

波动高糖诱导肾小管上皮细胞转分化 差异表达miRNAs分析

曹罗元 黄宝英* 富显果 杨菁 林峰

(福建医科大学附属宁德市医院, 宁德 352100)

摘要 采用miRCURY™基因芯片(v.16.0)分析波动高糖诱导肾小管上皮细胞转分化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)差异表达miRNAs, 设定平均上升或下降倍数大于2倍和 $P<0.05$ 为差异标准。结果发现, 基因芯片分析中49个miRNAs表达显著上调, 其中6个基因已证实肾纤维化过程中表达升高; 34个miRNAs表达显著下调, 其中8个已报道在肾纤维化中表达降低。通过荧光定量PCR(RT-qPCR)验证, 结果显示, 基因芯片与RT-qPCR两方法分析的结果呈高度相关($r=0.98$, $P<0.01$)。miRNAs差异表达与波动高糖诱导肾小管上皮细胞转分化过程密切相关, 且基因芯片与RT-qPCR结果一致, 以期为肾纤维化早期诊断与治疗提供新的靶点。

关键词 miRNAs; 转分化; 肾小管上皮细胞; 波动高糖; 基因表达谱

Analysis of Aberrantly Expressed MiRNAs in Intermittent High Glucose Induced Renal Epithelial-Mesenchymal Transition

Cao Luoyuan, Huang Baoying*, Fu Xianguo, Yang Jing, Lin Feng

(The Affiliated Ningde Municipal Hospital of Fujian Medical University, Ningde 352100, China)

Abstract The miRCURY™ microRNA chip (v.16.0) was used to evaluate miRNA expression levels between intermittent high glucose-induced renal epithelial-mesenchymal-transition (EMT) cells and normal group cells; an average change more than 2-fold ($P<0.05$) was set as a standard variance level. The results showed that 49 miRNAs were upregulated and 6 miRNAs were reported in renal EMT; 34 miRNAs were downregulated in intermittent high glucose-induced renal EMT cells and 8 miRNAs were reported in renal EMT. RT-qPCR was used to verify the miRCURY™ microarray results and the Pearson correlation of relative miRNAs expression levels was analyzed by miRCURY™ microarray vs RT-qPCR ($r=0.98$, $P<0.01$). The results of miRCURY™ microarray are accordant with those of RT-qPCR, which indicates that miRNAs may play a role in intermittent high glucose-induced renal EMT process. These results provide a novel therapy and early diagnosis target against renal EMT process.

Key words miRNAs; epithelial-mesenchymal transition; HK-2; intermittent high glucose; gene profile

肾纤维化是慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)发展至终末期肾脏病的共同途径, 最终导致肾

脏功能的持续进行性下降。虽然其机制研究已获得一些进展, 但早期诊断和治疗手段仍有限。肾纤维

收稿日期: 2013-04-23 接受日期: 2013-05-13

福建省自然科学基金项目(批准号: 2012J01435)、宁德市科技计划项目(批准号: 20120028)和福建省卫生厅青年科研课题(批准号: 2013-1-50)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0593-2822372, E-mail: doctor_hby@aliyun.com

Received: April 23, 2013 Accepted: May 13, 2013

This work was supported by the Fujian Science and Technology Project of Nature Science Foundation (Grant No.2012J01435), the Ningde Planning Project of Science and Technology (Grant No.20120028) and Research Foundations for Young Scholars, Health Department of Fujian Province (Grant No.2013-1-50)

*Corresponding author. Tel: +86-593-2822372, E-mail: doctor_hby@aliyun.com

网络出版时间: 2013-07-31 16:14 URL: http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130731.1614.002.html

化的早期诊断是延缓和防治CKD进展的关键,但肾纤维化早期临床病症不明显,不易被检出,目前临床上对肾纤维化的诊断仍以肾组织病理活检为主,肾活检不仅具有创伤性,而且不易反复操作、难以获得连续纤维化指标数据,以监测进程和评价疗效;因此,探寻一个无创伤性、易于连续监测且能准确反映肾纤维化进程的客观评价指标是肾纤维化早期诊断和防治CKD的关键。

MicroRNAs(miRNAs)是后转录调节基因,参与人类基因组中约30%的基因调控,在细胞增殖分化、代谢凋亡等方面起重要的调节作用。miRNAs分子表达水平的改变一般先于疾病的发生,而且miRNAs的表达具有组织特异性,疾病状态下miRNAs出现差异表达,这为miRNAs作为肾纤维化早期诊断指标奠定了理论基础^[1-6];近年来研究发现,miRNAs在肾纤维化方面发挥着重要作用^[7-11],可能成为肾纤维化早期诊断和治疗的新靶点。

本课题组研究发现,波动性高糖对肾小管上皮细胞的损伤效应强于持续性高糖^[12],因此,本研究通过波动性高糖建立肾小管上皮细胞转分化模型,采用miRCURY™基因芯片(v.16.0)分析波动性高糖诱导肾小管上皮细胞转分化差异表达miRNAs,以探寻肾纤维化早期诊断与治疗的miRNAs靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

人近端小管上皮细胞系HK-2购自美国ATCC公司。

1.2 试剂及仪器

培养基D-MEM/F12、胰蛋白酶(Trypsin)、胎牛血清购自Gibco公司,D-glucose购自Sigma公司,TRIzol试剂盒购自Invitrogen公司,miRCURY™ Hy3™/Hy5™标记试剂盒购自Exiqon公司,RNeasy mini试剂盒购自Qiagen公司。miR-29a、miR-15a、miR-205*、miR-30a、miR-32*、miR-21、miR-200c、miR-4258实时定量PCR(RT-qPCR)引物、内参U6由上海康成生物技术公司合成。

Rotor-Gene 3000 Realtime PCR仪及Rotor-gene 6.0购自澳大利亚Corbett Research公司,NanoDrop-1000仪购自德国NanoDrop技术公司,2100 Bioanalyzer仪

购自美国安捷伦公司,Axon GenePix 4000B microarray scanner购自美国AXON公司。25 cm²培养瓶和细胞培养板购自美国Corning公司,研究型倒置显微镜购自日本Olympus公司。

1.3 细胞培养与建模

HK-2细胞培养于D-MEM/F12培养基中,内含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素,细胞融合达到70%左右,无血清培养基饥饿培养12 h后,HK-2细胞分为正常糖组(NG, D-Glucose 5.5 mmol/L)和波动性高糖组(IHG, D-Glucose 5.5 mmol/L与D-Glucose 25 mmol/L交替培养,波动周期为12 h),培养4 d。所有分组均在37 °C、5.0% CO₂培养箱中培养。

波动性高糖诱导肾小管上皮细胞转分化的判断方法为:免疫细胞化学检测β-catenin表达,Western blot检测β-catenin、α-SMA、CK18与E-cadherin表达^[12]。

1.4 总RNA抽提

采用Invitrogen公司的Trizol和Qiagen公司的miRNeasy mini试剂盒抽提总RNA,利用NanoDrop-1000仪分别测定样品RNA的D₂₆₀与D₂₈₀的吸光度值,D₂₆₀/D₂₈₀比值为1.9~2.1。RNA的完整性由凝胶电泳18S、28S判定。

1.5 MicroRNA基因芯片检测

采用miRCURY™ Hy3™/Hy5™试剂盒(Exiqon),波动性高糖组标记Hy3™荧光,正常组标记Hy5™荧光。在荧光标记后,按miRCURY™(Exiqon)芯片操作手册进行杂交。

1.6 基因芯片原始数据的收集和分析

MicroRNAs芯片杂交后,用Exiqon洗脱缓冲液洗数次,400 r/min离心5 min,然后干燥。用Axon GenePix 4000B microarray scanner(Axon)进行扫描,删除非特异性的杂交信号,收集每个杂交点的信号强度数据,减去信号背景,采用Lowess回归算法,减少Hy5与Hy3染料之间的差异。将扫描得到的图像输入GenePix Pro 6.0(Axon)软件进行坐标调整和数据提取。芯片之间的数据处理,采用scale标化算法,减少不同样本间差异,重复的miRNAs数据取均数,选出在所有样品中强度均≥50的miRNAs计算标准化因子。表达数据使用中位数标准化,显著差异表达的miRNAs通过Fold Change过滤后确认。使用MEV 4.6软件(TIGR)进行聚类分析。

1.7 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)验证

利用定量RT-qPCR试剂盒,将40 ng总RNA反转录成cDNA模板;采用Rotor-Gene 3000 Real-time PCR仪进行miRNAs的定量分析。反应体系为20 μ L: 2 \times Mix SYBR Green I荧光反应液10 μ L,上、下游引物(10 μ mol/L)各0.25 μ L,样品模板1 μ L,用无RNA酶水补足20 μ L体系,每组设3个复孔。反应条件为:95 $^{\circ}$ C预变性5 min;95 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 20 s,72 $^{\circ}$ C 20 s,共40个循环,绘制扩增曲线;40个循环后对60 $^{\circ}$ C到95 $^{\circ}$ C整个升温过程进行全程荧光信号收集,绘制熔解曲线。反应结束得到各反应管循环阈值(threshold cycle, Ct)。对获得的Ct值采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对基因表达进行相对定量。

1.8 统计学处理

实验结果表示为均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$),采用SPSS 18.0统计软件,配对t检验确定两组间数据是否存在统计学差异。在进行聚类分析之前,miRNA的数据均值标准化为0,标准偏差为1。采用平均连锁(average linkage)和泊尔松(Pearson)相关性算法,所有不同样本的数据将形成一个树形目录。对于任何一个miRNA基因,采用相似对角矩阵的计算方法,从而确定所有基因表达的相似分数,构建基因Cluster聚类分析图, $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 总RNA质量鉴定

样品提取的总RNA,经NanoDrop-1000仪测定 D_{260}/D_{280} 为1.9~2.1。琼脂糖凝胶电泳后,28S、18S的RNA呈现锐利、明亮清晰条带,28S条带亮度约为18S条带亮度的2倍,结果表明样品的总RNA质量可靠,满足后续实验需要(图1)。

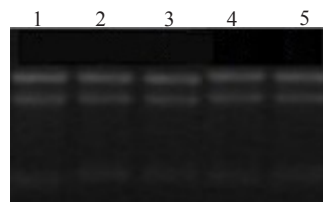
2.2 差异表达分析

miRCURYTM基因芯片(v.16.0)分析波动性高糖诱导肾小管上皮细胞转分化的细胞和正常组细胞差异表达miRNAs,结果显示,49个miRNAs表达显著上调和34个miRNAs显著下调。

表达显著上调的49个miRNAs中,其中有6个miRNAs在以往研究中证实与肾纤维化密切相关,分别为:miR-93、miR-30d、miR-32*、miR-200c、miR-296-5p和miR-2058*(表1)。

表达显著下调的34个miRNAs中,其中有8个

miRNAs在以往研究中证实与肾纤维化密切相关,分别为:miR-130a、miR-155、miR-29a、miR-15b、miR-34a、miR-15a、miR-30a和miR-21(表2)。



1,2: 正常组;3,4,5: 波动性高糖组。

1,2: NG groups; 3,4,5: IHG groups.

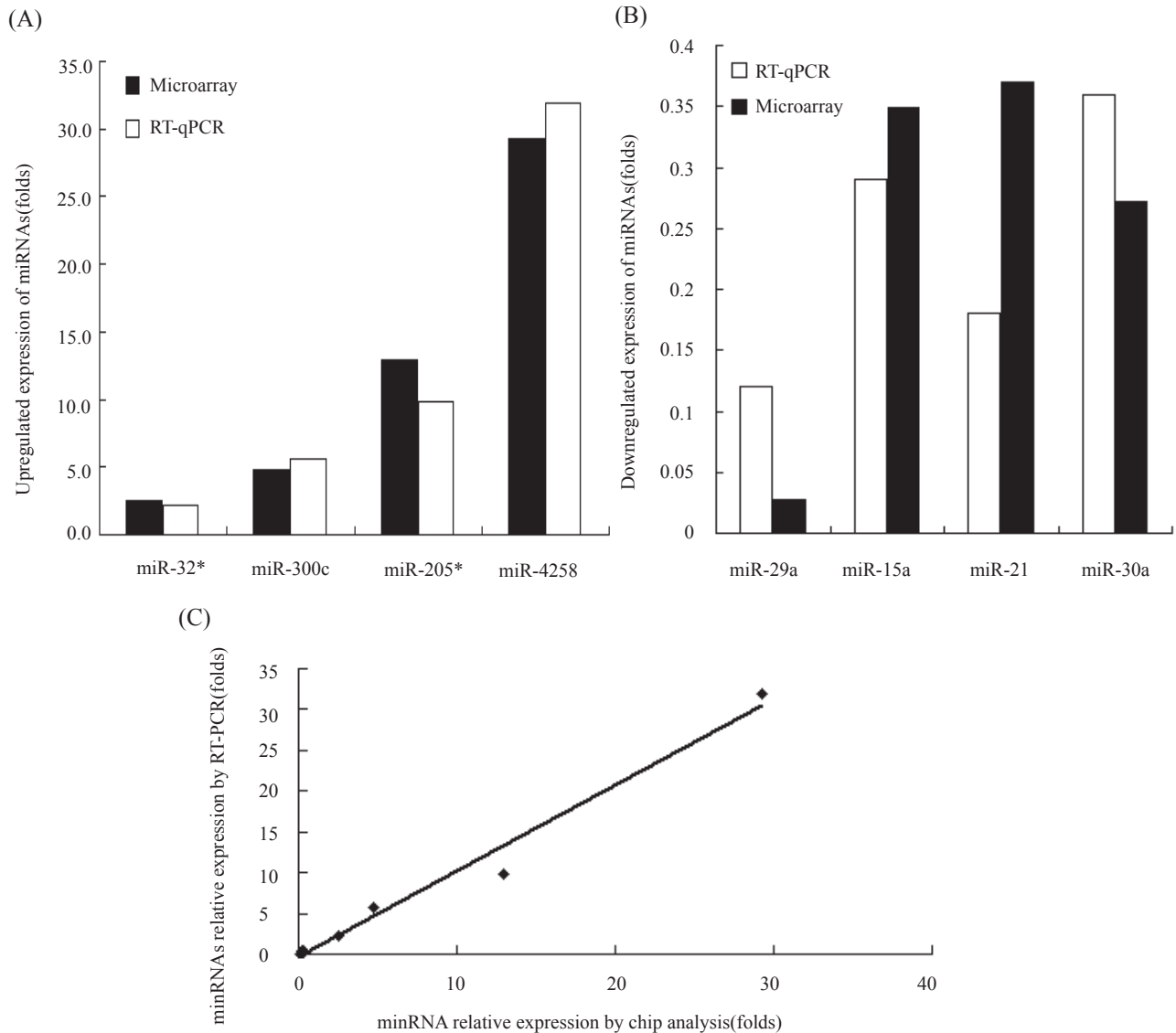
图1 样品总RNA质量鉴定

Fig.1 Identification of quality of total RNA

表1 肾小管上皮细胞转分化异常表达上调的miRNAs
Table 1 Upregulated expression of miRNAs in tubular epithelial myofibroblast transdifferentiation cells

基因 Gene name	差异倍数 F vs N folds	基因 Gene name	差异倍数 F vs N folds
<i>hsa-let-7b</i>	2.05	<i>hsa-miR-498</i>	4.05
<i>hsa-miR-93</i>	2.12	<i>hsa-miR-584</i>	4.29
<i>hsa-miR-654-3p</i>	2.15	<i>hsa-miR-638</i>	4.35
<i>hsa-miR-3686</i>	2.20	<i>hsa-miR-1265</i>	4.52
<i>hsa-miR-3195</i>	2.25	<i>hsa-miR-634</i>	4.52
<i>hsa-miR-320c</i>	2.35	<i>hsa-miR-664</i>	4.74
<i>hsa-miR-30d</i>	2.35	<i>hsa-miR-200c</i>	4.76
<i>hsa-miR-1908</i>	2.36	<i>hsa-miR-943</i>	5.15
<i>hsa-miR-140-3p</i>	2.39	<i>hsa-miR-3679-3p</i>	5.30
<i>hsa-miR-4324</i>	2.39	<i>hsa-miR-296-5p</i>	5.72
<i>hsa-miR-30c</i>	2.48	<i>hsa-miR-559</i>	6.60
<i>hsa-miR-625*</i>	2.50	<i>hsa-miR-302a</i>	6.60
<i>hsa-miR-32*</i>	2.57	<i>hsa-G1246-3p</i>	6.88
<i>hsa-miR-191</i>	2.71	<i>hsa-miR-205*</i>	12.92
<i>hsa-miR-99a</i>	2.74	<i>hsa-miR-4312</i>	14.41
<i>hsa-miR-299-5p</i>	2.84	<i>hsa-miR-1913</i>	14.99
<i>hsa-miR-3676</i>	2.85	<i>hsa-miRPlus-1874*</i>	19.79
<i>hsa-miR-101</i>	2.87	<i>hsa-miR-3675-3p</i>	20.18
<i>hsa-miR-877*</i>	2.94	<i>hsa-miR-326</i>	21.40
<i>hsa-miR-149*</i>	2.96	<i>hsa-miR-4258</i>	29.25
<i>hsa-miR-574-3p</i>	3.21	<i>hsa-miR-630</i>	37.39
<i>hsa-miR-337-5p</i>	3.30	<i>hsa-miR-361-3p</i>	51.01
<i>hsa-miR-4290</i>	3.35	<i>hsa-miR-718</i>	85.76
<i>hsa-miR-483-3p</i>	3.77	<i>hsa-miR-4268</i>	86.51
<i>hsa-miR-4279</i>	4.04		

黑体部分代表已有论文报道miRNAs在肾纤维化中表达上调。
Boldface represents miRNAs upregulated in renal fibrosis.



A: 表达上调miRNAs; B: 表达下调miRNAs; C: miRNAs差异表达的相关性。

A: upregulated expression of miRNAs; B: downregulated expression of miRNAs; C: correlation of differentially expressed miRNAs.

图2 比较RT-qPCR与miRCURY™基因芯片分析方法之间miRNAs差异表达情况

Fig.2 Comparison of expression levels of miRNAs between RT-qPCR and miRCURY™ microarray analysis

2.3 RT-qPCR分析差异表达miRNAs

miR-29a、miR-15a、miR-30a、miR-21在miRCURY™基因芯片分析中呈现下调表达,通过RT-qPCR检测miRNAs在肾小管上皮细胞转分化细胞的表达情况,结果表明该miRNAs表达也呈现下调表达;同时miR-32*、miR-205*、miR-200c、miR-4258在miRCURY™基因芯片分析中呈现上调表达情况与RT-qPCR检测结果一致。对miRCURY™基因芯片与RT-qPCR方法进行相关性分析,这两种方法获得的结果呈现高度相关性($r=0.98, P<0.01$, 图2)。

3 讨论

miRNAs是一类分布广泛而非编码蛋白质的RNAs,一般约含20-24个寡核苷酸,它们不具有开放阅读框(ORF),虽然不编码蛋白质,但参与机体各种重要的生理和病理过程;它们通过与靶基因mRNA 3'-UTR(untranslated region)碱基互补配对,使其降解或抑制其表达,从而导致特定基因的沉默,对机体生长、发育及各种疾病尤其是肿瘤的发生和发展具有重要的调节作用。miRNAs调节了多种生物学信号通路,生物信息学数据显示,每个

表2 肾小管上皮细胞转分化异常表达下调的miRNAs
Table 2 Downregulated expression of miRNAs in tubular epithelial myofibroblast transdifferentiation cells

基因 Gene name	差异倍数 F vs N folds	基因 Gene name	差异倍数 F vs N folds
<i>hsa-let-7e</i>	0.41	<i>hsa-miR-21</i>	0.37
<i>hsa-let-7g</i>	0.36	<i>hsa-miR-221</i>	0.27
<i>hsa-miR-100</i>	0.22	<i>hsa-miR-222</i>	0.31
<i>hsa-miR-103a</i>	0.30	<i>hsa-miR-23a</i>	0.23
<i>hsa-miR-1255a</i>	0.49	<i>hsa-miR-29a</i>	0.03
<i>hsa-miR-126*</i>	0.12	<i>hsa-miR-30a</i>	0.27
<i>hsa-miR-1264</i>	0.34	<i>hsa-miR-30b</i>	0.22
<i>hsa-miR-130a</i>	0.24	<i>hsa-miR-320e</i>	0.13
<i>hsa-miR-151-5p</i>	0.26	<i>hsa-miR-34a</i>	0.33
<i>hsa-miR-155</i>	0.19	<i>hsa-miR-3647-3p</i>	0.26
<i>hsa-miR-15a</i>	0.35	<i>hsa-miR-365</i>	0.48
<i>hsa-miR-15b</i>	0.25	<i>hsa-miR-3653</i>	0.31
<i>hsa-miR-16</i>	0.21	<i>hsa-miR-423-5p</i>	0.38
<i>hsa-miR-181b</i>	0.18	<i>hsa-miR-4288</i>	0.37
<i>hsa-miR-195</i>	0.06	<i>hsa-miR-4317</i>	0.26
<i>hsa-miR-199a-5p</i>	0.01	<i>hsa-miR-525-5p</i>	0.27
<i>hsa-miR-19a</i>	0.09	<i>hsa-miR-92a</i>	0.12

黑体部分代表已有论文报道miRNAs在肾纤维化中表达下调。
Boldface represents miRNAs downregulated in renal fibrosis.

miRNA可以调节数百个靶基因,这也表明miRNAs可能影响所有的信号途径。研究发现,miR-192通过抑制E-box负调控元件,以下调TGF- β 诱导胶原的表达,从而在糖尿病肾病中发挥作用^[13]。在糖尿病模型小鼠早期糖尿病肾病miRNAs表达研究中发现,miR-21在早期糖尿病肾病中下调表达,且miR-21的过度表达能够抑制模型小鼠系膜细胞的增殖并降低其24 h尿蛋白排泄率^[14]。高糖下调了肾小管上皮细胞miR-29a的表达,而miR-29a通过调控胶原IV型基因转录过程中3'-UTR位点,下调了胶原IV型蛋白的合成,抑制了胶原IV型蛋白在肾小管上皮细胞的积累,改善了肾脏纤维化^[15]。过表达miR-192时促进了TGF- β 1诱导的肾纤维化进程,而敲除miR-192时抑制了该过程的发生^[16]。miR-200a、miR-21、miR-8与Wnt/ β -catenin信号途径密切相关^[17-18]。在肾纤维化过程中,Smad3是致病因子,而Smad2、Smad7起保护作用,TGF- β 1能够通过激活Smad3,进而上调介导肾纤维化的miRNAs,激活了miR-21、miR-192,却抑制了miR-29、miR-

200^[19]。Emily等^[20]认为,在EMT过程中miR-205表达下降,上调了ZEB1表达,从而抑制E-cadherin的表达,促进了EMT过程的发生发展。Gregory等^[21]通过MDCK-Pez模型研究,经实时定量PCR检测发现,miR-200家族(miR-200a、miR-200b、miR-200c、miR-141、miR-429)和miR-205*在EMT过程中表达下调超过100倍,通过miRNA靶点扫描发现,miR-205*可能作用于ZEB1 3'-UTR。以上研究表明:特异miRNA的差异表达与肾纤维化过程密切相关。本研究中,miR-29a在波动性高糖诱导肾小管上皮细胞转分化细胞过程中也是表达下调的,仅为正常组细胞的0.03倍。

本课题组通过前期研究发现,波动性高糖对肾脏的损伤效应强于持续性高糖,而糖尿病患者的血糖呈现波动性,因此,采用波动性高糖诱导肾小管上皮细胞转分化方法建立肾小管上皮细胞转分化模型。通过miRCURY™基因芯片筛查肾小管上皮细胞转分化过程中差异表达的miRNAs,获得了49个表达显著上调和34个表达显著下调的miRNAs,其中14个miRNAs在以往研究中证实与肾纤维化密切相关,而其余69个miRNAs在肾纤维化进程中的功能需要进一步研究证实。

近年来,由于miRNAs广泛参与各种信号通路的调控,具有器官特异性miRNAs的功能与疾病的研究越来越受到重视。研究发现,IgA肾病病人尿液中miR-146a、miR-155大量增加,它们在IgA肾病诊断中起着重要的作用^[22];尿液中mir-96与mir-183可作为膀胱上皮癌的肿瘤标记^[23],因此,特异miRNAs将给疾病的诊断带来极大便利与突破。

通过miRCURY™基因芯片筛查肾小管上皮细胞转分化过程中差异表达的miRNAs,获得表达上调且在肾纤维化过程中功能未知的43个miRNAs和26个表达下调且在肾纤维化过程中功能未知的miRNAs;其中波动性高糖组miR-718、miR-4268的表达水平较正常组上调了86倍左右,miR-199a-5p的表达水平较正常组细胞下调了100倍,这些表达水平差异近百倍的miRNAs,可能在肾小管上皮细胞转分化过程中发挥着重要的作用。这将有利于研究特异miRNAs与肾纤维化之间的关系,进而获得与肾纤维化具有高度相关性的miRNAs,以期能够采用尿液中特异miRNAs检测代替肾活检。建立肾纤维化病人

尿液中特异miRNA的表达与肾纤维化过程的对应关系, 探寻无创便捷的肾纤维化早期临床诊断方法, 将会给肾纤维化早期诊断提供科学依据与理论基础, 具有较大的应用前景与科学意义。

参考文献 (References)

- Lamouille S, Subramanyam D, Bletloch R, Derynck R. Regulation of epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions by microRNAs. *Curr Opin Cell Biol* 2013; 25(2): 200-7.
- Lorenzen JM, Haller H, Thum T. MicroRNAs as mediators and therapeutic targets in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 2011; 7(5): 286-94.
- Ho J, Kreidberg JA. MicroRNAs in renal development. *Pediatr Nephrol* 2013; 28(2): 219-25.
- Patel V, Nouredine L. MicroRNAs and fibrosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2012; 21(4): 410-6.
- Li JY, Yong TY, Michael MZ, Gleadle JM. Review: the role of microRNAs in kidney disease. *Nephrology (Carlton)* 2010; 15(6): 599-608.
- Wang G, Chan ES, Kwan BC, Li PK, Yip SK, Szeto CC, *et al.* Expression of microRNAs in the urine of patients with bladder cancer. *Clin Genitourin Cancer* 2012; 10(2): 106-13.
- Gregory PA, Bracken CP, Bert AG, Goodall GJ. MicroRNAs as regulators of epithelial mesenchymal transition. *Cell Cycle* 2008; 7(20): 3112-8.
- Wang G, Kwan BC, Lai FM, Chow KM, Li PK, Szeto CC. Urinary miR-21, miR-29, and miR-93: Novel biomarkers of fibrosis. *Am J Nephrol* 2012; 36(5): 412-8.
- Kantharidis P, Wang B, Carew RM, Lan HY. Diabetes complications: the microRNA perspective. *Diabetes* 2011; 60(7): 1832-7.
- Galichon P, Hertig A. Epithelial to mesenchymal transition as a biomarker in renal fibrosis: Are we ready for the bedside? *Fibrogenesis Tissue Repair* 2011; 4: 11.
- Macconi D, Tomasoni S, Romagnani P, Trionfini P, Sangalli F, Mazzinghi B, *et al.* MicroRNA-324-3p promotes renal fibrosis and is a target of ACE inhibition. *J Am Soc Nephrol* 2012; 23(9): 1496-505.
- 曹罗元, 黄宝英, 富显果, 刘金发, 杨菁. 波动性高糖对肾小管上皮细胞Wnt/ β -catenin信号途径的影响. *中国细胞生物学学报*(Cao Luoyuan, Huang Baoying, Fu Xianguo, Liu Jinfa, Yang Jing. Effect of intermittent high glucose on tubular epithelial myofibroblast transdifferentiation in HK-2 cells. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2012; 34(7): 690-4.
- Kato M, Zhang J, Wang M, Lanting L, Yuan H, Rossi JJ, *et al.* MicroRNA-192 in diabetic kidney glomeruli and its function in TGF-beta-induced collagen expression via inhibition of E-box repressors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(9): 3432-7.
- Zhang Z, Peng H, Chen J, Chen X, Han F, Xu X, *et al.* MicroRNA-21 protects from mesangial cell proliferation induced by diabetic nephropathy in db/db mice. *FEBS Lett* 2009; 583(12): 2009-14.
- Du B, Ma LM, Huang MB, Zhou H, Huang HL, Shao P, *et al.* High glucose down-regulates miR-29a to increase collagen IV production in HK-2 cells. *FEBS Lett* 2010; 584(4): 811-6.
- Krupa A, Jenkins R, Luo DD, Lewis A, Phillips A, Fraser D. Loss of MicroRNA-192 promotes fibrogenesis in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21(3): 438-47.
- Huang K, Zhang JX, Han L, You YP, Jiang T, Pu PY, *et al.* MicroRNA roles in beta-catenin pathway. *Mol Cancer* 2010; 9: 252.
- Lan HY. Transforming growth factor-beta/Smad signalling in diabetic nephropathy. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2012; 39(8): 731-8.
- Lan HY, Chung AC. TGF-beta/Smad signaling in kidney disease. *Semin Nephrol* 2012; 32(3): 236-43.
- Paterson EL, Kolesnikoff N, Gregory PA, Bert AG, Khew-Goodall Y, Goodall GJ. The microRNA-200 family regulates epithelial to mesenchymal transition. *ScientificWorldJournal* 2008; 8: 901-4.
- Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, *et al.* The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol* 2008; 10(5): 593-601.
- Wang G, Tam LS, Li EK, Kwan BC, Chow KM, Luk CC, *et al.* Serum and urinary cell-free MiR-146a and MiR-155 in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2010; 37(12): 2516-22.
- Yamada Y, Enokida H, Kojima S, Kawakami K, Chiyomaru T, Tatarano S, *et al.* MiR-96 and miR-183 detection in urine serve as potential tumor markers of urothelial carcinoma: Correlation with stage and grade, and comparison with urinary cytology. *Cancer Sci* 2011; 102(3): 522-9.