

miR-15b 对 MPP⁺ 损伤 SH-SY5Y 细胞中 α 突触核蛋白表达的影响谢时帅^{1,2}, 牛万祥^{1,2,3,4}, 徐峰^{1,2}, 胡珊珊^{1,2,3,4}, 牛朝诗^{1,2,3}

1. 安徽医科大学附属省立医院神经外科, 安徽 合肥 230001

2. 脑功能与脑疾病安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230001

3. 安徽省脑立体定向神经外科研究所, 安徽 合肥 230001

4. 安徽省神经系统疾病(神经外科)临床研究中心, 安徽 合肥 230001

摘要:目的 研究 miR-15b 对 MPP⁺ (1-甲基-4-苯基-吡啶离子) 损伤 SH-SY5Y 细胞中 α 突触核蛋白表达的影响以及在帕金森病(Parkinson disease, PD)发病机制中的作用。方法 通过 CCK-8 检测出 MPP⁺ 诱导 SH-SY5Y 细胞为 PD 细胞模型的最适浓度和时间,然后将过表达和沉默 miR-15b 的质粒转染到 PD 细胞模型内,再通过 Real Time-PCR 和 Western Blot 检测 miR-15b 和 α 突触核蛋白的表达量。结果 SH-SY5Y 细胞经 MPP⁺ 诱导后细胞形态发生改变、细胞增殖能力降低,过表达 miR-15b 后 α -synuclein 和 α 突触核蛋白的表达量均降低($P < 0.05$),沉默 miR-15b 后 α -synuclein 和 α 突触核蛋白的表达量均升高($P < 0.05$)。结论 miR-15b 可以抑制 PD 细胞模型内 α -synuclein 和 α 突触核蛋白的表达。miR-15b 可能参与了帕金森病患者中脑黑质多巴胺能神经元内 α 突触核蛋白的富集调节机制。

关键词: 帕金森病; miR-15b; MPP⁺; SH-SY5Y; α 突触核蛋白

DOI:10.16636/j.cnki.jinn.2018.06.010

Effect of microRNA-15b on the expression of α -synuclein in SH-SY5Y cells with 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced injury

XIE Shi-shuai, NIU Wan-xiang, XU Feng, HU Shan-shan, NIU Chao-shi. Department of Neurosurgery, Anhui Provincial Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Anhui Provincial Key Laboratory of Brain Function and Brain Disease, Hefei 230001, China

Corresponding author: Niu Chaoshi, Email: niuchaoshi@163.com

Abstract: Objective To investigate the effect of microRNA-15b (miR-15b) on the expression of α -synuclein in SH-SY5Y cells with 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)-induced injury and its role in the pathogenesis of Parkinson's disease (PD). **Methods** CCK-8 was used to determine the optimal concentration and time of MPP⁺ induction in the establishment of a PD cell model using SH-SY5Y cells, and then the PD cell model was transfected with the plasmids with overexpressed or silenced miR-15b. Real-time PCR and Western blot were used to measure the mRNA and protein expression of miR-15b and α -synuclein. **Results** SH-SY5Y cells had changes in cell morphology and a reduction in cell proliferation after MPP⁺ induction. There were significant reductions in the mRNA and protein expression of α -synuclein after miR-15b overexpression ($P < 0.05$), and there were significant increases in the mRNA and protein expression of α -synuclein after miR-15b silencing ($P < 0.05$). **Conclusions** MiR-15b can inhibit the mRNA and protein expression of α -synuclein in the PD cell model. MiR-15b may be involved in the enrichment and regulation of α -synuclein in the substantia nigra dopaminergic neurons in patients with PD.

Key words: Parkinson's disease; MicroRNA-15b; 1-Methyl-4-phenylpyridinium; SH-SY5Y; α -Synuclein

帕金森病(Parkinson disease, PD)是一种常见的神经系统变性疾病,该病最主要的病理改变是中脑黑质多巴胺(dopamine, DA)能神经元的变性死亡,继而引起纹状体 DA 含量显著减少以及黑质残

基金项目:中央引导地方科技发展专项(编号:2017070802D144);脑功能与脑疾病安徽省重点实验室绩效考核补助项目(编号:1606c08235);国家重点研发计划项目子课题(编号:2016YFC0105900)

收稿日期:2018-09-14; **修回日期:**2018-11-13

作者简介:谢时帅(1992-),男,在读硕士,主要研究方向:功能神经外科。

通信作者:牛朝诗,男,博士,主任医师,教授,博士生导师,科主任,主要从事脑肿瘤和功能神经外科基础与临床; Email:niuchaoshi@163.com

存神经元胞质内出现以 α 突触核蛋白 (α -synuclein) 为主要成分的路易小体 (Lewy body)^[1]。据统计, PD 全人群患病率约为 0.3%, 我国 65 岁以上老年人群患病率为 1700/10 万^[2,3]。目前帕金森病的发病机制仍不清楚, 临床上治愈十分困难^[4]。有研究发现 miR-15b 的表达异常与帕金森病的发病可能相关^[5,6]。因此, 本研究通过 MPP⁺ 诱导 SH-SY5Y 细胞为 PD 细胞模型, 探讨 miR-15b 在帕金森病发病中的作用及其致病机制。

1 材料和方法

1.1 细胞系与实验材料

人骨髓神经母细胞瘤细胞株 SH-SY5Y 获赠于大连医科大学基础医学院。胎牛血清 FBS (乌拉圭 Lonsera 公司), DMEM (美国 HyClone 公司), RIPA 裂解液、胰酶消化液、5 × 蛋白上样缓冲液 (上海碧云天生物技术有限公司), BCA 试剂盒 (上海雅酶生物科技有限公司), 化学发光显影液 (美国 MILLIPORE 公司), 兔多克隆抗体 α -synuclein (武汉爱博泰克生物科技有限公司), 小鼠抗 β -actin 单抗、辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG 和辣根酶标记山羊抗兔 IgG (北京中杉金桥生物技术有限公司), RNA 提取试剂盒 (德国 QIAGEN 公司), 逆转录试剂盒、RT-PCR 的酶和 ROX Reference Dye II (北京全式金生物技术有限公司), 蛋白酶抑制剂和 miRNA 的 RT 引物、上游引物及下游引物 (上海生工生物工程股份有限公司), 1-甲基-4-苯基-吡啶离子 MPP⁺ (美国 Sigma 公司), CCK-8 (日本同仁公司), Lipofectamine 2000 (美国 Invitrogen 公司), Opti-MEM 培养基 (美国 Gibco 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 将 SH-SY5Y 细胞复苏后, 用含 10% FBS 的 DMEM 培养基于 37℃、5% CO₂ 条件下培养。

1.2.2 诱导 SH-SY5Y 细胞为 PD 细胞模型

1.2.2.1 MPP⁺ 诱导 SH-SY5Y 细胞损伤 将 SH-SY5Y 细胞接种在 6 孔板内, 待细胞生长至 60% ~ 70% 时分别加入不同浓度 (0 mM、0.25 mM、0.5 mM、1 mM、2 mM, 1 mM = 1 mol/ml) MPP⁺ 的培养基培养 24 h, 取出 6 孔板, 在光学显微镜下观察 SH-SY5Y 细胞的数目和形态变化。

1.2.2.2 CCK-8 检测 MPP⁺ 对 SH-SY5Y 细胞的损伤 将 SH-SY5Y 细胞消化、重悬后调整为 1×10^5 /ml, 分别接种在 3 个 96 孔板中培养, 每孔

100 μ l, 每个 96 孔板设置 5 组, 每组 3 个复孔, 放于培养箱中培养。12 h 后, 吸去孔内液体, 每个 96 孔板的各组分别加入含不同浓度 MPP⁺ (0 mM、0.25 mM、0.5 mM、1 mM、2 mM) 的培养基。3 个 96 孔板依次培养 12 h、24 h、48 h 后吸去孔内培养基, 将 CCK-8 和培养基按照 1:10 的比例混合均匀, 各孔加入 100 μ l 的 CCK-8 和培养基的混合液, 于培养箱中孵育 2 h。然后, 在酶标仪上测定在 450 nm 下各孔的吸光度。

1.2.3 构建过表达和沉默 miR-15b 质粒 用 miR-15b 的 DNA 为模板, 设计好需要扩增片段的上下游引物后, 按照 PCR 操作步骤进行反应进行扩增重组片段, 将 PCR 产物进行凝胶电泳, 并回收 PCR 胶。选择用 Bgl II 和 BamHI 双酶切 pEGFP-C1 的质粒作为载体片段, 将重组片段和载体片段在 PCR 仪上进行重组。将 5 μ l 的重组产物加入到 50 μ l 的 DH5 α 感受细胞中, 混匀, 置冰上 30 min, 而后放于 42℃ 水浴锅中 1 min, 然后再置于冰上 2 min, 加入 500 μ l LB 培养基, 轻轻混匀, 在 37℃ 摇床中 150 rpm 摇 45 min。取 100 μ l 上述转化产物涂在含卡那霉素的 LB 平板上, 37℃ 培养箱内过夜, 挑出单克隆菌落, 在 LB 培养基中摇菌 24 h, 而后从菌落中抽提出目的质粒。

1.2.4 重组质粒转染 PD 细胞模型 将 SH-SY5Y 细胞消化、重悬后接种在 6 孔板内, 用 0.5 mM 的 MPP⁺ 诱导 24 h 后成为 PD 细胞模型, 待细胞生长至 70% 左右时进行转染。分别设置对照组、miR-15b 过表达组和 miR-15b 沉默组, 每组 3 个复孔。转染前 30 min 吸尽各孔培养基, 加入不含双抗的培养基 0.5 ml。每孔按照如下比例配制 A 液和 B 液, A 液: 1 μ l 的 Lipofectamine 2000 与 60 μ l 的 Opti-MEM 培养基混匀, 静置 5 min; B 液: 1 μ g 的质粒与 60 μ l 的 Opti-MEM 培养基混匀。将 A 液和 B 液混均后静置 20 min, 每孔滴入混合液 120 μ l, 12 h 后换液。待转染 24 h 后于倒置荧光显微镜下观察转染效果。

1.2.5 Real Time-PCR 检测各组 mRNA 表达 分别收集对照组、miR-15b 过表达组和 miR-15b 沉默组细胞, 按照 QIAGEN 公司 RNA 提取试剂盒步骤提取细胞内总 RNA。取 2 μ l 的 RNA 与 0.5 μ l 的 miR-15b 的 RT 引物混合后于 70℃ 水浴 5 min, 迅速置于冰上, 按照逆转录试剂盒操作步骤, 将 RNA 逆转录成 cDNA。之后进行 Real-time PCR 反应, 步

骤为:预变性(95 ℃,30 s)、变性(95 ℃,5 s)、退火延伸(60 ℃,34 s),40 个循环。每个样本设置 3 个复孔,重复 3 次。记录下 CT 值,计算 $\Delta\Delta CT$,用公式 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 算出 miR-15b 及 α -synuclein 的相对表达量。miR-15b 的上游引物:

5'-CACGCATAGCAGCACATC-3',下游引物:

5'-CCAGTGCAGGGTCCGAGGTA-3',RT 引物:

5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACT

GGATACGACgttaa-3'; α -synuclein 的上游引物:

5'-AGTTAGGGCTGCTGCTGAGA-3',下游引物:

5'-TCTCAGCCACTGTTGCCACA-3';内参 GAPDH 的

上游引物:5'-CTTCATTGACCTCAACTACATGG-3',

下游引物:5'-CTCGCTCTGGAAGATG-GTGAT-3'。

1.2.6 Western Blot 检测 α 突触核蛋白表达 分别收集对照组、miR-15b 过表达组和 miR-15b 沉默组细胞,用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液处理各样本,并用 BCA 法测定各样本蛋白浓度,加入 5 × 蛋白上样缓冲液,于 100 ℃ 水浴 10 min。计算 30 μ g 的蛋白样本量进行上样,经 SDS-PAGE 电泳分离后转至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h。洗膜(TBST 清洗 3 遍,每次 10 min),在一抗(兔多克隆抗体 α -synuclein,1:1 000 稀释)中 4 ℃ 孵育过夜,洗膜,二抗(辣根酶标记山羊抗兔 IgG,1:5 000 稀释)中室温孵育 2 h,洗膜,取出 PVDF 膜,滴加显影液后于化学发光成像仪上成像。运用 Image J 分析软件对蛋白电泳条带灰度值进行定量分析。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 6 和 SPSS16.0 统计学软件进行分析处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间的均数比较采用 t 检验,多组间的均数比较采用 one-way ANOVA (单因素方差分析),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 经 MPP⁺ 诱导 24 h 后 SH-SY5Y 细胞数目和形态发生了变化

不同浓度条件下 MPP⁺ 诱导 SH-SY5Y 细胞 24 h 后,随着诱导浓度的增加,细胞数目逐渐减少,细胞形态由原来的不规则的多突触形状变成了突触较少的长杆状(图 1)。说明 MPP⁺ 成功诱导了 SH-SY5Y 细胞损伤,且随着诱导浓度增加,损伤程度逐渐加重,即认为成功构建了 PD 细胞模型。

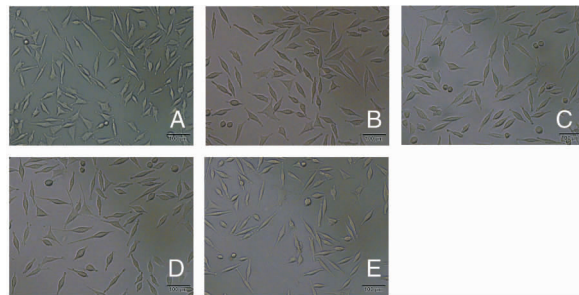


图 1 不同浓度 MPP⁺ 诱导 SH-SY5Y 细胞 24 h 后细胞数目和形态变化($\times 160$)

MPP⁺ 浓度: A:0 mM; B:0.25 mM; C:0.5 mM; D:1 mM; E:2 mM

2.2 经 MPP⁺ 诱导后 SH-SY5Y 细胞活性降低

CCK-8 结果显示(图 2),随着时间的延长,SH-SY5Y 细胞经 MPP⁺ 诱导后细胞活性逐渐降低;在相同时间点,随着 MPP⁺ 诱导浓度的升高,SH-SY5Y 细胞活性也逐渐降低。与对照组(0 mM MPP⁺)比较,0.25 mM MPP⁺ 处理组的 $F = 0.940$ 、 $P = 0.441 > 0.05$,差异无统计学意义;0.5 mM、1 mM、2 mM MPP⁺ 处理组的 F 值分别为 26.896、132.727、151.283, P 值分别为 0.001、0.000、0.000, P 值均小于 0.05,差异有统计学意义(表 1)。可以发现 MPP⁺ 浓度在 0.5 mM 时诱导 24 h 的 SH-SY5Y 细胞生长良好、生物学活性在 80% 左右,此诱导条件下的 SH-SY5Y 细胞可作为 PD 细胞模型进行下一步研究。

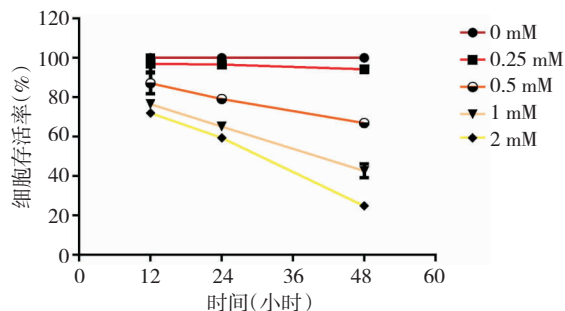


图 2 不同浓度 MPP⁺ 诱导后,SH-SY5Y 细胞在不同时间点的细胞存活率

2.3 构建过表达和沉默 miR-15b 质粒

选择用 Bgl II 和 BamHI 双酶切 pEGFP-C1 的质粒作为载体(图 3),将 miR-15b 过表达和沉默的基因片段进行重组,重组质粒中含有表达抗卡那霉素的基因。在含卡那霉素的 LB 平板上培养菌落后,

普通菌落不能繁殖,目的菌落可大量繁殖。而后挑出单克隆菌落并摇菌繁殖后抽提出目的质粒进行下一步实验。

表 1 SH-SY5Y 细胞在不同 MPP⁺ 浓度和不同时间点的细胞存活率 ($\bar{x} \pm s$) (%)

MPP ⁺ 浓度/时间	12H	24H	48H	F 值	P 值
0.25 mM	97.050 ± 4.308	96.675 ± 1.788	94.218 ± 0.947	F = 0.940	P = 0.441
0.5 mM	87.122 ± 5.374	79.102 ± 0.990	66.958 ± 2.151	F = 26.896	P = 0.001
1 mM	76.516 ± 2.271	65.113 ± 1.462	42.682 ± 3.577	F = 132.727	P = 0.000
2 mM	72.065 ± 4.951	59.480 ± 1.750	24.871 ± 2.820	F = 151.283	P = 0.000
F 值	F = 29.270	F = 528.453	F = 597.747		
P 值	P = 0.000	P = 0.000	P = 0.000		

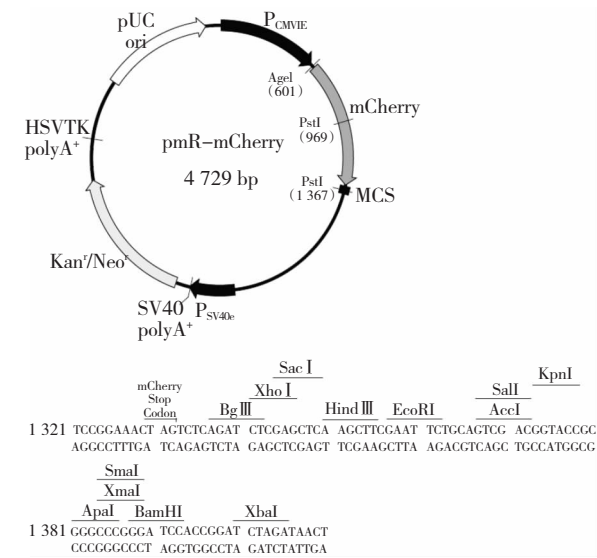


图 3 重组质粒载体示意图

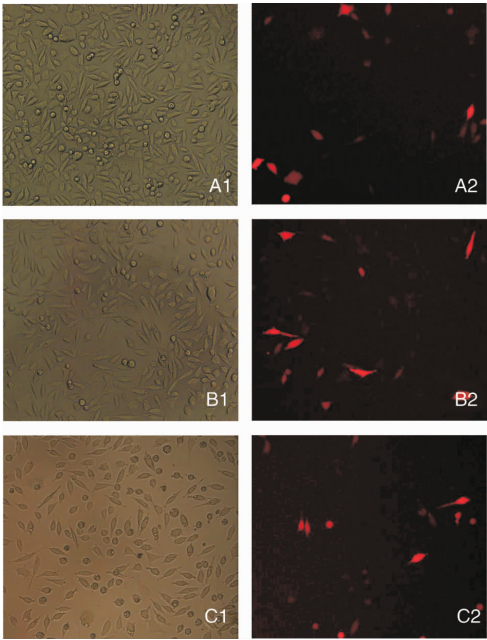


图 4 质粒转染 PD 细胞模型 (×160)

2.4 质粒转染 PD 细胞模型的效果

将质粒转染到 PD 细胞模型 24 h 后,分别在普通光学显微镜和荧光显微镜下观察细胞(图 4),可在光镜下见到生长状态良好的细胞,在荧光下见到质粒转染后红色标记的细胞,说明转染成功。

2.5 质粒转染 PD 细胞模型后 miR-15b 及 α-synuclein 表达量发生变化

Real Time-PCR 结果显示(图 5),miR-15b 的相对表达量在对照组为 1.026 ± 0.037 ,在过表达组为 19.56 ± 0.569 ,在沉默组为 0.082 ± 0.007 ;可见转染后过表达组 miR-15b 表达量上升,沉默组 miR-15b 表达量下降。α-synuclein 的相对表达量在对照组为 1.005 ± 0.064 ,在过表达组为 0.266 ± 0.022 ,在沉默组为 5.699 ± 0.254 ;可见转染后过表达组 α-synuclein 的相对表达量降低,沉默组 α-synuclein 的相对表达量升高。

A1:普通光镜下对照组 PD 细胞;A2:荧光镜下对照组 PD 细胞;B1:普通光镜下过表达组 PD 细胞;B2:荧光镜下过表达组 PD 细胞;C1:普通光镜下沉默组 PD 细胞;C2:荧光镜下沉默组 PD 细胞

2.6 Western Blot 检测 α 突触核蛋白表达变化

Western Blot 检测结果显示(图 6),α 突触核蛋白表达的特异性条带在 16KDa 位置上,通过计算灰度值,对照组 α 突触核蛋白的相对表达量为 1.007 ± 0.038 ,过表达组为 0.632 ± 0.009 ($F = 17.31, P < 0.05$),沉默组为 1.687 ± 0.064 ($F = 2.857, P < 0.05$),可见过表达组 α 突触核蛋白表达降低,沉默组 α 突触核蛋白表达升高。

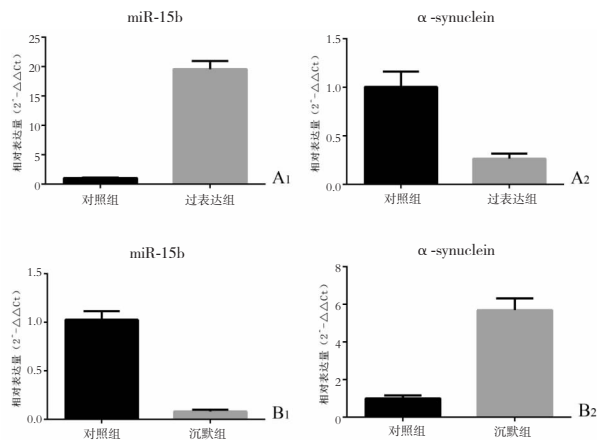


图 5 质粒转染后 PD 细胞模型内 miR-15b 及 α -synuclein 表达量变化

A1: 过表达组 miR-15b 的相对表达量 ($F = 241.5$, $P < 0.05$); A2: 过表达组 α -synuclein 的相对表达量 ($F = 8.812$, $P < 0.05$); B1: 沉默组 miR-15b 的相对表达量 ($F = 28.63$, $P < 0.05$); B2: 沉默组 α -synuclein 的相对表达量 ($F = 15.70$, $P < 0.05$)

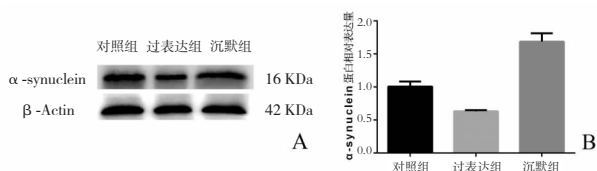


图 6 质粒转染后 PD 细胞模型内 α 突触核蛋白表达量变化

A: Western Blot 条带; B: 定量比较结果

3 讨论

帕金森病是神经系统常见的退行性疾病之一,其发病与遗传、环境、免疫异常等多种因素相关,但是其确切的发病机制仍不清楚^[7-9]。目前比较一致的观点是认为中脑黑质多巴胺能神经元变性死亡导致该病,而 α 突触核蛋白的异常积聚是损伤多巴胺能神经元的关键因素^[10]。该蛋白可通过 LAG3 蛋白介导的途径进入细胞内^[11],研究发现帕金森病患者脑脊液中的 α 突触核蛋白可通过外泌体转运到外周血中,并且血浆外泌体内的 α 突触核蛋白水平与帕金森病严重程度密切相关^[12]。可见 α 突触核蛋白在帕金森病的发病中起着关键作用,是导致该病的主要蛋白之一。

SH-SY5Y 细胞是人神经母细胞瘤细胞,具有表达儿茶酚胺能神经元特有的酪氨酸羟化酶、多巴胺

2B2 羟化酶和多巴胺转运体的能力,被广泛运用于帕金森病发病机制的研究^[13,14]。1-甲基-4-苯基-吡啶离子 MPP⁺ 具有神经毒性,可诱导 SH-SY5Y 细胞构建成 PD 细胞模型^[15],故本实验选取该细胞模型进行帕金森病体外细胞学功能研究。

研究显示,miR-15b 在帕金森病患者和健康对照者之间差异表达。Ding 等^[5]对 106 例帕金森病患者和 91 例正常对照者血清中 miRNAs 进行检测,发现帕金森病患者血清中 miR-15b 的表达量较对照者显著降低,经受试者工作特征曲线分析发现,miR-15b 可作为帕金森病诊断的生物学指标。而简雯^[6]的研究显示帕金森病患者血浆外泌体内 miR-15b 的表达量较健康对照者升高,这与 Ding 的研究结果不一致,可能与样本数过少和样本来源不同有关。Chen 等^[16]用 MPP⁺ 诱导 SH-SY5Y 细胞后进行实验,发现 SNHG1 可通过 miR-15b / SIAH1 轴调控 α 突触核蛋白的表达。这些都表明 miR-15b 与帕金森病显著相关。

本实验用 MPP⁺ 诱导 SH-SY5Y 细胞成为 PD 细胞模型,再将过表达和沉默 miR-15b 的质粒转染到 PD 细胞模型内。若过表达 miR-15b 后 α -synuclein 和 α 突触核蛋白表达升高,或者沉默 miR-15b 后 α -synuclein 和 α 突触核蛋白表达降低,则说明 miR-15b 可促进 α 突触核蛋白表达;若过表达或沉默 miR-15b 后 α -synuclein 和 α 突触核蛋白的表达无明显变化,则说明 miR-15b 不参与调控 α 突触核蛋白的表达。而本实验结果显示,过表达 miR-15b 后 α -synuclein 和 α 突触核蛋白的表达量都降低,沉默 miR-15b 后 α -synuclein 和 α 突触核蛋白的表达量都升高;这提示 miR-15b 可以抑制 α 突触核蛋白的表达。

综上所述,本研究发现 miR-15b 可以抑制 α -synuclein 的 mRNA 和 α 突触核蛋白的表达,表明 miR-15b 可能参与了帕金森病患者中脑黑质多巴胺能神经元内 α 突触核蛋白的富集调节机制,在帕金森病的发生发展中具有关键作用,这也为通过分子靶向治疗帕金森病提供了新的思路。

参 考 文 献

- [1] Recasens A, Dehay B, Bové J, et al. Lewy body extracts from Parkinson disease brains trigger α -synuclein pathology and neurodegeneration in mice and monkeys [J]. Ann Neurol, 2014, 75(3): 351-362.
- [2] Yang F, Johansson AL, Pedersen NL, et al. Socioeconomic

- status in relation to Parkinson's disease risk and mortality: A population-based prospective study [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(30): e4337.
- [3] Chuang CS, Su HL, Lin CL, et al. Risk of Parkinson disease after organophosphate or carbamate poisoning [J]. *Acta Neurol Scand*, 2017, 136(2): 129-137.
- [4] 黄星星, 韩彦青, 马久红, 等. 脑深部电刺激治疗对帕金森病患者认知功能、抑郁和焦虑的影响 [J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2018, 45(3): 261-265.
- [5] Ding H, Huang Z, Chen M, et al. Identification of a panel of five serum miRNAs as a biomarker for Parkinson's disease [J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2016, 22: 68-73.
- [6] 简雯. 帕金森病患者血浆外泌体的分离鉴定及 miRNA 表达谱分析 [D]. 南昌: 南昌大学, 2016: 1-33.
- [7] Goldman SM. Environmental toxins and Parkinson's disease [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2014, 54: 141-164.
- [8] Kalia LV, Lang AE. Parkinson's disease [J]. *Lancet*, 2015, 386(9996): 896-912.
- [9] 梁建庆. 帕金森病的发病机制、诊断标准及治疗策略 [J]. *解放军医学杂志*, 2018, 43(3): 631-635.
- [10] Aldakheel A, Kalia LV, Lang AE. Pathogenesis-targeted, disease-modifying therapies in Parkinson disease [J]. *Neurotherapeutics*, 2014, 11(1): 6-23.
- [11] Wood H. Parkinson disease: LAG3 facilitates cell-to-cell spread of α -synuclein pathology [J]. *Nat Rev Neurol*, 2016, 12(12): 678.
- [12] Shi M, Liu C, Cook TJ, et al. Plasma exosomal α -synuclein is likely CNS-derived and increased in Parkinson's disease [J]. *Acta Neuropathol*, 2014, 128(5): 639-650.
- [13] Zilocchi M, Finzi G, Lualdi M, et al. Mitochondrial alterations in Parkinson's disease human samples and cellular models [J]. *Neurochem Int*, 2018, 118: 61-72.
- [14] Xicoy H, Wieringa B, Martens GJ. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review [J]. *Mol Neurodegener*, 2017, 12(1): 10.
- [15] Xie H, Hu H, Chang M, et al. Identification of chaperones in a MPP-induced and ATRA/TPA-differentiated SH-SY5Y cell PD model [J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(12): 5659-5671.
- [16] Chen Y, Lian YJ, Ma YQ, et al. LncRNA SNHG1 promotes α -synuclein aggregation and toxicity by targeting miR-15b-5p to activate SIAH1 in human neuroblastoma SH-SY5Y cells [J]. *Neurotoxicology*, 2018, 68: 212-221.