial SIRT3 and neurodegenerative brain disorders. *J Chem Neuroanat* 2019; 95: 43–53.
- 4 Jin L, Galonek H, Israelian K, Choy W, Morrison M, Xia Y, Wang X, Xu Y, Yang Y, Smith JJ, Hoffmann E, Carney DP, Perni RB, Jirousek MR, Bemis JE, Milne JC, Sinclair DA, Westphal CH. Biochemical characterization, localization, and tissue distribution of the longer form of mouse SIRT3. *Protein Sci* 2009; 18(3): 514–525.
- 5 Yamashita T, Abe K. Recent progress in therapeutic strategies for ischemic stroke. *Cell Transplant* 2016; 25(5): 893–898.
- 6 Yang W, Nagasawa K, Münch C, Xu Y, Satterstrom K, Jeong S, Hayes SD, Jedrychowski MP, Vyas FS, Zaganjor E, Guarani V, Ringel AE, Gygi SP, Harper JW, Haigis MC. Mitochondrial Sirtuin network reveals dynamic SIRT3-dependent deacetylation in response to membrane depolarization. *Cell* 2016; 167(4): 985–1000.e21.
- 7 Dai H, Sinclair DA, Ellis JL, Steegborn C. Sirtuin activators and inhibitors: Promises, achievements, and challenges. *Pharmacol Ther* 2018; 188: 140–154.
- 8 Verma R, Ritzel RM, Crapser J, Friedler BD, McCullough LD. Evaluation of the neuroprotective effect of Sirt3 in experimental stroke. *Transl Stroke Res* 2019; 10(1): 57–66.
- 9 Pi H, Xu S, Reiter RJ, Guo P, Zhang L, Li Y, Li M, Cao Z, Tian L, Xie J, Zhang R, He M, Lu Y, Liu C, Duan W, Yu Z, Zhou Z. SIRT3-SOD2-mROS-dependent autophagy in cadmium-induced hepatotoxicity and salvage by melatonin. *Autophagy* 2015; 11(7): 1037–1051.
- 10 Yang X, Geng K, Zhang J, Zhang Y, Shao J, Xia W. Sirt3 mediates the inhibitory effect of Adjudin on astrocyte activation and glial scar formation following ischemic stroke. *Front Pharmacol* 2017; 8: 943.
- 11 Li S, Dou X, Ning H, Song Q, Wei W, Zhang X, Shen C, Li J, Sun C, Song Z. Sirtuin 3 acts as a negative regulator of autophagy dictating hepatocyte susceptibility to lipotoxicity. *Hepatology* 2017; 66(3): 936–952.
- 12 Tang X, Li Y, Liu L, Guo R, Zhang P, Zhang Y, Zhang Y, Zhao J, Su J, Sun L, Liu Y. Sirtuin 3 induces apoptosis and necroptosis by regulating mutant p53 expression in small-cell lung cancer. *Oncol Rep* 2020; 43(2): 591–600.
- 13 Zhang M, Zhao Z, Shen M, Zhang Y, Duan J, Guo Y, Zhang D, Hu J, Lin J, Man W, Hou L, Wang H, Sun D. Polydatin protects cardiomyocytes against myocardial infarction injury by activating Sirt3. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2017; 1863(8): 1962–1972.
- 14 Wu J, Yang Y, Gao Y, Wang Z, Ma J. Melatonin attenuates anoxia/reoxygenation injury by inhibiting excessive mitophagy through the MT2/SIRT3/FoxO3a signaling pathway in H9c2 cells. *Drug Des Devel Ther* 2020; 14: 2047–2060.
- 15 Li R, Xin T, Li D, Wang C, Zhu H, Zhou H. Therapeutic effect of Sirtuin 3 on ameliorating nonalcoholic fatty liver disease: The role of the ERK-CREB pathway and Bnip3-mediated mitophagy. *Redox Biol* 2018; 18: 229–243.
- 16 Macdonald R, Barnes K, Hastings C, Mortiboys H. Mitochondrial abnormalities in Parkinson's disease and Alzheimer's disease: can mitochondria be targeted therapeutically? *Biochem Soc Trans* 2018; 46(4): 891–909.
- 17 Dai SH, Chen T, Li X, Yue KY, Luo P, Yang LK, Zhu J, Wang YH, Fei Z, Jiang XF. Sirt3 confers protection against neuronal ischemia by inducing autophagy: Involvement of the AMPK-mTOR pathway. *Free Radic Biol Med* 2017; 108: 345–353.
- 18 Zheng J, Shi L, Liang F, Xu W, Li T, Gao L, Sun Z, Yu J,



- Zhang J. Sirt3 ameliorates oxidative stress and mitochondrial dysfunction after intracerebral hemorrhage in diabetic rats. *Front Neurosci* 2018; 12: 414.
- 19 Shao Z, Dou S, Zhu J, Wang H, Xu D, Wang C, Cheng B, Bai B. The role of mitophagy in ischemic stroke. *Front Neurol* 2020; 11: 608610.
- 20 Yin YL (尹艳玲), Li F, Xing CH, Li JJ, Xie ZP. Effect of IGF-1 on inhibitory synaptic transmission in hippocampal neurons. *J Capital Med Univ (首都医科大学学报)* 2007; 28(5): 596–599 (in Chinese with English abstract).
- 21 Rousselet E, Kriz J, Seidah NG. Mouse model of intraluminal MCAO: cerebral infarct evaluation by cresyl violet staining. *J Vis Exp* 2012; (69): 4038.
- 22 Little D, Luft C, Mosaku O, Ketteler R, Devine MJ, Gissen P. High-content analysis of mitochondrial function in iPSC-derived neurons. *Methods Mol Biol* 2019; 1994: 175–184.
- 23 Zhang X, Wei M, Fan J, Yan W, Zha X, Song H, Wan R, Yin Y, Wang W. Ischemia-induced upregulation of autophagy preludes dysfunctional lysosomal storage and associated synaptic impairments in neurons. *Autophagy* 2020; 12: 1–24.
- 24 Anzell AR, Maizy R, Przyklenk K, Sanderson TH. Mitochondrial quality control and disease: Insights into ischemia-reperfusion injury. *Mol Neurobiol* 2018; 55(3): 2547–2564.
- 25 Nerurkar PV, Johns LM, Buesa LM, Kipyakwai G, Volper E, Sato R, Shah P, Feher D, Williams PG, Nerurkar VR. *Momordica charantia* (bitter melon) attenuates high-fat diet-associated oxidative stress and neuroinflammation. *J Neuroinflammation* 2011; 8: 64.
- 26 Novgorodov SA, Riley CL, Keffler JA, Yu J, Kindy MS, Macklin WB, Lombard DB, Gudz TI. SIRT3 deacetylates ceramide synthases: Implications for mitochondrial dysfunction and brain injury. *J Biol Chem* 2016; 291(4): 1957–1973.
- 27 Zhou TY, Wu YG, Zhang YZ, Bao YW, Zhao Y. SIRT3 retards intervertebral disc degeneration by anti-oxidative stress by activating the SIRT3/FOXO3/SOD2 signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2019; 23(21): 9180–9188.
- 28 Ma Q, Zhang Z, Shim JK, Venkatraman TN, Lascola CD, Quinones QJ, Mathew JP, Terrando N, Podgoreanu MV. Annexin A1 bioactive peptide promotes resolution of neuroinflammation in a rat model of exsanguinating cardiac arrest treated by emergency preservation and resuscitation. *Front Neurosci* 2019; 13: 608.
- 29 Darwesh AM, Bassiouni W, Adebessin AM, Mohammad AS, Falck JR, Seubert JM. A synthetic epoxydocosapentaenoic acid analogue ameliorates cardiac ischemia/reperfusion injury: The involvement of the Sirtuin 3-NLRP3 pathway. *Int J Mol Sci* 2020; 21(15): 5261.
- 30 Ham PB 3rd, Raju R. Mitochondrial function in hypoxic ischemic injury and influence of aging. *Prog Neurobiol* 2017; 157: 92–116.
- 31 Yu W, Gao B, Li N, Wang J, Qiu C, Zhang G, Liu M, Zhang R, Li C, Ji G, Zhang Y. Sirt3 deficiency exacerbates diabetic cardiac dysfunction: Role of Foxo3A-Parkin-mediated mitophagy. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2017; 1863(8): 1973–1983.
- 32 Kim TS, Jin YB, Kim YS, Kim S, Kim JK, Lee HM, Suh HW, Choe JH, Kim YJ, Koo BS, Kim HN, Jung M, Lee SH, Kim DK, Chung C, Son JW, Min JJ, Kim JM, Deng CX, Kim HS, Lee SR, Jo EK. SIRT3 promotes antimycobacterial defenses by coordinating mitochondrial and autophagic functions. *Autophagy* 2019; 15(8): 1356–1375.