

miR-133b在甲基苯丙胺诱导PC12细胞凋亡中的调控作用

刘海莉¹, 李涛², 王洪杰², 胡涛⁴, 扈燕来³, 张静³, 孙晋浩³, 董晓光⁴

(1.河北省承德市木兰围场县医院麻醉科,河北承德 130828;2.济南市第四人民医院神经外科,山东,济南,250031;
3.山东大学基础医学院解剖与组胚学系,山东济南 250012;4.青岛颐生健中西医结合骨科医院,
山东青岛 266101)

摘要:【目的】探讨小分子非编码RNA 133b在甲基苯丙胺(MA)导致神经元毒性损伤中的表达变化及其对神经细胞凋亡的调控作用。【方法】培养PC12细胞,分为对照组和MA处理组。应用800 μmol/L MA处理PC12细胞建立神经元损伤细胞模型,显微镜下观察PC12细胞突起变化,采用Hoechst33342/PI双染色检测细胞凋亡变化;采用实时荧光定量PCR(Real time-PCR)技术检测miR-133b的表达水平变化;并进一步对miR-133b进行功能分析,分别转染miR-133b模拟物和抑制物以增强或抑制其功能,观察干扰miR-133b功能后MA对PC12细胞凋亡的影响。【结果】800 μmol/L MA可明显诱导PC12细胞损伤,导致神经突起缩短,神经元凋亡数目增多;荧光定量PCR结果显示MA毁损PC12细胞后,miR-133b表达明显降低;转染miR-133b模拟物后PC12细胞凋亡率下降,而转染miR-133b抑制物后PC12细胞凋亡率增加。【结论】高浓度MA可诱导神经细胞损伤、诱发神经元凋亡并下调miR-133b表达,上调miR-133b表达能降低神经细胞凋亡。miR-133b在MA介导的神经毒性损伤中起至关重要的作用。本研究为阐明MA的神经毒性损伤机制提供了理论依据,并且通过干扰miR-133b的功能可能成为对抗MA导致神经损伤的新策略。

关键词: miR-133b; 甲基苯丙胺; 神经损伤; 凋亡

中图分类号: R741.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2018)01-0026-08

Regulation of miR-133b on Methamphetamine-induced Neuronal Apoptosis in PC12 Cells

LIU Hai-li¹, LI Tao², WANG Hong-jie², HU Tao⁴, HU Yan-lai³, ZHANG Jing³, SUN Jin-hao³,
DONG Xiao-guang⁴

(1. Department of Anesthesiology of Mulan Wei Chang Hospital, Chengde, Hebei 130828, China;

2. Department of Neurosurgery of Jinan No.4 People's Hospital, Jinan, Shandong 250031, China;

3. Department of Anatomy and Histology & Embryology, Shandong University, Jinan, Shandong 250012, China;

4. Department of Orthopedic, Osteological Hospital of Yishengjian, Qingdao, Shandong 266101, China)

Corresponding to: DONG Xiao-guang, E-mail: 13708950069@163.com

Abstract: 【Objective】 To investigate the expression changes of miR-133b in methamphetamine (MA)-induced neuronal injury in PC12 cells and its regulative effects on cellular apoptosis. 【Methods】 PC12 cells were cultured and divided into control group and MA treated group. In MA treated group, PC12 cells were insulted with 800 μmol/L MA in culture medium. The cellular injury of PC12 cells was observed under microscope. The cellular apoptosis was detected by Hoechst33342/PI double staining, and the expression level of miR-133b was examined by real-time quantitative PCR (RT-PCR). Furthermore, miR-133b mimic and inhibitors were transfected into PC12 cells to analyze miR-133b's function in MA-induced cell apoptosis. 【Results】 The data showed that 800 μmol/L MA could induce obvious cellular injury, cause neurite shortened and

收稿日期: 2017-09-07

基金项目: 山东省医药卫生科技发展项目(2013WS0008); 山东省重点研发计划(2016GSF201054)

作者简介: 刘海莉, 医学硕士, 主治医师, 研究方向: 神经发育与神经损伤, E-mail: liuhl_2017@126.com; 董晓光, 通信作者, 副主任医师, 研究方向: 神经发育与神经损伤, E-mail: 13708950069@163.com

increase the cell apoptosis. The RT-PCR data showed that the expression of miR-133b of PC12 cells treated with MA decreased significantly. The apoptosis rate of PC12 cells decreased after transfection of miR-133b mimic, while increased after transfection of miR-133b inhibitors. 【Conclusions】 High concentration of MA causes neuron damage and induces neuronal apoptosis, and also decreases the levels of miR-133b expression. Whereas, overexpression of miR-133b can reduce the apoptosis of cultured PC12 cells. Thus, miR-133b plays a crucial role in MA mediated neurotoxicity. This study provides a theoretical basis for elucidating the mechanism of MA-induced neurotoxicity and may provide a new strategy for treating MA addiction.

Key words: miR-133b; methamphetamine; neuronal injury; apoptosis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2018, 39(1):26-33]

甲基苯丙胺(methamphetamine, MA)是目前应用最为普遍的苯丙胺类神经兴奋剂,可引起中枢神经系统毒性损伤和行为学的改变。MA的滥用已成为严重的社会问题并引起公众的广泛关注^[1]。MA的神经毒性损伤主要表现在直接损伤神经元,多数研究集中在神经元兴奋性损伤、氧化应激^[2]、神经炎症^[3]和神经元凋亡等^[4]。其中,神经元凋亡是MA神经毒性的一个重要机制。尽管已发现了诸多参与调控神经元凋亡的基因和蛋白,但MA导致神经细胞凋亡的相关机制尚需进一步的阐明。小分子非编码RNA(miRNAs)是近年来发现的一类具有调控多种生物学过程及细胞功能的RNA分子。尽管其不具备蛋白编码功能,但可在转录后水平抑制多种靶基因的表达。最近,miRNAs在甲基苯丙胺的成瘾性及神经毒性中的作用日益受到关注^[5-7]。miRNAs在神经系统中大量表达,对神经发生、突触发育以及大脑可塑性等过程起重要调控作用,也是调控树突形态可塑性有关的基因的关键因素^[8]。miR-133b在中脑多巴胺能神经元内特异性表达,通过作用Pitx3调节多巴胺能神经元的分化与成熟^[9],而药物成瘾与多巴胺密切相关。本课题组以往的研究发现^[10],MA可通过激活ERK1/2磷酸化导致miR-133b低表达,介导神经元毒性损伤。虽然已经明确MA可诱导神经损伤,但miR-133b在MA诱导神经元凋亡损伤中的作用尚需进一步研究,干扰miR-133b的功能是否可以对抗MA导致的神经损伤尚不清楚。本研究应用MA处理PC12细胞制作体外神经元损伤模型。PC12细胞为鼠肾上腺髓质嗜铬瘤分化而来的神经细胞株,常作为多巴胺能细胞模型,在神经生长因子诱导下,其结构和功能都类似于交感神经细胞,已经被广泛用于神经

元凋亡、中枢神经系统疾病如帕金森病等方面的研究^[11]。本实验应用实时荧光定量PCR技术检测MA损伤后PC12细胞中miR-133b的表达变化,并干扰miR-133b的表达,然后检测细胞凋亡变化,进一步探讨miR-133b在MA诱导神经元凋亡损伤中的调控作用。

1 材料与方法

1.1 材料

MA来自山东省公安厅并备案。PC12细胞系购于上海生命科学院细胞库,四甲基偶氮唑盐(MTT)和二甲基亚砷(DMSO)购自MedChem Express公司。高糖DMEM培养基、胎牛血清(FBS)和0.25% Trypsin-EDTA均购自Thermo Fisher公司。cDNA合成试剂盒与RT-PCR试剂盒购自上海吉玛公司。miR-133b模拟物和抑制物由自上海吉凯基因公司合成。

1.2 方法

1.2.1 PC12细胞培养与分组 将处于对数生长期的PC12细胞接种于含10% FBS的高糖DMEM培养基中,于37℃、体积分数5% CO₂培养箱中孵育24 h,然后加入有效浓度为800 μmol/L的MA,为本课题组已证明的有效浓度^[10]。24 h后,于光学显微镜下观察细胞形态。根据不同研究指标进行以下实验分组:对照组、MA实验组、miR-133b模拟物(miR-133b mimic)+MA组、miR-133b抑制物(miR-133b inhibitor)+MA组。

1.2.2 MTT法检测细胞活性 PC12细胞以5×10³/孔的密度接种于96孔板,MA处理24 h后,加入终浓度为0.5 mg/L的MTT,培养4 h后弃上清,每孔加入100 μL的DMSO,室温下振荡10 min,用Mul-

表1 RT-PCR检测miR-133b的引物序列
Table 1 The primer sequence of miR-133b detected by RT-PCR

Gene	Primer	Sequence
miR-133b	RT primer	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTCTCCA-3'
	PCR primer	Forward primer: 5'-TTTGGTCCCTTCAACCAGCTA-3'
		Reverse primer: 5'-GTGCAGGGTCCGA GGT-3'
U6	RT primer	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAAAATATGGAAC-3'
	PCR primer	Forward primer: 5'-CGCAAGGATGACACGCAAATTC-3'
		Reverse primer: 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'

tiskan MK3 酶标仪测定 492 nm 处的光密度值(Optical density, OD)值,重复3次。

1.2.3 细胞突起长度分析 PC12 细胞以 3×10^4 /孔的密度接种于6孔板,按以上实验分组,MA 处理 24 h 后,荧光显微镜下观察并拍照,每组随机选取5张图,应用IPP 图像分析软件分别测量每张图片中所有PC12 突起的总长度及神经元的总数目,计算PC12 细胞神经元突起的平均长度。

1.2.4 qRT-PCR 检测 miR-133b 的表达 分别收集对照组和 MA 实验组 PC12 细胞,采用 Trizol 法提取总 RNA,按照操作说明进行 RT-PCR。以 U6 为内参检测 PC12 细胞 miR-133b 的表达量,所用引物见表1。逆转录程序为:42 °C 60 min、70 °C 10 min。RT-PCR 反应程序为:95 °C 预变性 20 s、95 °C 变性 10 s、60 °C 退火 20 s、70 °C 延伸 10 s,扩增40个循环,延伸阶段收集荧光信号。记录每个反应管中荧光信号到达阈值时经历的循环数(Ct 值),重复3次,miR-133b 相对表达量按 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行分析。

1.2.5 Hoechst33342/PI 双染色检测细胞凋亡 MA 处理 PC12 细胞 24 h 后,吸弃原来的培养液,用 PBS 液轻轻漂洗细胞,同时加入 0.5 mL Hoechst33342 和 PI 工作液,终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。室温下置于培养箱内孵育 15 min。PBS 漂洗后,置荧光显微镜下观察并分析,每组随机选取5张图,应用IPP 图像分析软件分别计数每张图片中PC12 细胞的总数目及凋亡细胞数目,计算PC12 细胞凋亡率(细胞凋亡率=凋亡细胞数/PC12 细胞总数目)。同法处理对照组,实验重复3次。

1.2.6 miR-133b 模拟物和抑制物转染 将 PC12 细胞以 2×10^4 /孔的密度接种于含有 500 μL 完全培养基的24孔板中,至细胞生长达到60%~80%时分

别用 miR-133b mimic、miR-133b inhibitor 转染。转染成功后分别给予 800 $\mu\text{mol}/\text{L}$ MA 处理,培养 24 h 后行 Hoechst33342/PI 双染色检测各组细胞凋亡损伤,并在荧光显微镜下观察,计算PC12 细胞神经元突起的平均长度,方法同1.2.3。

1.3 统计学分析

采用 SPSS21.0(IBM) 统计软件进行数据分析,数值数据以均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,配对资料组间应用 *t* 检验,多组间比较应用 one-way ANOVA 分析,先进行方差齐性检验,方差齐选用 LSD (least significant differenced) 法;方差不齐采用校正的 *F* 检验,进行统计学分析, $P < 0.05$ 时差异有统计学意义。qRT-PCR 结果由荧光定量分析仪自动采集给出目的基因和参比基因的 Ct 值,样本中目的基因相对表达量按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行计算,其中 $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{目的}} - Ct_{\text{参比}})_{\text{实验}} - (Ct_{\text{目的}} - Ct_{\text{参比}})_{\text{对照}}$, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 所计算的相对表达量表示实验样本中目的基因的表达量相对对照样本中目的基因表达量的倍数。以对照组 miR-133b 的表达量为 1,其他实验组表达量为对照组的相对比例。

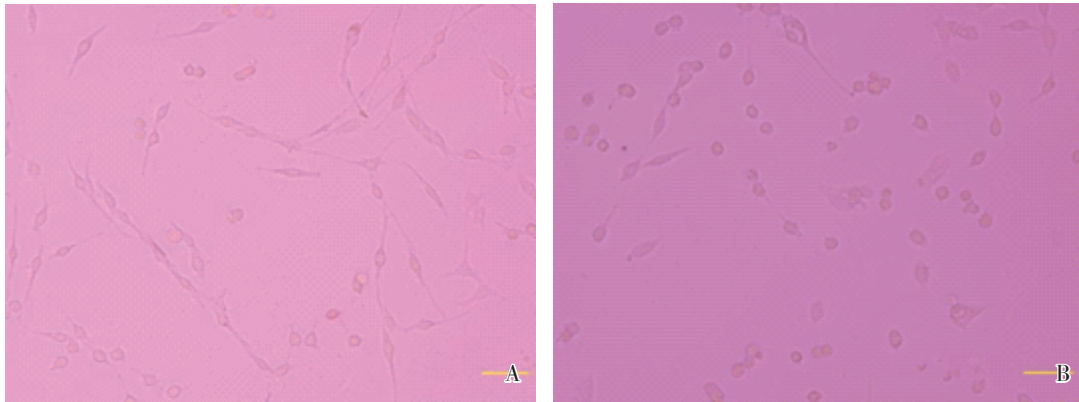
2 结果

2.1 MA 损伤 PC12 细胞形态观察

将 PC12 细胞接种于 24 孔培养板并进行显微镜下观察,可见对照组细胞胞体饱满,以长梭形为主,部分呈圆形或三角形,突起光滑粗大,交互成网状(图 1A)。给予 MA 处理后,可见实验组 PC12 细胞胞体大部分萎缩变圆,突起明显变短甚至消失,细胞损伤严重(图 1B)。

2.2 PC12 细胞活性分析及 miR133b 表达变化

MTT 细胞活性检测结果显示,MA 实验组



A: Control group; B: 800 μmol/L MA group. Bar=200 μm

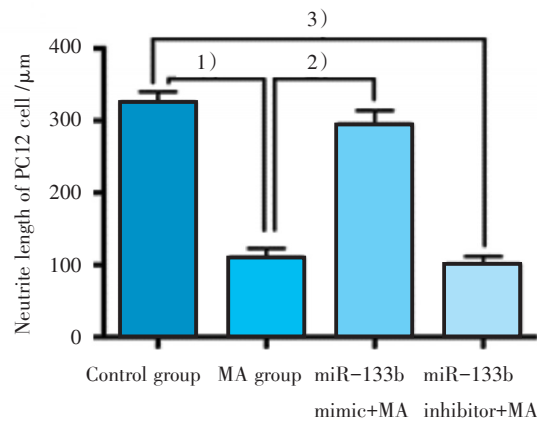
图1 PC12细胞形态观察

Fig.1 Morphological observation of PC12 cells

PC12细胞活性明显下降,与对照组相比有统计学意义($P<0.001$,图2A)。同时本实验通过RT-PCR也检测了两组PC12细胞miR-133b的表达量,结果显示,与正常对照组相比,给予800 μmol/L MA处理后,PC12细胞内的miR-133b相对表达量降低,统计学分析差异有统计学意义($P<0.001$,图2B)。

2.3 PC12细胞突起长度变化

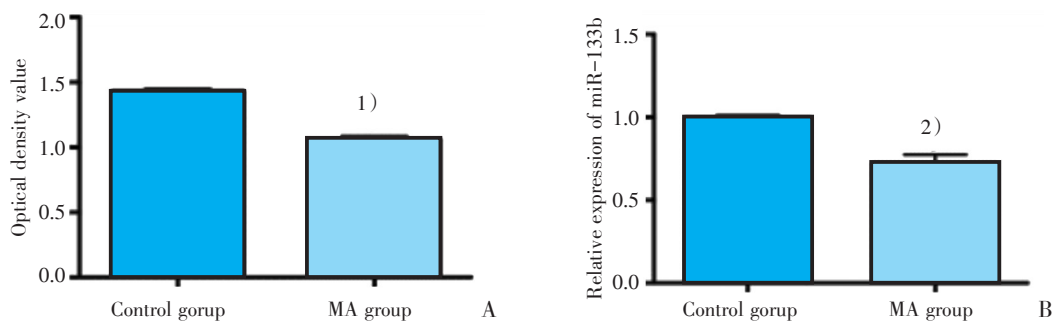
如图3所示,测量对照组及MA实验组PC12细胞突起长度,结果显示,和对照组比较,MA实验组PC12细胞突起明显变短,差异显著,有统计学意义($P<0.001$,图3)。miR-133b模拟物转染组,和MA组比较,PC12细胞突起明显延长,差异有统计学意义($P<0.001$,图3)。miR-133b抑制物转染组与对照组相比,PC12细胞突起明显变短,差异明显,有统计学意义($P<0.001$,图3,P3);与



1) $P<0.001$, MA groups vs control groups ($t=18.139, n=3$); 2) $P<0.001$, miR-133b mimic +MA groups vs MA groups ($t=-13.201, n=3$); 3) $P<0.001$, miR-133b inhibitor +MA groups vs control groups ($t=-20.040, n=3$)

图3 PC12细胞突起长度分析

Fig.3 Analysis of the neurite length of PC12 cells



A: Analysis of the viability of PC12 cells treated with MA, 1) $P<0.001$ vs control groups ($t=21.166, n=3$); B: Analysis of the relative expression of PC12 cells treated with MA, 2) $P<0.001$ vs control groups ($t=8.842, n=3$)

图2 PC12细胞活性检测及miR-133b相对表达量分析

Fig.2 Analysis of the viability and relative expression of miR-133b in PC12 cells

MA组相比,miR-133b抑制物转染组PC12细胞突起更加变短,但统计分析结果显示此差异无统计学意义($t=-0.877, n=3, P=0.431$)。

2.4 Hoechst33342/PI 双染检测细胞凋亡结果

Hoechst33342/PI 双染结果显示,正常对照组PC12细胞的细胞核呈圆形或椭圆形,大小均匀,着暗蓝色荧光,仅出现个别红色凋亡细胞,细胞凋亡率为 $(10.88\pm 1.22)\%$,见图4A。当在培养液内加入 $800\ \mu\text{mol/L}$ MA后,部分细胞可见细胞核大小不一,部分细胞核碎裂或核固缩,并呈现不规则的亮蓝色和红色,视野内可见大量呈红色荧光的凋亡及死亡细胞,较对照组明显增多,细胞凋亡率为 $(25.99\pm 1.96)\%$,见图4B,与对照组相比,差异有统计学意义($P<0.001$,图4C)。

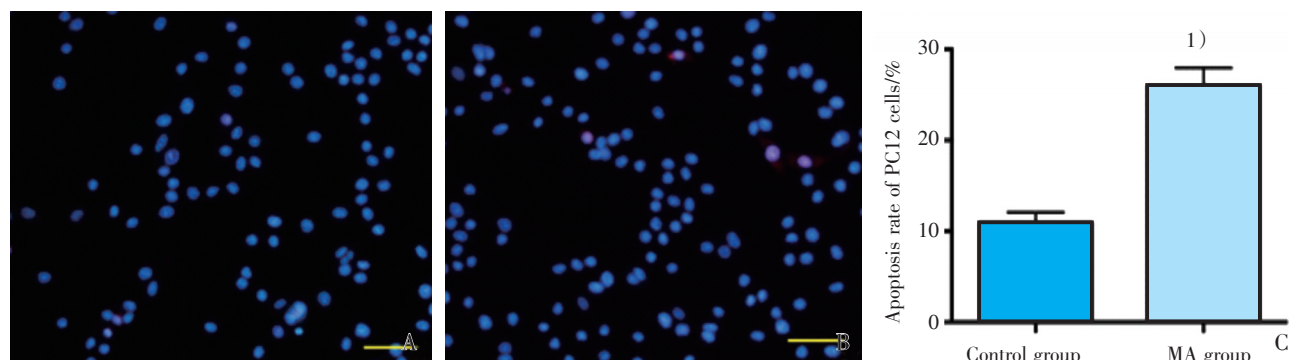
2.5 干扰 miR-133b对PC12细胞凋亡的影响

为进一步分析miR-133b的功能,本实验化学合成了miR-133b的模拟物miR-133b mimic和抑制物miR-133b inhibitor,应用针对核酸分子的高效转染试剂riboFECT™CP实施培养细胞转染,稳定表达后,给予 $800\ \mu\text{mol/L}$ MA处理,Hoechst33342/PI双染色结果显示,miR-133b mimic转染组可见凋亡细胞明显减少,增强miR-133b功能后显著降低PC12细胞的凋亡率(图5A、4B)。而转染miR-133b inhibitor抑制其功能后,可见凋亡细胞增加,即PC12细胞的凋亡率增加(图5C、5D)。miR-133b mimic组与miR-133b inhibitor组的细胞凋亡率比较,差异有统计学意义($P<0.01$,图5E)。

3 讨论

MA是世界范围内被广泛应用的精神兴奋剂,该药具有精神依赖性高、神经毒性大等特点。以往的研究表明,MA可通过不同的分子信号通路诱导星形胶质细胞和小胶质细胞凋亡^[12-13],并导致大脑前额皮质、纹状体、海马和中脑部位灰质体积变小、白质增多^[14]。动物实验和临床研究也证明,MA的滥用可引起脑、心脏、肺脏等多脏器损害,尤其是神经系统多巴胺能神经元损伤更为明显^[15-16]。MA的神经毒性损伤机制涉及大量的分子信号通路,比如CHOP-Trib3通路,MAPK通路等^[17-18]。分析MA致神经毒性的分子调控机制,不仅有助于理解MA的毒理学特性,也为治疗神经元的毒性损伤提供新的思路。

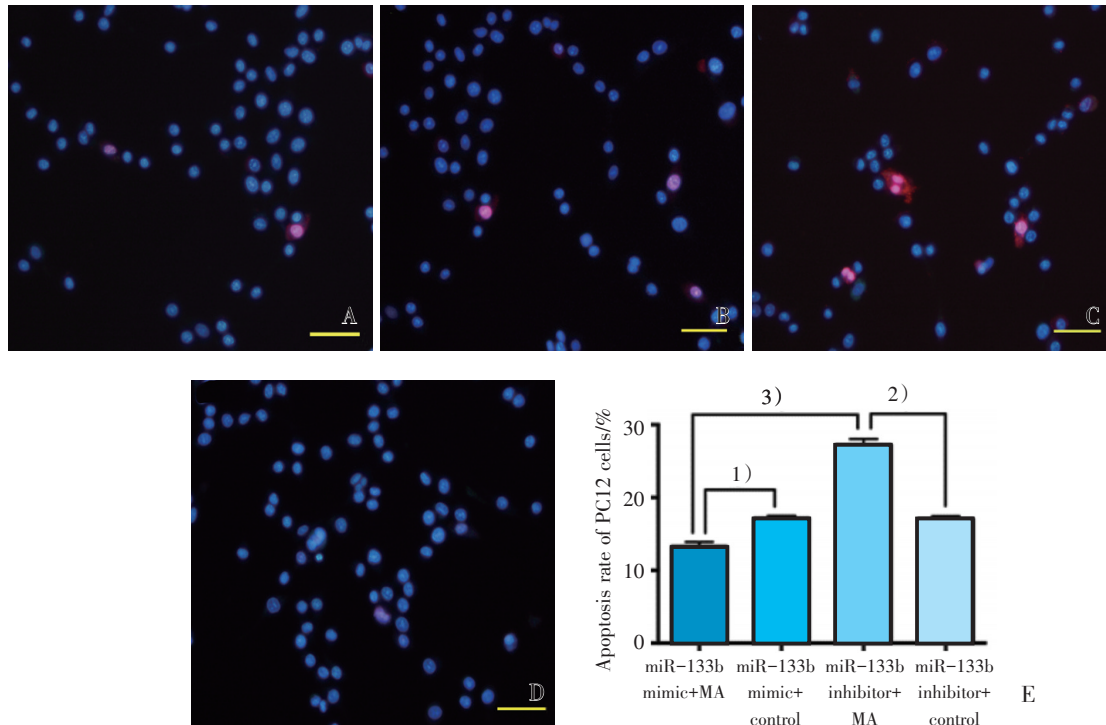
本研究组在前期研究中发现^[10],不同浓度的MA均可导致神经细胞损伤,随着MA浓度增加,细胞损伤程度逐渐加重, $400\ \mu\text{mol/L}$ 浓度MA组细胞损伤较轻,而 $1\ 600\ \mu\text{mol/L}$ 浓度引起的细胞损伤较重,因此选择 $800\ \mu\text{mol/L}$ 作为MA细胞实验较为合适。本研究中,给予 $800\ \mu\text{mol/L}$ MA处理培养的PC12细胞,发现可导致明显的细胞形态学变化,细胞突起减少、甚至消失,细胞突起网状连接的消失。MTT法检测显示PC12细胞活力下降,表明MA对多巴胺能神经元PC12细胞具有显著的毒性损伤作用。作为成瘾类药物,MA主要作用于多巴胺系统,其神经毒性表现为纹状体单胺类



A: Control groups; B: PC12 cells treated with $800\ \mu\text{mol/L}$ MA; C: Analysis of apoptosis rate of PC12 cells, 1) $P<0.001$ vs control groups ($t=-11.321, n=3$), Bar=200 μm

图4 Hoechst33342/PI 双染 PC12 细胞凋亡结果

Fig.4 The results of PC12 cell apoptosis by Hoechst 33342/PI double staining



A: miR-133b mimic groups; B: miR-133b mimic control groups; C: miR-133b inhibitor groups; D: miR-133b inhibitor control groups; E: Analysis of apoptosis rate of PC12 cells after interfering miR-133b, 1) $P=0.002624$, miR-133b mimic groups vs miR-133b mimic control groups ($t=-6.671, n=3$); 2) $P<0.001$, miR-133b inhibitor groups vs miR-133b inhibitor control groups ($t=13.260, n=3$); 3) $P<0.001$, miR-133b mimic groups vs miR-133b inhibitor groups ($t=-17.112, n=3$), Bar=200 μm

图5 干扰miR-133b对MA处理PC12细胞凋亡的影响

Fig.5 Effect of interfering miR-133b on apoptosis of PC12 cells treat with MA

神经递质长期消耗,从而诱导多巴胺转运体(dopamine transporter, DAT)减少和酪氨酸羧化酶活性下降^[19]。虽然,以往的研究分析了多种基因的表达变化,但是分析小分子非编码RNA的较少。miR-133b可调节多巴胺能神经元的发育,也暗示了与MA成瘾的相关性。我们应用RT-PCR技术检测MA处理后PC12细胞miR-133b表达变化。结果显示,细胞内miR-133b表达明显下降。进一步通过模拟物转染增强miR-133b的功能,可减少MA对PC12细胞突起的损伤,抑制miR-133b的功能,MA处理PC12细胞引起的突起减少有加重趋势。

研究表明,miRNAs作为新兴的关键调控分子,可通过结合目标mRNA的3'UTR在转录后水平调控基因表达,参与多种疾病的发生和发展过程^[20-22]。MiR-133b存在于1号染色体,通过与目标mRNA的3'非翻译区结合发挥其调控作用。由于miR-133b在心脏和骨骼肌的高度表达,早期研究认为miR-133具有肌肉特异性,在肌肉的发

展和重塑中起关键调节作用^[23-25]。但现在越来越多的研究认为,miR-133b还参与了肿瘤、帕金森病等疾病的发生和发展^[26-28],miR-133b可以调节神经元突起生长,miR-133b下调能抑制神经元树突生长,过表达miR-133b能促进神经突起生长^[26,29-30]。我们的研究结果也显示干扰miR-133b后抑制突起的生长,也表明miR-133b在对抗MA引起的神经毒性损伤中发挥着重要作用。

凋亡是一种受基因调控的细胞程序性死亡过程,其形态学变化主要表现为细胞核浓缩,染色质凝集,胞浆皱缩,最终形成凋亡小体等^[31]。研究显示,MA能引起Bax, Bcl-2及caspase-3蛋白水平增高,并导致体外培养的海马神经细胞、永生神经元凋亡^[32]。Hoechst33342/PI双染法是常用的细胞凋亡检测方法,可从形态上观察,并进行量化分析^[33]。Hoechst33342染料能透过细胞膜完整的细胞,并嵌入细胞核DNA,呈现出明亮的蓝色荧光。而PI仅在胞膜受损时才能进入细胞,嵌入核DNA,呈现出红色荧光。故而,通过双染可以鉴别

出正常和损伤的细胞。miR-133b参与调控神经元树突生长,是否还参与了MA诱导的神经元凋亡?本研究采用Hoechst33342/PI双染法检测了MA处理的PC12细胞凋亡率,结果显示,MA处理后,PC12细胞凋亡率增加,表明MA能诱导PC12细胞凋亡。为了证明miR-133b参与了MA引起的凋亡损伤,我们分别用miR-133b模拟物和抑制物转染PC12细胞以增强和抑制miR-133b的功能,然后再给予MA处理,发现上调miR-133b表

达能抑制神经元细胞凋亡,而下调miR-133b表达则凋亡增加。本研究结果表明,miR-133b可能参与了MA诱导的神经元凋亡过程。

综上所述,MA处理后可明显导致PC12细胞活性下降及细胞凋亡,并诱导miR-133b表达下调。增强miR-133b的功能后可降低细胞凋亡。本研究结果为阐明MA的神经毒性损伤机制提供了理论依据,并有可能为疾病治疗提供新的策略。

参考文献:

- [1] Thrash-Williams B, Karuppagounder SS, Bhattacharya D, et al. Methamphetamine-induced dopaminergic toxicity prevented owing to the neuroprotective effects of salicylic acid [J]. *Life Sci*, 2016, 154: 24-29
- [2] McDonnell-Dowling K, Kelly JP. The role of oxidative stress in methamphetamine-induced toxicity and sources of variation in the design of animal studies [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2017, 15(2): 300-314.
- [3] Shin EJ, Tran HQ, Nguyen PT, et al. Role of mitochondria in methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity: Involvement in oxidative stress, neuroinflammation, and pro-apoptosis- A review [J]. *Neurochem Res*, 2017, 1-13.
- [4] Shin EJ, Dang DK, Tran TV, et al. Current understanding of methamphetamine-associated dopaminergic neurodegeneration and psychotoxic behaviors [J]. *Arch Pharm Res*, 2017, 40(4): 403-428.
- [5] Zhao Y, Zhang K, Jiang H, et al. Decreased expression of plasma microRNA in patients with methamphetamine (MA) use disorder [J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2016, 11(3): 542-548.
- [6] Sim MS, Soga T, Pandey V, et al. MicroRNA expression signature of methamphetamine use and addiction in the rat nucleus accumbens [J]. *Metab Brain Dis*, 2017(Suppl 1): 1-17.
- [7] 李涛, 王洪杰, 刘桂阳, 等. MiR-134在MA诱导神经元损伤中的表达及其对神经诱发动作电位的影响 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2017, 38(1): 36-41.
Li T, Wang HJ, Liu GY, et al. The expression of miR-134 in methamphetamine-induced neuronal injury and its effect on evoked action potential [J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2017, 38(1): 36-41.
- [8] Dreyer JL. New insights into the roles of microRNAs in drug addiction and neuroplasticity [J]. *Genome Med*, 2010, 2(12): 92.
- [9] Kim J, Inoue K, Ishii J, et al. A MicroRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons [J]. *Science*, 2007, 317(5842): 1220-1224.
- [10] 刘海莉, 朱晓德, 吴金涛, 等. 细胞外信号调节激酶/miR-133b在甲基苯丙胺致PC12细胞神经毒性的作用及机制 [J]. *解剖学报*, 2014, 45(6): 755-760.
Liu HL, Zhu XD, Wu JT, et al. Role and mechanism of extracellular signal-regulated kinase/miR-133b pathway in methamphetamine-induced neurotoxicity in PC12 cells [J]. *Acta Anatomica Sinica*, 2014, 45(6): 755-760.
- [11] Duan XH, Wang WL, Dai R, et al. Current situation of PC12 cell use in neuronal injury study [J]. *Int J Biotechnol Well Ind*, 2015, 4(2): 61-66.
- [12] Fernandes NC, Sriram U, Gofman L, et al. Methamphetamine alters microglial immune function through P2X7R signaling [J]. *J Neuroinflammation*, 2016, 13(1): 91.
- [13] Bortell N, Basova L, Semenova S, et al. Astrocyte-specific overexpressed gene signatures in response to methamphetamine exposure in vitro [J]. *J Neuroinflammation*, 2017, 14(1): 49.
- [14] Grant KM, LeVan TD, Wells SM, et al. Methamphetamine-associated psychosis [J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2012, 7(1): 113-139.
- [15] Vearrier D, Greenberg MI, Miller SN, et al. Meth-

- amphetamine: History, pathophysiology, adverse health effects, current trends, and hazards associated with the clandestine manufacture of methamphetamine [J]. *Dis Mon*, 2012, 58(2): 38-89.
- [16] Halpin LE, Collins SA, Yamamoto BK. Neurotoxicity of methamphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine [J]. *Life Sci*, 2014, 97(1): 37-44.
- [17] Barbosa DJ, Capela JP, Felo-Azevedo R, et al. Mitochondria: Key players in the neurotoxic effects of amphetamines [J]. *Arch Toxicol*, 2015, 89(10): 1695-1725.
- [18] Xu X, Huang E, Tai Y, et al. Nupr1 modulates methamphetamine-induced dopaminergic neuronal apoptosis and autophagy through CHOP-Trib3-mediated endoplasmic reticulum stress signaling pathway [J]. *Front Mol Neurosci*, 2017, 10: 203:1-16.
- [19] Kitamura O. Detection of methamphetamine neurotoxicity in forensic autopsy cases [J]. *Leg Med (Tokyo)*, 2009, 11(Suppl 1): S63-65.
- [20] Zhang XH, Zhang YN, Liu Z. MicroRNA in chronic rhinosinusitis and allergic rhinitis [J]. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2014, 14(2): 415.
- [21] Deng YQ, Yang YQ, Wang SB, et al. Intranasal administration of lentiviral miR-135a regulates mast cell and allergen-induced inflammation by targeting GATA-3 [J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0139322.
- [22] Panganiban RP, Wang Y, Howrylak J, et al. Circulating microRNAs as biomarkers in patients with allergic rhinitis and asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2016, 137(5): 1423-1432.
- [23] Nohata N, Hanazawa T, Enokida H, et al. microRNA-1/133a and microRNA-206/133b clusters: Dysregulation and functional roles in human cancers [J]. *Oncotarget*, 2012, 3(1): 9-21.
- [24] Mitchelson KR, Qin WY. Roles of the canonical myomiRs miR-1, -133 and -206 in cell development and disease [J]. *World J Biol Chem*, 2015, 6(3): 162-208.
- [25] Horak M, Novak J, Bienertova-Vasku J. Muscle-specific microRNAs in skeletal muscle development [J]. *Dev Biol*, 2016, 410(1): 1-13.
- [26] Niu M, Xu R, Wang J, et al. MiR-133b ameliorates axon degeneration induced by MPP(+) via targeting RhoA [J]. *Neuroscience*, 2016, 325: 39-49.
- [27] Li D, Xia L, Chen M, et al. miR-133b, a particular member of myomiRs, coming into playing its unique pathological role in human cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(30): 50193-50208.
- [28] Zhang X, Yang R, Hu BL, et al. Reduced circulating levels of miR-433 and miR-133b are potential biomarkers for Parkinson's disease [J]. *Front Cell Neurosci*, 2017, 11: 170.
- [29] Xin H, Li Y, Buller B, et al. Exosome-mediated transfer of miR-133b from multipotent mesenchymal stromal cells to neural cells contributes to neurite outgrowth [J]. *Stem Cells*, 2012, 30(7): 1556-1564.
- [30] Lu XC, Zheng JY, Tang LJ, et al. MiR-133b promotes neurite outgrowth by targeting RhoA expression [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 35(1): 246-258.
- [31] You Y, Cheng AC, Wang MS, et al. The suppression of apoptosis by alpha-herpesvirus [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(4): e2749.
- [32] Chen C, Qincao L, Xu L, et al. Role of PUMA in methamphetamine-induced neuronal apoptosis [J]. *Toxicol Lett*, 2016, 240(1): 149-160.
- [33] 张伟, 梁智辉. Annexin V-FITC/PI 双标记与 Hoechst33342/PI 双标记流式细胞术检测细胞凋亡的比较 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2014, 30(11): 1209-1212.
- Zhang W, Liang ZH. Comparison between annexin V-FITC/PI and Hoechst33342/PI double stainings in the detection of apoptosis by flow cytometry [J]. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2014, 30(11): 1209-1212.

(编辑 孙慧兰)