

microRNA-23b 对 $A\beta_{25-35}$ 导致神经细胞凋亡的作用及机制研究

潘可萌, 陈松, 高向东, 姚文兵*

(中国药科大学生命科学与技术学院 江苏省生物药物成药性研究重点实验室, 南京 211198)

摘要 为了研究 miR-23b 对阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 细胞模型的作用及机制, 采用 $A\beta_{25-35}$ 诱导 SH-SY5Y 细胞损伤建立细胞模型; 采用 Annexin V-FITC/PI 双染结合流式细胞术检测转染 miR-23b 对 $A\beta_{25-35}$ 诱导 SH-SY5Y 细胞凋亡情况的影响; 采用 JC-1 探针检测转染 miR-23b 对 $A\beta_{25-35}$ 损伤 SH-SY5Y 细胞后细胞内线粒体膜电位的影响; 采用 Western blot 检测转染 miR-23b 对 $A\beta_{25-35}$ 诱导 SH-SY5Y 细胞内凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 以及自噬相关蛋白 p62、LC3B、Beclin-1 表达水平的变化。结果显示: miR-23b 能够改善 $A\beta_{25-35}$ 诱导 SH-SY5Y 细胞的凋亡水平和异常的线粒体膜电位, 并缓解 $A\beta_{25-35}$ 引起的神经细胞凋亡蛋白和自噬蛋白表达的异常, 提示 miR-23b 能够改善 $A\beta_{25-35}$ 导致的凋亡通路和自噬通路异常, 进而缓解 $A\beta_{25-35}$ 导致的神经细胞凋亡。

关键词 微小 RNA-23b; 阿尔茨海默病; β -淀粉样蛋白; 凋亡; 自噬

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2021)04-0480-07

doi: 10. 11665/j. issn. 1000-5048. 20210411

引用本文 潘可萌, 陈松, 高向东, 等. microRNA-23b 对 $A\beta_{25-35}$ 导致神经细胞凋亡的作用及机制研究[J]. 中国药科大学学报, 2021, 52(4): 480 - 486.

Cite this article as: PAN Kemeng, CHEN Song, GAO Xiangdong, et al. Effects and mechanisms of microRNA-23b on neuronal apoptosis induced by $A\beta_{25-35}$ [J]. J China Pharm Univ, 2021, 52(4): 480 - 486.

Effects and mechanisms of microRNA-23b on neuronal apoptosis induced by $A\beta_{25-35}$

PAN Kemeng, CHEN Song, GAO Xiangdong, YAO Wenbing*

Jiangsu Key Laboratory of Druggability of Biopharmaceuticals, School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

Abstract In this study, the effects and mechanisms of miR-23b in the AD cell model were explored. $A\beta_{25-35}$ was used to induce neuronal injury model, and cell viabilities were detected by MTT assay. The effect of miR-23b on the apoptotic levels of $A\beta_{25-35}$ -induced SH-SY5Y cells was analyzed using Annexin V-FITC/PI detection kit. The effect of miR-23b on the mitochondrial membrane potential of $A\beta_{25-35}$ -induced SH-SY5Y cells was examined using JC-1 fluorescent probe. The levels of cell apoptosis-related proteins and autophagy-related proteins were detected by Western blot. The results showed that miR-23b could alleviate the apoptosis and the abnormal mitochondrial membrane potential in SH-SY5Y cells induced by $A\beta_{25-35}$. This study suggested that miR-23b may attenuate $A\beta_{25-35}$ -induced neuronal apoptosis by regulating apoptosis and autophagy-related pathway.

Key words microRNA-23b; Alzheimer's disease; β -amyloid; apoptosis; autophagy

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81872850, No. 81673435) and the "Double First-Class" Project of China Pharmaceutical University (No. CPU2018GF08)

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种主要发生在老年人中的神经系统退行性疾病, 临床表现为进行性认知能力丧失, 晚期出现老年性痴呆^[1]。主要病理特征表现为 β -淀粉样蛋白 (β -

收稿日期 2020-12-28 * 通信作者 Tel: 025-83271218 E-mail: wbyao@cpu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目 (No. 81872850, No. 81673435); 中国药科大学“双一流”大学建设资助项目 (No. CPU2018GF08)

amyloid protein, $A\beta$)组成的老年斑(senile plaques, SPs),以及过度磷酸化的 tau 蛋白构成的神经原纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFTs)^[2]。AD 发病机制尚不清楚,目前治疗 AD 的药物都只能在一定程度上缓解 AD 的症状,对于 AD 的神经元损伤无法有效地清除和阻断,并不能完全治愈 AD^[3]。随着人口老龄化加剧,AD 患病人数逐年增长,至 2020 年,全球 AD 患病人数将近 5 000 万,给社会和家庭带来巨大负担^[4]。因此,关于 AD 发病机制研究和药物研发刻不容缓。

微小 RNA (microRNAs, miRNAs) 是一种高度保守的小片段非编码 RNA,在转录后水平调控基因的表达^[5]。miRNAs 在中枢神经系统中广泛分布,对神经发育、分化、成熟发挥重要作用^[6-8]。microRNA-23b (miR-23b) 位于人类 9 号染色体长臂 9q22.32,在该位点上以基因簇形式表达^[9],呈现高度保守,参与细胞增殖、生长、凋亡、分化、细胞黏附以及细胞迁移等多种生命活动^[10-12]。已有研究显示在 AD 患者的额叶皮层中 miR-23b 的表达水平下调,并且可以作为评估 AD 的生物标志物^[13-14],但其在 AD 中的具体作用及机制需要进一步研究。

本研究采用 $A\beta_{25-35}$ 建立 AD 样损伤细胞模型,探究在该模型下 miR-23b 对神经细胞凋亡情况的影响,并进一步研究凋亡相关蛋白和自噬相关蛋白表达水平的变化,从而在细胞水平上探讨 miR-23b 对 $A\beta_{25-35}$ 导致 AD 样神经细胞凋亡的保护作用及机制。

1 材 料

1.1 试 剂

miR-23b (上海吉玛制药技术有限公司); $A\beta_{25-35}$ (中国吉尔生化有限公司); Lipofectamine 3000 转染试剂、蛋白酶和磷酸酶抑制剂、蛋白预染 Marker (美国 Thermo 公司); RIPA 细胞裂解液、一抗稀释液、BCA 蛋白浓度检测试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒 (中国碧云天生物技术有限公司); Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒、ECL 试剂盒 (南京诺唯赞生物技术有限公司); PVDF 膜 (美国 Millipore 公司); DMEM 高糖培养基、胎牛血清 (美国 Gibco 公司); 氨苄青霉素、链霉素、牛血清白蛋白 (中国 Biosharp 公司); 胰蛋白酶、MTT (美国

Sigma 公司); Bax 抗体、Bcl-2 抗体、 β -actin 抗体 (中国 Abclonal 公司); LC3B 抗体、Beclin-1 抗体、HRP 标记的山羊抗兔 IgG (美国 Cell Signaling Technology 公司); p62 抗体 (中国 Proteintech 公司); 其他试剂均为市售分析纯。

1.2 仪 器

二氧化碳细胞培养箱、高速冷冻离心机、全波长酶标仪 (美国 Thermo 公司); 电泳仪、转膜仪 (美国 Bio-Rad 公司); 多功能凝胶成像系统 (中国 Tanon 公司); 倒置荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); 流式细胞仪 (美国 BD 公司)。

1.3 细 胞

神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 细胞株购自美国菌种保藏中心 (ATCC)。

2 方 法

2.1 细胞培养

SH-SY5Y 细胞在含有 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中贴壁生长,放置于 37 °C 含有 5% CO_2 的细胞培养箱中培养,待汇合度达到 80% 左右进行实验。

2.2 $A\beta_{25-35}$ 寡聚体的制备

称量 $A\beta_{25-35}$ 粉末 5 mg,加至双蒸水 5 mL 中充分溶解,超净台中进行过滤除菌,37 °C 恒温培养箱内老化 4 d,BCA 法测定 $A\beta_{25-35}$ 寡聚体浓度,-20 °C 保存。

2.3 $A\beta_{25-35}$ 致 SH-SY5Y 细胞损伤模型的建立

待细胞培养瓶内细胞汇合度达到 80% 左右时,进行胰酶消化,收集密度为每毫升 5×10^4 个的 SH-SY5Y 细胞悬浮液,充分混匀后以每孔 100 μ L 铺在 96 孔细胞培养板中,放置于 37 °C 含有 5% CO_2 的细胞培养箱中培养。12 h 后以梯度浓度 8,4,2,1,0.5,0.25 μ mol/L 的 $A\beta_{25-35}$ 孵育 SH-SY5Y 细胞 24 h,进行 MTT 法检测细胞活性。MTT 法具体步骤:每孔加入 MTT 10 μ L,放置于 37 °C 含有 5% CO_2 的细胞培养箱中,4 h 后弃去培养基,每孔加入 DMSO 150 μ L 后置于摇床上振摇使结晶物充分溶解。使用酶标仪检测:570 nm 为检测波长,630 nm 为参比波长,检测各孔内吸收度。

2.4 细胞转染

实验分为空白对照组、 $A\beta_{25-35}$ + miR-23b NC 组和 $A\beta_{25-35}$ + miR-23b 转染组。收集状态良好的 SH-

SY5Y细胞,以每毫升 5×10^4 个细胞的密度接种于6孔板中,放置于 37°C 含有5% CO_2 的细胞培养箱中培养,待每孔细胞汇合度达到80%左右进行实验。弃去每孔培养基,加入无血清opti-MEM培养基,2~3 h后开始转染。具体转染步骤如下:使用opti-MEM培养基稀释Lipofectamine 3000与miR-23b, Lipofectamine 3000 3.75 μL 用opti-MEM 125 μL 稀释,使用opti-MEM培养基稀释miR-23b至50 nmol/L,将miR-23b与稀释的Lipofectamine 3000等体积混合,室温静置10 min,弃去孔内opti-MEM培养基,加入混合物,每孔总体积2 mL,孵育6 h后更换为含有1%胎牛血清的DMEM高糖培养基,孵育24 h后,采用浓度为0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的 $\text{A}\beta_{25-35}$ 损伤SH-SY5Y细胞;继续培养24 h进行后续实验。

2.5 Annexin V-FITC/PI双染法检测miR-23b及 $\text{A}\beta_{25-35}$ 对SH-SY5Y细胞凋亡的影响^[15]

细胞分组及转染具体实验步骤见“2.4”项。收集每孔细胞培养液,预冷PBS洗涤细胞3次后弃去,使用不含EDTA的胰酶消化贴壁细胞,终止消化后收集细胞,预冷PBS洗涤细胞2次后弃去;加入 $1 \times$ 结合缓冲液100 μL ,轻轻吹匀至单细胞悬液;分别加入Annexin V-FITC染色液5 μL 和PI染色液5 μL ,轻轻吹匀,避光,室温孵育10 min,加入 $1 \times$ 结合缓冲液400 μL ,轻轻混匀,过筛网,置于冰浴中,流式细胞仪检测各组细胞荧光强度。

2.6 JC-1探针法检测miR-23b及 $\text{A}\beta_{25-35}$ 对SH-SY5Y细胞线粒体膜电位的影响

细胞分组及转染具体实验步骤见“2.4”项。取适量JC-1(200 $\times$)探针,按照每50 μL 探针加入8 mL超纯水的比例进行稀释,剧烈涡旋使之充分混匀,再加入JC-1染色缓冲液(5 $\times$)2 mL充分混匀;弃去细胞培养液,使用预冷的PBS洗涤1次,每孔加入细胞培养基1 mL,再加入JC-1染色工作液1 mL,充分混匀,放置于 37°C 含有5% CO_2 的细胞培养箱中孵育20 min,弃去JC-1染色工作液,使用JC-1染色缓冲液(1 $\times$)洗涤2次,每孔加入无血清培养基2 mL,全程避光,荧光显微镜观察并拍照。

2.7 Western blot检测miR-23b及 $\text{A}\beta_{25-35}$ 对SH-SY5Y细胞Bax、Bcl-2、p62、LC3B、Beclin-1蛋白表达量的影响

细胞分组及转染具体实验步骤见“2.4”项。

提取各组细胞内总蛋白,具体步骤为:细胞板置于冰上,弃去孔内培养基,预冷PBS洗涤细胞3次,每孔加入RIPA细胞裂解液(按1:100的比例加入蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合液)100 μL ;细胞刮刀刮取细胞收集于EP管中,每5分钟充分涡旋1次,共6次;置于高速冷冻离心机中, 4°C ,12 000 r/min离心20 min后收集上清液即为细胞总蛋白。蛋白制样后进行SDS-PAGE电泳,上样后80 V恒压电泳,湿转恒流转膜,5%脱脂奶粉封闭2 h后,TBST洗膜3次,每次10 min, 4°C 孵育一抗过夜;TBST洗膜5次,每次5 min,室温孵育二抗2 h后,TBST洗膜5次,每次5 min,ECL显色成像,检测目的蛋白水平。

2.8 统计分析

实验数据采用GraphPad Prism 8.0分析软件进行处理,各项指标以 $\bar{x} \pm s$ 表示,来源于至少3次独立实验,以One-Way ANOVA检验进行组间比较,以 $P < 0.05$ 表明差异有统计学意义。

3 结果

3.1 $\text{A}\beta_{25-35}$ 致SH-SY5Y细胞损伤模型的建立

$\text{A}\beta_{25-35}$ 作为毒性片段,使用浓度梯度为8,4,2,1,0.5,0.25 $\mu\text{mol/L}$ 的 $\text{A}\beta_{25-35}$ 损伤SH-SY5Y细胞24 h后,MTT法检测细胞活性。结果如图1所示, $\text{A}\beta_{25-35}$ 可损伤SH-SY5Y细胞活性,并且呈现一定的浓度依赖性。当0.5 $\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta_{25-35}$ 作用于SH-SY5Y细胞24 h时,与对照组相比,细胞损伤率约为30%,选取该浓度为 $\text{A}\beta_{25-35}$ 的造模浓度。

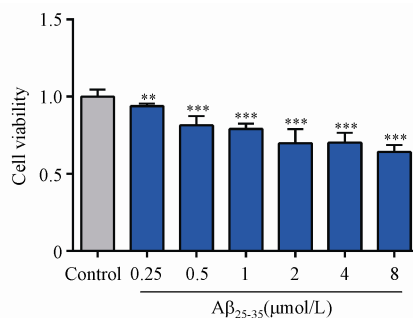


Figure 1 Effects of different concentrations of $\text{A}\beta_{25-35}$ on SH-SY5Y cell viability ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group

3.2 miR-23b对 $\text{A}\beta_{25-35}$ 致SH-SY5Y细胞凋亡情况的干预作用

采用 $\text{A}\beta_{25-35}$ 对SH-SY5Y细胞进行损伤并转染

miR-23b, 收集细胞进行 Annexin V-FITC/PI 染色, 流式细胞仪检测各组细胞凋亡水平的变化。结果如图 2 所示, 与对照组相比较, $A\beta_{25-35}$ 损伤 SH-SY5Y

细胞后, 凋亡细胞数量明显增多, 而转染 miR-23b 后凋亡细胞数量显著减少, 说明 miR-23b 能够改善 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡水平。

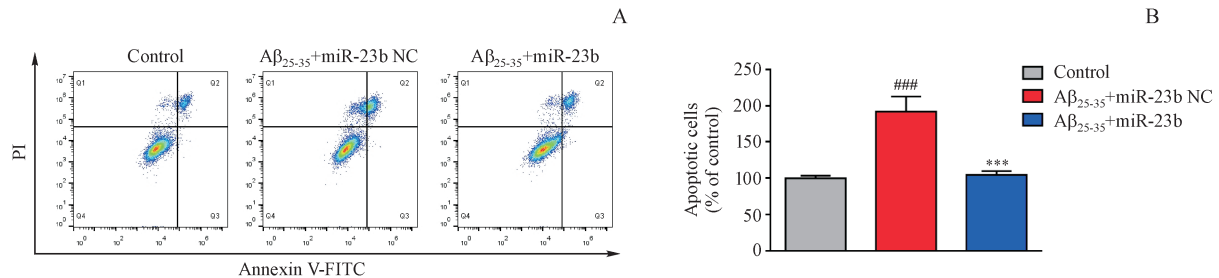


Figure 2 Effects of miR-23b and $A\beta_{25-35}$ on apoptosis in SH-SY5Y cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

A: Analysis of the apoptosis level of SH-SY5Y cells by flow cytometry; B: Quantification of the apoptosis level

$P < 0.001$ vs control group; *** $P < 0.001$ vs $A\beta_{25-35}$ +miR-23b NC group

NC: Negative control

3.3 miR-23b 对 $A\beta_{25-35}$ 诱导 SH-SY5Y 细胞内线粒体膜电位的影响

采用 $A\beta_{25-35}$ 对 SH-SY5Y 细胞进行损伤并转染 miR-23b, JC-1 检测试剂盒检测各组细胞线粒体膜电位情况。线粒体膜电位的下降说明细胞进入早期凋亡。当线粒体膜电位高时, JC-1 形成聚合物, 呈现红色荧光; 线粒体膜电位低时, JC-1 为单体形

式, 呈现绿色荧光。结果如图 3 所示, 与对照组相比较, $A\beta_{25-35}$ 损伤 SH-SY5Y 细胞后, 细胞内绿色荧光较强, 红色荧光减弱, 说明 $A\beta_{25-35}$ 损伤神经细胞后线粒体膜电位降低; 而转染 miR-23b 后细胞内出现较强的红色荧光, 绿色荧光减弱, 说明 miR-23b 能够缓解 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 SH-SY5Y 细胞内线粒体膜电位异常。

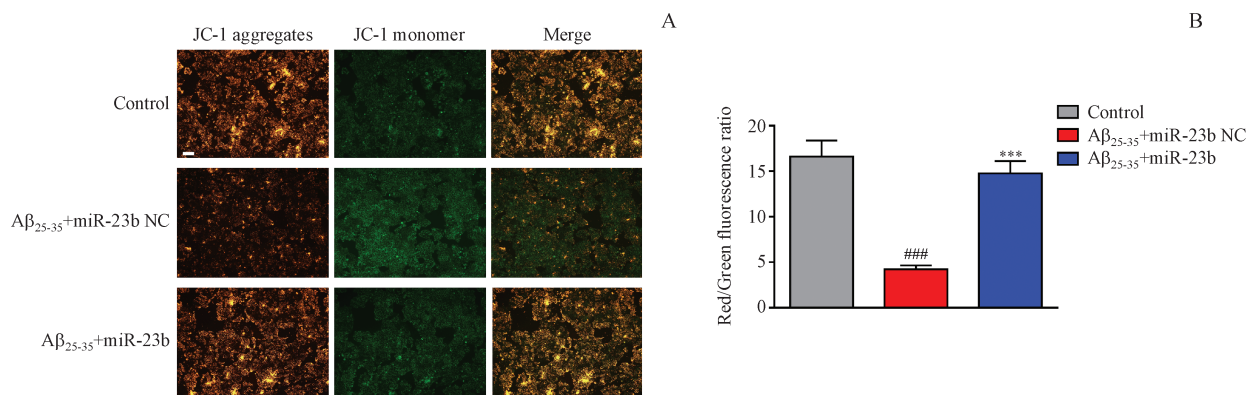


Figure 3 Effects of miR-23b and $A\beta_{25-35}$ on the mitochondrial membrane potential in SH-SY5Y cells (Scale bar: 50 μm)

A: Fluorescence of mitochondrial membrane potential of SH-SY5Y cells; B: Quantification of the red/green fluorescence ratio ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

$P < 0.001$ vs control group; *** $P < 0.001$ vs $A\beta_{25-35}$ +miR-23b NC group

3.4 miR-23b 对 $A\beta_{25-35}$ 诱导 SH-SY5Y 细胞内 Bax、Bcl-2 蛋白表达水平的影响

采用 $A\beta_{25-35}$ 对 SH-SY5Y 细胞进行损伤并转染 miR-23b, Western blot 检测各组细胞内 Bax、Bcl-2 蛋白表达水平。结果如图 4 所示, 与对照组相比较, $A\beta_{25-35}$ 损伤 SH-SY5Y 细胞后, SH-SY5Y 细胞内

促凋亡蛋白 Bax 表达量和抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达量的比值显著上升, 而转染 miR-23b 后促凋亡蛋白 Bax 表达量和抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达量的比值明显下降, 说明 miR-23b 可能通过调节 $A\beta_{25-35}$ 诱导 SH-SY5Y 细胞内凋亡相关蛋白的表达水平, 进而缓解神经细胞的凋亡。

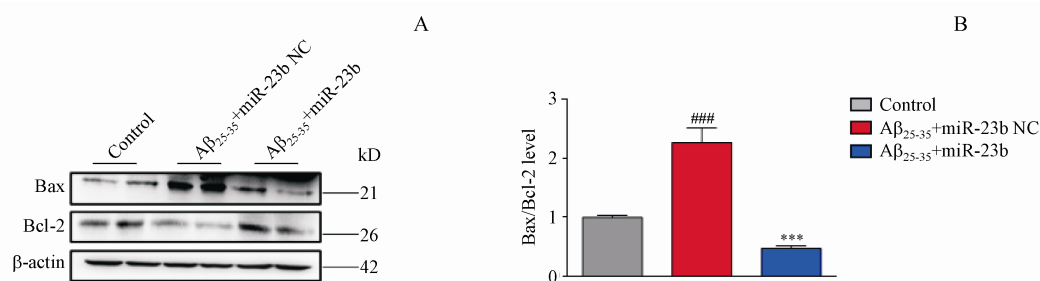


Figure 4 Effects of miR-23b and $A\beta_{25-35}$ on the protein levels of Bax and Bcl-2 in SH-SY5Y cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

A: Detection of protein levels of Bax and Bcl-2 by Western blot; B: Quantitative analysis of Bax/Bcl-2 level

$P < 0.001$ vs control group; *** $P < 0.001$ vs $A\beta_{25-35}$ + miR-23b NC group

3.5 miR-23b 对 $A\beta_{25-35}$ 诱导 SH-SY5Y 细胞内 p62、LC3B、Beclin-1 蛋白表达量的影响

采用 $A\beta_{25-35}$ 对 SH-SY5Y 细胞进行损伤并转染 miR-23b, Western blot 检测各组细胞内 p62、LC3B、Beclin-1 蛋白表达量的变化。结果如图 5 所示,与对照组相比较, $A\beta_{25-35}$ 诱导 SH-SY5Y 细胞损伤后,

SH-SY5Y 细胞内 p62 蛋白水平上升, LC3B-II/LC3B-I 比值下降, Beclin-1 蛋白水平下降, 而转染 miR-23b 后能在一定程度上缓解 $A\beta_{25-35}$ 诱导 SH-SY5Y 细胞内自噬相关蛋白水平表达的异常, 说明 miR-23b 可能同时影响自噬相关蛋白的表达量, 最终缓解神经细胞的凋亡。

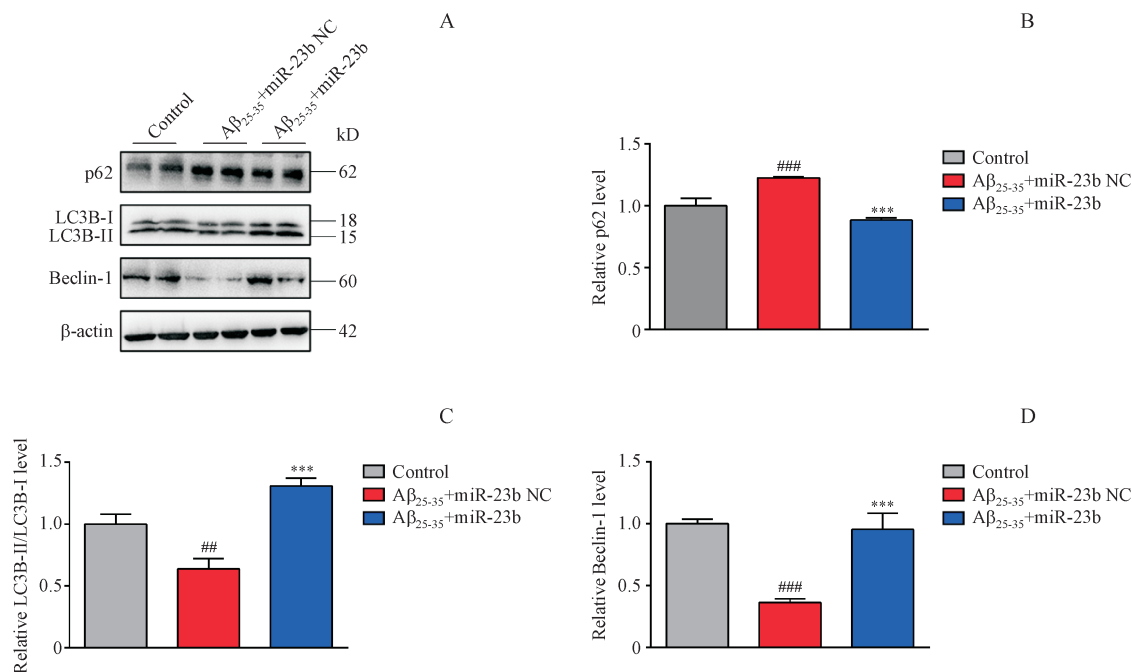


Figure 5 Effects of miR-23b and $A\beta_{25-35}$ on the protein levels of p62, LC3B and Beclin-1 in SH-SY5Y cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

A: Detection of protein levels of p62, LC3B and Beclin-1 by Western blot; B, C, D: Quantitative analysis of protein levels of p62, LC3B-II/LC3B-I and Beclin-1

$P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs control group; *** $P < 0.001$ vs $A\beta_{25-35}$ + miR-23b NC group

4 讨论

AD 主要发生在老年人群中, 中国作为老年人

口数量增长较快的国家, 目前 AD 患病人数已经达到 950 万, 60 岁以上老人的平均患病率为 5.4%^[16]。

然而 AD 发病机制复杂,目前尚未研究出针对 AD 的有效治疗药物^[17]。miRNAs 作为一种内源性小片段非编码 RNA,能够与特定 mRNA 的 3'UTR 非编码翻译区靶向结合从而导致 mRNA 的降解或抑制翻译过程,最终调控基因转录后翻译表达^[18]。miR-23b 定位于 9 号染色体上,属于 miR-23b/27b/24-1 家族,其可靶向不同的蛋白从而在多种疾病中发挥作用^[19-21]。已有研究显示在 AD 患者的额叶皮层中 miR-23b 的表达水平下调,并且可以作为评估 AD 的生物标志物^[13-14]。然而,miR-23b 在 AD 中的具体作用以及分子机制还有待进一步研究。在近几十年的研究中普遍认为 $A\beta$ 的异常积累可能是导致 AD 的发病机制之一^[22-23], $A\beta$ 聚集形成纤维化沉积,进而形成 β 淀粉样斑块最终引发突触损伤、tau 蛋白异常磷酸化、胆碱能丢失、氧化应激和神经炎症等细胞损伤^[24]。 $A\beta_{25-35}$ 因其能够迅速聚集,产生较强的神经毒性^[25],诸多研究使用 $A\beta_{25-35}$ 建立 AD 模型^[26]。同时 SH-SY5Y 细胞作为人类神经母细胞瘤细胞,其形态、神经化学和电生理特性与神经元相似^[27],因此本研究采用 $A\beta_{25-35}$ 诱导 SH-SY5Y 神经细胞建立 AD 细胞损伤模型,探索 miR-23b 对 SH-SY5Y 神经细胞活性的影响。结果表明在 24 h 内, $A\beta_{25-35}$ 对 SH-SY5Y 细胞活性损伤呈现一定的浓度依赖性,以浓度为 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的 $A\beta_{25-35}$ 诱导 SH-SY5Y 神经细胞建立 AD 样细胞损伤模型,给予 miR-23b 后能够缓解 $A\beta_{25-35}$ 所致神经细胞凋亡。说明 miR-23b 对 AD 样细胞模型发挥一定的保护作用。

凋亡作为生物体内细胞自主消亡的过程,对机体组织发育和体内环境平衡至关重要^[28]。诸多研究显示凋亡参与多种主要的神经系统退行性疾病,包括 AD、肌萎缩侧索硬化症、帕金森病和亨廷顿病等^[29]。自噬作为一种选择性降解途径,通过降解细胞内受损的细胞器、蛋白质,提高细胞应对各种应激挑战的能力^[30]。正常情况下细胞凋亡与自噬过程相互平衡,维持细胞内稳态,但在神经系统退行性疾病中凋亡与自噬平衡被打破^[31-32]。本研究发现 miR-23b 可以缓解 $A\beta_{25-35}$ 导致的神经细胞内异常的线粒体膜电位,同时 miR-23b 显著改善

$A\beta_{25-35}$ 引起的异常的凋亡相关蛋白和自噬相关蛋白水平,说明 miR-23b 可能同时影响凋亡相关蛋白和自噬相关蛋白从而缓解神经细胞的凋亡,最终对 $A\beta_{25-35}$ 损伤的 SH-SY5Y 细胞发挥保护作用。本研究为防治 AD 提供了新的潜在靶点,为 AD 药物研发提供了新思路。

References

- [1] Grimm MO, Hundsdoerfer B, Grösgen S, et al. PS dependent APP cleavage regulates glucosylceramide synthase and is affected in Alzheimer's disease [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, **34**(1):92-110.
- [2] Duyckaerts C, Delatour B, Potier MC. Classification and basic pathology of Alzheimer disease [J]. *Acta Neuropathol*, 2009, **118**(1):5-36.
- [3] Fessel J. Alzheimer's disease combination treatment [J]. *Neurobiol Aging*, 2018, **63**:165.
- [4] Association Alzheimer's. 2020 Alzheimer's disease facts and figures [J]. *Alzheimers Dement*, 2020, **16**:391-460.
- [5] Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight [J]. *Nat Rev Genet*, 2008, **9**:102-114.
- [6] Swarbrick S, Wragg N, Ghosh S, et al. Systematic review of miRNA as biomarkers in Alzheimer's disease [J]. *Mol Neurobiol*, 2019, **56**:6156-6167.
- [7] Wang X, Liu D, Huang HZ, et al. A novel microRNA-124/PTPN1 signal pathway mediates synaptic and memory deficits in Alzheimer's disease [J]. *Biol Psychiatry*, 2018, **83**:395-405.
- [8] Qureshi IA, Mehler MF. Emerging roles of non-coding RNAs in brain evolution, development, plasticity and disease [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2012, **13**(8):528-541.
- [9] Wang W, Wang Y, Liu W, et al. Regulation and biological roles of the multifaceted miRNA-23b (MIR23B) [J]. *Gene*, 2018, **642**:103-109.
- [10] Hu H, Tang J, Liu C, et al. MiR-23b promotes the migration of keratinocytes through downregulating TIMP3 [J]. *J Surg Res*, 2020, **254**:102-109.
- [11] Han H, Zhang Z, Yang X, et al. MiR-23b suppresses lung carcinoma cell proliferation through CCNG1 [J]. *Oncol Lett*, 2018, **16**(4):4317-4324.
- [12] Gasiulė S, Dreize N, Kaupinis A, et al. Molecular insights into miRNA-driven resistance to 5-fluorouracil and oxaliplatin chemotherapy: miR-23b modulates the epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer cells [J]. *J Clin Med*, 2019, **8**(12):2115.
- [13] Weinberg RB, Mufson EJ, Counts SE. Evidence for a neuropro-

- protective microRNA pathway in amnesic mild cognitive impairment[J]. *Front Neurosci*, 2015, **9**:430.
- [14] Lugli G, Cohen AM, Bennett DA, *et al.* Plasma exosomal miRNAs in persons with and without Alzheimer disease: altered expression and prospects for biomarkers[J]. *PLoS One*, 2015, **10**(10):e0139233.
- [15] Chen YJ, Gao XD, Chen S. Effects and mechanisms of FGF21 on neuronal damage induced by rotenone[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2020, **51**(6):718-723.
- [16] Ji Y, Shi Z, Zhang Y, *et al.* Prevalence of dementia and main subtypes in rural northern China[J]. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 2015, **39**(5/6):294-302.
- [17] Revi M. Alzheimer's disease therapeutic approaches[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, **1195**:105-116.
- [18] Fabian MR, Sonenberg N. The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2012, **19**:586-593.
- [19] Liu H, Wei W, Wang X, *et al.* MiR23b3p promotes the apoptosis and inhibits the proliferation and invasion of osteosarcoma cells by targeting SIX1[J]. *Mol Med Rep*, 2018, **18**(6):5683-5692.
- [20] Hu X, Wang Y, Liang H, *et al.* MiR-23a/b promote tumor growth and suppress apoptosis by targeting PDCD4 in gastric cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2017, **8**(10):e3059.
- [21] Sun L, Liu A, Zhang J, *et al.* MiR-23b improves cognitive impairments in traumatic brain injury by targeting ATG12-mediated neuronal autophagy[J]. *Behav Brain Res*, 2018, **340**:126-136.
- [22] Selkoe DJ. American college of physicians, American physiological society. Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies[J]. *Ann Intern Med*, 2004, **140**(8):627-638.
- [23] Selkoe DJ, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years[J]. *EMBO Mol Med*, 2016, **8**(6):595-608.
- [24] De Felice FG, Velasco PT, Lambert MP, *et al.* A beta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine[J]. *J Biol Chem*, 2007, **282**(15):11590-11601.
- [25] Millucci L, Raggiaschi R, Franceschini D, *et al.* Rapid aggregation and assembly in aqueous solution of A beta (25-35) peptide[J]. *J Biosci*, 2009, **34**(2):293-303.
- [26] Sun Y, Gao XD, Chen S. Effect and mechanism of FGF21 on astrocyte damage induced by A β_{25-35} [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2019, **50**(4):490-496.
- [27] de Medeiros LM, De Bastiani MA, Rico EP, *et al.* Cholinergic differentiation of human neuroblastoma SH-SY5Y cell line and its potential use as an *in vitro* model for Alzheimer's disease Studies[J]. *Mol Neurobiol*, 2019, **56**(11):7355-7367.
- [28] Wan D, Wu Q, Qu W, *et al.* Pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) inhibits DON-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis via the NF- κ B/iNOS pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, **2018**:1324173.
- [29] Lu T, Aron L, Zullo J, *et al.* REST and stress resistance in ageing and Alzheimer's disease[J]. *Nature*, 2014, **507**(7493):448-454.
- [30] Lv XH, Zhao DH, Cai SZ, *et al.* Autophagy plays a protective role in cell death of osteoblasts exposure to lead chloride[J]. *Toxicol Lett*, 2015, **239**(2):131-140.
- [31] Ghavami S, Shojaei S, Yeganeh B, *et al.* Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders[J]. *Prog Neurobiol*, 2014, **112**:24-49.
- [32] Liu J, Liu W, Lu Y, *et al.* Piperlongumine restores the balance of autophagy and apoptosis by increasing BCL2 phosphorylation in rotenone-induced Parkinson disease models[J]. *Autophagy*, 2018, **14**(5):845-861.