

miR-30e-5p靶向BIM调控缺氧诱导细胞凋亡的应用研究

吴宁夏¹, 李 飞²

¹延安大学医学院, 陕西 延安

²延安大学附属医院心血管内科, 陕西 延安

收稿日期: 2024年5月14日; 录用日期: 2024年6月8日; 发布日期: 2024年6月14日

摘 要

目的: 研究miR-30e-5p与H₂O₂损伤后心肌细胞凋亡的关系, 探讨miR-30e-5p靶向BIM基因调控H₂O₂损伤后心肌细胞凋亡的作用, 为心肌梗死的诊断以及治疗提供新的靶点。方法: 将40天CA16分为正常组(N)、缺氧组(H)、过表达对照组(NC+H)、miR-30e-5p过表达组(miR+H)。N组置于正常培养箱下培养; H组置于缺氧培养箱培养24 h; NC+H组与miR+H组分别为稳定感染装载有miR-NC和miR-30e-5p的重组慢病毒后缺氧处理24 h。应用RT-qPCR检测CA16中miR-30e-5p和BIM的mRNA表达水平, 应用Caspase-3活性实验和流式细胞技术检测hiPSC-CMs的凋亡水平。利用生物信息学miRNA数据库预测miR-30e-5p的靶基因, 并应用双荧光素酶报告基因实验进行验证。结果: 1) 与N组比较, H组miR-30e-5p表达水平明显下调; 与NC+H组比较, miR+H组miR-30e-5p表达水平则明显上调。2) 与N组比较, H组Caspase-3活性水平明显升高; 与NC+H组比较, miR+H组Caspase-3活性水平下降。3) 与N组比较, H组CA16细胞凋亡比例明显上升; 与NC+H组比较, miR+H组CA16凋亡比例则明显下降。4) 与N组比较, H组蛋白BIM表达水平上调; 与NC+H组比较, miR+H组蛋白BIM表达水平下调。5) 通过miRNA数据库分析发现BIM是miR-30e-5p的潜在靶基因之一。结论: 1) miR-30e-5p调控缺氧诱导CA16的凋亡。2) BIM是miR-30e-5p的靶基因之一。3) miR-30e-5p靶向BIM调控缺氧诱导CA16的凋亡。4) miR-30e-5p在急性心肌梗死的发生、发展过程中可能发挥抑癌基因的作用。

关键词

miR-30e-5p, CA16, 抑制缺氧, 凋亡

Application Study of miR-30e-5p Targeted BIM in Regulating Hypoxia-Induced Apoptosis

Ningxia Wu¹, Fei Li²

¹Medical School of Yan'an University, Yan'an Shaanxi

文章引用: 吴宁夏, 李飞. miR-30e-5p 靶向 BIM 调控缺氧诱导细胞凋亡的应用研究[J]. 临床医学进展, 2024, 14(6): 344-352. DOI: 10.12677/acm.2024.1461782

²Department of Cardiovascular Medicine, Affiliated Hospital of Yan'an University, Yan'an Shaanxi

Received: May 14th, 2024; accepted: Jun. 8th, 2024; published: Jun. 14th, 2024

Abstract

Objective: To investigate the relationship between miR-30e-5p and myocardial cell apoptosis after H₂O₂ injury, and to explore the role of miR-30e-5p targeting BIM genes in regulating myocardial cell apoptosis after H₂O₂ injury, providing new targets for the diagnosis and treatment of myocardial infarction. **Method:** The 40 day CA16 was divided into normal group (N), hypoxia group (H), overexpression control group (NC+H), and miR-30e-5p overexpression group (miR+H). Group N was cultured in a normal incubator; Group H was incubated in a hypoxia incubator for 24 hours; The NC+H group and miR+H group were treated with hypoxia for 24 hours after stable infection with recombinant lentivirus loaded with miR-NC and miR-30e-5p, respectively. RT qPCR was used to detect the mRNA expression levels of miR-30e-5p and BIM in CA16, and Caspase-3 activity assay and flow cytometry were used to detect the apoptosis level of hiPSC-CMs. Using bioinformatics miRNA database to predict target genes of miR-30e-5p, and validating with dual luciferase reporter gene experiments. **Result:** 1) Compared with group N, the expression level of miR-30e-5p in group H was significantly down-regulated; Compared with the NC+H group, the expression level of miR-30e-5p in the miR+H group was significantly up-regulated. 2) Compared with group N, the activity level of Caspase-3 in group H was significantly increased; Compared with NC+H group, the activity level of Caspase-3 in miR+H group was decreased. 3) Compared with group N, the apoptosis ratio of CA16 cells in group H was significantly increased; Compared with NC+H group, the apoptosis ratio of CA16 in miR+H group was significantly decreased. 4) Compared with group N, BIM expression level of histone H was up-regulated; Compared with NC+H group, BIM expression level of histone in miR+H was down-regulated. 5) The analysis of miRNA database showed that BIM was one of the potential target genes of miR-30e-5p. **Conclusion:** 1) miR-30e-5p regulates apoptosis of CA16 induced by hypoxia. 2) BIM is one of the target genes of miR-30e-5p. 3) miR-30e-5p targets BIM to regulate hypoxia-induced apoptosis of CA16. 4) miR-30e-5p may play a role as a tumor suppressor gene in the occurrence and development of acute myocardial infarction.

Keywords

miR-30e-5p, CA16, Inhibition of Hypoxia, Apoptosis

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

心肌梗死是一种高发生率的疾病, 急性心肌梗死不仅发生率高, 而且致死率高, 其发生的年龄不仅局限于中老年人[1]。同时, 也具有极高的复发率, 部分患者由于就诊时已经逐渐发展到晚期以及末期, 因此患者的预后较差。因此, 需要充分了解心肌梗死发生和发展的分子机制, 以找到新的靶点以及靶向基因来改善心肌梗死的临床治疗效果[2]。部分研究表明, miRNA 在心肌梗死的发生和发展中具有重要作用, 这也进一步为心肌梗死的治疗提供了新的思路[3]。本研究探讨 miR-30e-50p 对心肌细胞凋亡的影响以及其可能的分子机制, 以期为心肌梗死的诊断和治疗提供新的靶点[4]。

2. 材料

2.1. 细胞及试剂

2.1.1. 实验细胞

CA16 细胞。

2.1.2. 主要试验试剂

人多潜能干细胞培养基、人心肌细胞分化试剂盒、人心肌细胞纯化培养基、人心肌细胞维持培养基、人心肌细胞消化液、人心肌细胞接种培养基、EDTA 传代工作液购买于北京市赛贝生物科技有限公司; Matrigel 基质胶、 α -actinin 抗体、心肌钙蛋白 T (cTnT) 抗体、Alexa Fluor 594 山羊抗鼠 IgG、Alexa Fluor 488 山羊抗兔 IgG、DAPI 抗荧光衰减封片试剂、DEPC 处理水、cDNA 逆转录试剂盒、SYBR Green I RT-qPCR 试剂盒、Caspase-3 活性检测试剂盒、载体 psiCHECK-2 Promega、大肠杆菌菌株 DH5 α 、限制性内切酶、质粒 DNA 小、大量抽提试剂盒、凝胶回收试剂盒、琼脂糖、琼脂粉、DNA ladder、一次性平皿、Flask、移液管、耗材(EP 管、PCR 管、枪头等)、载体 pHBAAV-U6-ZsGreen、T4 连接酶、Fluo-4, AM 钙荧光探针 Fluo-4, AM、不含钙 HBSS 溶液、RIPA 裂解液、DEPC、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、脱脂牛奶、十二烷基磺酸钠(SDS)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、TEMED、Loading Buffer 缓冲液、ECL 化学发光试剂盒、考马斯亮蓝染色液、兔抗人 GAPDH 抗体、兔抗人 Bax 抗体、兔抗人 Bcl2 抗体、兔抗人 Caspase-3 抗体、FITC Annexin V 细胞凋亡试剂盒。

2.1.3. 主要试验仪器

-80℃冰箱、超净工作台、37℃恒温细胞培养箱、移液枪、离心管、细胞培养皿、共聚焦显微镜、倒置显微镜、电热恒温水浴箱、台式高速离心机、流式细胞仪、NanoDrop2000 微量分光光度计、光吸收酶标仪、实时荧光定量 PCR 仪、PCR 热循环仪、凝胶成像仪稳压 DNA 电泳仪、低温循环水浴、生物安全柜、凝胶成像系统、生化培养箱、电泳仪、转膜仪、细胞培养箱、流式管、大型冷冻高速离心机、微量移液器。

3. 方法

3.1. 细胞培养

将细胞置于 5% CO₂、37℃环境下培养。

3.2. 细胞分组

将处于对数生长期的心肌细胞的 CA16 分为正常组(N)、缺氧组(H)、过表达对照组(NC+H)以及 miR-30e-5p+H 组(miR+H)。正常组置于正常条件下培养 24 h, 缺氧组用 H₂O₂ 处理后置于正常条件下培养; 过表达对照组(NC+H)以及 miR-30e-5p+H 组(miR+H)组分别被慢病毒感染, 将(NC+H)组置于正常条件下培养, 而将(miR+H)用 H₂O₂ 缺氧处理后置于正常条件下培养(正常条件: 5% CO₂ 的 37℃培养箱中)。

3.3. 诱导缺氧处理

H₂O₂ 诱导处理。

3.4. 慢病毒感染心肌细胞

提前准备好用于感染的接种于 96 孔板的 293T 细胞和目的质粒。37℃, 5% CO₂ 培养。感染 6 h 后更换新的培养基, 感染 24 h 后收集细胞检测[5]。

3.5. qRT-PCR 实验

将不同处理和转染 24 h 后的细胞,通过胰酶消化的作用,收集细胞沉淀后加入 Trizol 提取其全部 RNA,经定量后逆转录为 cDNA,在 PCR 分析仪上进行实时荧光定量 PCR 扩增。

3.6. 细胞凋亡实验

转染 24 h 后各组细胞用不含 EDTA 的胰酶消化(胰酶消化不宜过长,否则容易引起假阳性),2000 r/min 离心 5 min 后收集细胞;用 PBS 洗涤细胞两次(2000 r/min 离心 5 min)收集 $1\sim5 \times 10^5$ 细胞;加入 500 uL 的 Binding Buffer 悬浮细胞;先加入 5 uL Annexin V-FITC 混匀室温、避光、反应 5 min 后,加入 5 uL Propidium Iodide 混匀再室温、避光、反应 10 min;1 h 内,进行流式细胞仪的观察和检测[6]。

3.7. 慢病毒感染心肌细胞

感染前一天接种,将心肌细胞接种到 6 孔板中,培养 2~3 天待心肌细胞活性功能恢复。细胞数密度约 40%~60%间为宜。设置不同 MOI 值的感染组,分别设立 MOI 值为 3, 10, 20, 50, 100 的感染组别,每组各做两个复孔,一孔中加入终浓度为 5 $\mu\text{g/ml}$ 的 Polybrene,另一组不加。Polybrene 可以促进病毒对细胞的侵染,但对部分类型细胞有损失作用。待感染 24 小时后,将原培养上清液丢掉,更换为新鲜的培养基。待感染 3~4 天后,在荧光显微镜下观察细胞感染情况,成功被感染的细胞会表达绿荧光。通过显微镜拍照目测估计或是根据图片数数计算,估计感染效率,以确定最佳感染复数 MOI 的值。待感染 72 小时后,将培养皿置于荧光显微镜下检测心肌细胞 GFP 荧光表达效率[7]。

3.8. Caspase-3 活性检测

将 96 孔板置于 37℃ 阴暗处孵育 1~2 小时。待发现颜色变化比较明显时,设置酶标仪进行检测 96 孔板中在 405 nm 下的 OD 值。如果信号强度变化不明显,则可以适当延长孵育时间直至 96 孔板的颜色加深、信号增强。应用公式算出样品中 Caspase-3 催化产生的 pNA 产生的吸光度。通过标准曲线的对比就可以计算出样品中催化产生 pNA 的量。最后计算出一个待测样品单位重量蛋白中所含的 Caspase-3 的酶活性单位[8]。

3.9. 数据库预测靶基因

3.9.1. miR-30e-5p 靶基因的预测

进入 star Base 2.0 (<http://starbase.sysu.edu.cn/index.php>),选择“miRNA-mRNA”表单下的“miRNA-target interactions”功能,在“Intersections from different prediction programs”栏目下选择,miRNA: 选择 hsa-miR-30e-5p; - Number of supporting Experiments>= : 选择“high stringency(>=3)”; - Number of Cancer Types (Pan-Cancer)>= : 选择“1 cancer type”; - Program Number>= : 选择“3 prediction software”,将所得数据生成 excel 文件进行存储。

3.9.2. GEO 数据库筛选急性心肌梗死中上调基因

进入 GEO (Gene Expression Omnibus)数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>),输入 AMI,得到一系列 GEO Data Sets 后,筛选样本量比较大的表达谱数据,通过 RStudio 对芯片数据进行分析,首先定义和选择 - TUMOR GROUP,然后定义和选择“NORMAL GROUP”,进行 GEO2R 分析后将得到数据生成 excel 文件进行保存。认为某基因 $\log_{2}FC > 1$ 时,即差异倍数大于 2 时,在急性心肌梗死中表达上调。

3.9.3. miR-30e-5p 在心肌梗死中靶基因的预测

前期实验提示 miR-30e-5p 在急性心肌梗死中呈低表达趋势,细胞生物学功能实验证明 miR-30e-5p

在急性心肌梗死中起抑制凋亡功能。因此, 推测 miR-30e-5p 的靶基因能促进急性心肌梗死发生、发展, 在急性心肌梗死中呈高表达趋势将 star Base 2.0 预测出的 miR-30e-5p 靶基因与 GEO 得到的在急性心肌梗死中表达上调的基因取交集得到的可能是 miR-30e-5p 在急性心肌梗死中的靶基因。

3.10. 统计学数据处理

实验数据结果应用 SPSS 28.0 统计分析软件进行分析; 定量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{X} \pm S$)表示; 对计量资料进行正态性及方差齐性检验, 两组间比较采用独立相关 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 多组间两两比较采用 LSD 检验, 检验水准(α)以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

4. 实验结果

4.1. miR-30e-5p 的表达水平

选取缺氧 24 h 为时间节点进行进一步研究, 经过缺氧处理后, 将 N 组与 H 组进行比较, H 组中 miR-30e-5p 表达水平明显下调($P < 0.05$); 经过感染过表达 miR-30e-5p 慢病毒后, 将 NC+H 组与 miR+H 两组进行比较, miR+H 组 miR-30e-5p 表达水平则显著上调($P < 0.05$)。表明成功构建 miR-30e-5p 过表达模型, 具体数据见图 1。

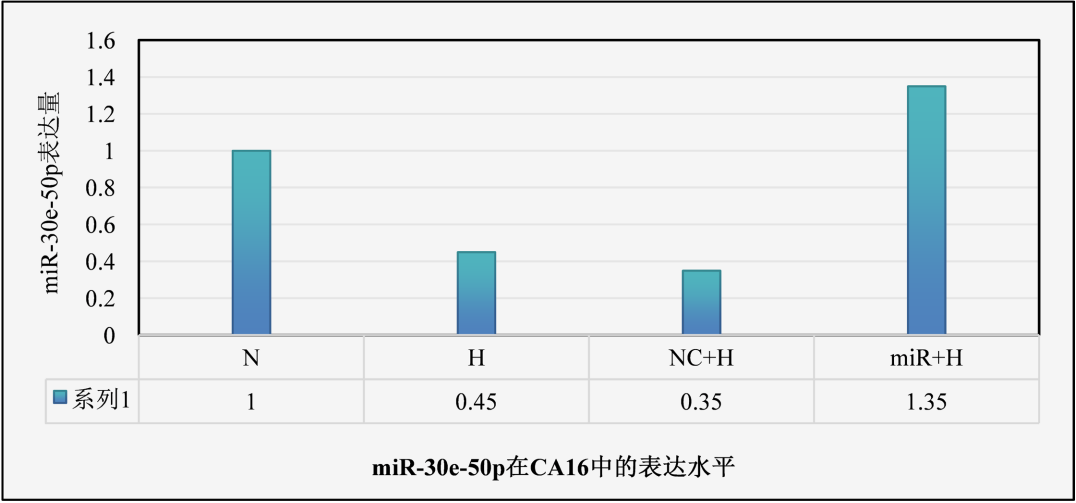


Figure 1. Expression levels of miR-30e-5p in CA16
图 1. miR-30e-5p 在 CA16 中的表达水平

4.2. Caspase-3 的活性水平

采用 Caspase-3 活性检测实验初步探讨缺氧诱导后 CA16 的凋亡水平, 结果如图所示, 与 N 组比较, 缺氧处理后 H 组 Caspase-3 活性水平明显升高($P < 0.05$); 而经过感染过表达 miR-30e-5p 慢病毒后, 与 NC+H 组比较, miR+H 组 Caspase-3 活性水平下降($P < 0.05$), 表明凋亡水平有所缓解, 具体见图 2。

4.3. CA16 的凋亡水平

我们采用细胞凋亡试剂盒应用流式技术, 进一步检测 CA16 的凋亡水平, 结果和 Caspase-3 活性水平结果一致。如图所示, 与 N 组比较, H 组 CA16 凋亡比例明显上升($P < 0.05$); 而经过感染过表达 miR-30e-5p 慢病毒后, 与 NC+H 组比较, miR+H 组 CA16 凋亡比例则明显下降($P < 0.05$), 具体见图 3。

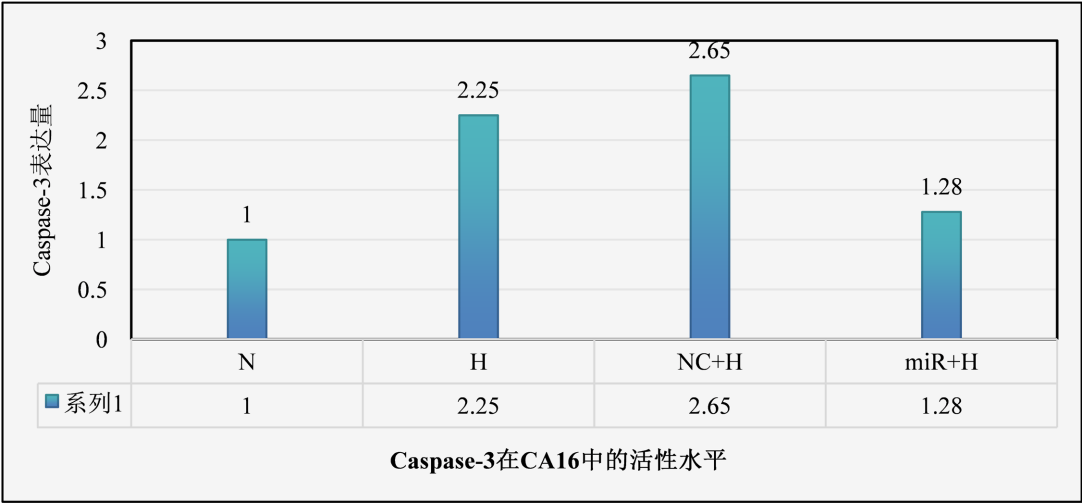


Figure 2. Activity level of Caspase-3 in CA16
图 2. Caspase-3 在 CA16 中的活性水平

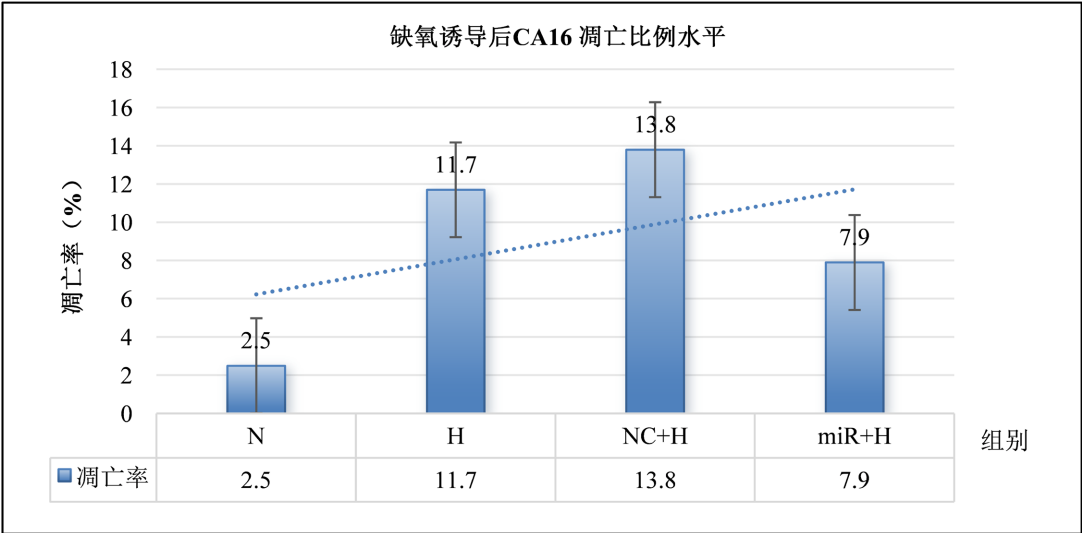


Figure 3. Proportional level of CA16 apoptosis after hypoxia induction
图 3. 缺氧诱导后 CA16 凋亡比例水平

4.4. miR-30e-5p 的靶基因预测分析

为进一步探讨 miR-30e-5p 调控缺氧诱导 CA16 凋亡的相关机制, 对 miR-30e-5p 的靶基因进行研究。生物信息学 miRNA 数据库预测分析结果显示, BIM 可能为 miR-30e-5p 潜在靶基因之一。通过进一步比对 miR-30e-5p 和 BIM 的序列, 我们发现两者存在潜在结合位点, 并查阅相关文献和数据库, 证实 BIM 在心肌细胞中大量表达并且与凋亡及自噬机制相关。因此, 有理由猜测 BIM 可能是 miR-30e-5p 调控心肌细胞凋亡的一个重要靶点, 具体见表 1。

4.5. 生物信息学证实 BIM 是 miR-30e-5p 的靶基因

通过 GEO 数据库分析相关数据集后, 结果提示 miR-30e-50p 在心肌梗死中是一条重要的通路, 而 BIM 可以被 miR-30e-50p 靶向调控进而影响心肌梗死的发生发展。

Table 1. Predictive analysis of target genes of miR-30e-5p
表 1. miR-30e-5p 的靶基因预测分析

Symbol	logFC	P.Value	adj.P.Val	Change
BCL6	1.736375075	1.05E-09	3.79E-07	UP
S0CS3	0.725141695	6.75E-08	1.12E-05	UP
BCL2L11	0.681170299	0.000779916	0.017118994	UP
VIM	0.859319848	0.004612564	0.05799139	UP
AG02	0.643522517	0.004907579	0.060665128	UP
KRAS	0.703339294	0.015094434	0.125921298	UP

5. 讨论

本实验通过 CA16 细胞用 H_2O_2 诱导缺氧损伤后所建立的模型检测 miR-30e-5p 及凋亡表达水平变化情况, 通过实验分析发现, 在 CA16 心肌细胞被缺氧处理后 12 h、24 h、36 h 以及 48 h 的四个不同时间段内, miR-30e-50p 的表达水平是不同的[9]。随着缺氧程度的加重, miR-30e-50p 的表达量逐渐下降, 也即 miR-30e-50p 的表达量与心肌梗死的程度成反比, 心肌梗死的程度越重, miR-30e-50p 的表达量越少[10]。同时, 在缺氧处理 48 h 后, CA16 细胞的凋亡水平更高, miR-30e-5p 表达水平明显下调。本项目组通过选取缺氧诱导后的 24 h 作为观察时间点进行下一步研究, 在用慢病毒进行感染细胞构建重组细胞之后, 发现 CA16 细胞的凋亡水平明显下调, 这也就从另一方面反应出 miR-30e-50p 可以改善缺氧对 CA16 所造成的影响, 即改善 CA16 的凋亡水平[11]。

随着生物信息学技术的发展, 越来越多的实验以及报告发现“凋亡”这一机制在多种心血管疾病的发生以及进展的过程中发挥着关键的作用, 抑制“凋亡”以及“自噬”有望成为心血管疾病的治疗最新靶点[12]。本项目组在综合实验以及生物信息学数据库的基础之上发现 miR-30e-50p 在诱导 CA16 凋亡损伤中发挥关键作用, 同时根据 GEO 数据库分析“GSE48060”这一数字矩阵分析预测靶向基因, 结果表明以及证实 BIM 为 miR-30e-5p 的靶基因之一[13]。而 BIM 不仅能联合其他基因对生物分子通路产生影响, 而且又能独立地产生作用, 对多系统的多种疾病中均有相关的作用, 而在本实验中同样发现, BIM 在缺氧诱导 CA16 凋亡过程中具有重要作用。缺氧诱导后的 CA16 细胞中 BIM 水平明显升高, 而当 miR-30e-50p 过表达后, BIM 水平又明显下降, CA16 的凋亡水平又同样明显下降, CA16 细胞凋亡水平恢复正常[14]。

本课题组在结合生物信息学的基础之上虽然证实 miR-30e-50p 可以抑制 BIM 进而抑制 H_2O_2 作用后的 CA16 细胞的凋亡[15], 但是本课题组仍然存在一定程度的局限性: 首先, 部分研究已经表明仍然存在其他靶向基因相互影响, 不排除这些靶基因也参与了 H_2O_2 所诱导的缺氧[16]; 同时, 根据宿主的不同, 这些基因所产生的效应也是不同的; 最后, 需要明确的是本项目组的实验属于体外, 而且所使用的样本比较单一, 因此在未来需要更进一步的探索以及研究[17]。

综上所述, 针对本课题组经过实验研究以及分析后所得出的结论: miR-30e-50p 以及靶基因 BIM 与缺氧后 CA16 的凋亡密切相关, miR-30e-5p 能靶向 BIM 进而调控缺氧诱导的 CA16 的凋亡。而 BIM 如何调控 H_2O_2 缺氧诱导的心肌细胞的凋亡的具体分子机制有待进一步研究[18]。

致 谢

感谢我的导师对我的指导, 感谢评阅论文的老师们在百忙之中给予我的宝贵意见。

基金项目

延安大学 2023 年研究生教育创新计划项目(YCX2023117)。

参考文献

- [1] Ashiqueali, S.A., Chaudhari, D., Zhu, X., Noureddine, S., Siddiqi, S., Garcia, D.N., *et al.* (2024) Fisetin Modulates the Gut Microbiota Alongside Biomarkers of Senescence and Inflammation in a Dss-Induced Murine Model of Colitis. *GeroScience*, **46**, 3085-3103. <https://doi.org/10.1007/s11357-024-01060-z>
- [2] Dakroub, F., Kobeissy, F., Mondello, S., Yang, Z., Xu, H., Sura, L., *et al.* (2024) Micrnas as Biomarkers of Brain Injury in Neonatal Encephalopathy: An Observational Cohort Study. *Scientific Reports*, **14**, Article No. 6645. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-57166-z>
- [3] Escate, R., Padró, T., Pérez de Isla, L., Fuentes, F., Alonso, R., Mata, P., *et al.* (2024) Circulating miR-6821-5p Levels and Coronary Calcification in Asymptomatic Familial Hypercholesterolemia Patients. *Atherosclerosis*, **392**, Article 117502. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2024.117502>
- [4] Mao, W.P., Zhang, L., Wang, Y.D., Sun, S., Wu, J.P., Sun, J., *et al.* (2023) Cisplatin Induces Acute Kidney Injury by Downregulating miR-30e-5p That Targets Galnt3 to Activate the AMPK Signaling Pathway. *Environmental Toxicology*, **39**, 1567-1580. <https://doi.org/10.1002/tox.24054>
- [5] Ge, Y.W., Hong, M., Zhang, Y., Wang, J.C., Li, L., Zhu, H.K., *et al.* (2023) miR-30e-5p Regulates Leukemia Stem Cell Self-Renewal through the Cyb561/ROS Signaling Pathway. *Haematologica*, **109**, 411-421. <https://doi.org/10.3324/haematol.2023.282837>
- [6] Zheng, L., Chopra, A., Weiner, J., Beule, D., Dommisch, H. and Schaefer, A.S. (2023) miRNAs from Inflamed Gingiva Link Gene Signaling to Increased MET Expression. *Journal of Dental Research*, **102**, 1488-1497. <https://doi.org/10.1177/00220345231197984>
- [7] Wu, T., Yang, Z.Y., Chen, W.C., Jiang, M.J., Xiao, Z.C., Su, X., *et al.* (2023) miR-30e-5P-Mediated FOXD1 Promotes Cell Proliferation by Blocking Cellular Senescence and Apoptosis through p21/CDK2/Rb Signaling in Head and Neck Carcinoma. *Cell Death Discovery*, **9**, Article No. 295. <https://doi.org/10.1038/s41420-023-01571-2>
- [8] Pinazo-Durán, M.D., Zanón-Moreno, V., García-Villanueva, C., Martucci, A., Peris-Martínez, C., Vila-Arteaga, J., *et al.* (2023) Biochemical-molecular-genetic Biomarkers in the Tear Film, Aqueous Humor, and Blood of Primary Open-Angle Glaucoma Patients. *Frontiers in Medicine*, **10**, Article 1157773. <https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1157773>
- [9] Ingelson-Filpula, W.A., Hadj-Moussa, H. and Storey, K.B. (2023) Microna Transcriptomics in Liver of the Freeze-Tolerant Gray Tree Frog (*Dryophytes versicolor*) Indicates Suppression of Energy-Expensive Pathways. *Cell Biochemistry and Function*, **41**, 309-320. <https://doi.org/10.1002/cbf.3783>
- [10] Liu, Z.L., Guo, S.W., Yan, D.M., Bai, Y.H., Song, Z.Y. and Liu, X.Z. (2023) Circular RNA circFAT1(e2) Facilitates Cell Progression through the miR-30e-5P/MYBL2 Pathway in Glioma. *Disease Markers*, **2023**, 1-17. <https://doi.org/10.1155/2023/7418365>
- [11] Liao, Y., Cai, H., Luo, F., Li, D., Li, H., Liao, G., *et al.* (2023) Three Nervous System-Specific Expressed Genes Are Potential Biomarkers for the Diagnosis of Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis through a Bioinformatic Analysis. *BMC Medical Genomics*, **16**, Article No. 15. <https://doi.org/10.1186/s12920-023-01441-x>
- [12] Zhang, X., Ma, Y., Zhou, F., Zhang, M., Zhao, D., Wang, X., *et al.* (2022) Identification of miRNA-mRNA Regulatory Network Associated with the Glutamatergic System in Post-Traumatic Epilepsy Rats. *Frontiers in Neurology*, **13**, Article 1102672. <https://doi.org/10.3389/fneur.2022.1102672>
- [13] Ding, Y., Chen, Y., Yang, X., Xu, P., Jing, J., Miao, Y., *et al.* (2022) An Integrative Analysis of the lncRNA-miRNA-mRNA Competitive Endogenous RNA Network Reveals Potential Mechanisms in the Murine Hair Follicle Cycle. *Frontiers in Genetics*, **13**, Article 931797. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.931797>
- [14] Yin, X., Wang, M., Wang, W., Chen, T., Song, G., Niu, Y., *et al.* (2022) Identification of Potential miRNA-mRNA Regulatory Network Contributing to Parkinson's Disease. *Parkinson's Disease*, **2022**, Article 2877728. <https://doi.org/10.1155/2022/2877728>
- [15] Song, H., Xu, N. and Jin, S. (2022) miR-30e-5p Attenuates Neuronal Deficit and Inflammation of Rats with Intracerebral Hemorrhage by Regulating TLR4. *Experimental and Therapeutic Medicine*, **24**, Article No. 492. <https://doi.org/10.3892/etm.2022.11419>
- [16] Belmonte, T., Perez-Pons, M., Benítez, I.D., Molinero, M., García-Hidalgo, M.C., Rodríguez-Muñoz, C., *et al.* (2024) Addressing the Unsolved Challenges in Microna-Based Biomarker Development: Suitable Endogenous Reference Micrnas for SARS-CoV-2 Infection Severity. *International Journal of Biological Macromolecules*, **269**, Article 131926. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.131926>

- [17] Mazumder, S., Basu, B., Ray, J.G. and Chatterjee, R. (2023) miRNAs as Non-Invasive Biomarkers in the Serum of Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) and Oral Potentially Malignant Disorder (OPMD) Patients. *Archives of Oral Biology*, **147**, Article 105627. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2023.105627>
- [18] Lv, J., Hao, Y.N., Wang, X.P., Lu, W.H., Xie, L.Y. and Niu, D. (2023) Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomal miR-30e-5p Ameliorates High-Glucose Induced Renal Proximal Tubular Cell Pyroptosis by Inhibiting ELAVL1. *Renal Failure*, **45**, Article 2177082. <https://doi.org/10.1080/0886022X.2023.2177082>