

慢病毒介导miR-4258-siRNA表达对波动高糖诱导 肾小管上皮细胞转分化的影响

曹罗元 林应华 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 该实验构建了慢病毒介导(lentivirus, LV)的miR-4258-siRNA, 探讨干扰miR-4258对肾小管上皮细胞(HK-2)转分化的影响。将HK-2转分化细胞分为正常组、阴性对照组和干扰组; 荧光定量PCR方法检测miR-4258的表达情况; 免疫印迹检测Fibronectin、E-cadherin和 α -SMA的表达情况。结果显示, miR-4258-siRNA-LV可显著降低miR-4258的表达水平, 干扰组的Fibronectin和 α -SMA的相对表达量较阴性对照组显著下调; 而E-cadherin的相对表达量较阴性对照组明显上调。研究说明, 通过慢病毒介导的miR-4258-siRNA-LV下调miR-4258的表达, 可抑制波动高糖诱导的HK-2细胞转分化过程。

关键词 miR-4258; 上皮细胞转分化; HK-2; 波动高糖

The Effect of miR-4258-siRNA-Lentivirus on Epithelial-Mesenchymal Transition in HK-2 Induced by Intermittent High Glucose

Cao Luoyuan, Lin Yinghua, Huang Baoying*, Fu Xiangguo, Yang Jing, Lin Feng

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

Abstract We constructed lentivirus-mediated miR-4258-siRNA and observed the effect of miR-4258-siRNA-LV on epithelial-mesenchymal transition in HK-2 induced by intermittent high glucose. The HK-2 cells were divided into normal group, negative control and interference group. The expression of miR-4258 in HK-2 cells was detected by Real-time qPCR. The expressions of Fibronectin, E-cadherin and α -SMA were tested by Western blot. The results showed that the expression of miR-4258 was decreased significantly by lentivirus-mediated miR-4258-siRNA. The expression of Fibronectin and α -SMA were down-regulated markedly in interference group than those of negative control. Meanwhile, the expression of E-cadherin was up-regulated significantly in interference group than that of negative control. This study shows that miR-4258-siRNA can suppress epithelial-mesenchymal transition in HK-2 cells induced by intermittent high glucose.

Keywords miR-4258; epithelial-mesenchymal transition; HK-2; intermittent high glucose

肾小管上皮细胞转分化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程中产生的肌成纤维细胞在肾实质中的积聚和随后发生的肾小管萎缩被认为是慢性

肾纤维化的关键因素^[1]。Kalluri和Neilson^[2]的研究表明, 小鼠肾纤维化过程中, 12%成纤维细胞来源于骨髓, 约30%的成纤维细胞则来源于肾小管上皮细

收稿日期: 2014-09-09 接受日期: 2014-11-12

福建医科大学科技发展专项基金(批准号: FZS13022Y)、福建省卫计委青年科研课题(批准号: 2013-1-50)和宁德市科技计划项目(批准号: 20130203、20130199)资助的课题

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

Received: September 9, 2014 Accepted: November 12, 2014

This work was supported by Special Fund of Fujian Medical University for Scientific and Technological Development (Grant No.FZS13022Y), Research Foundations for Young Scholars from Health Department of Fujian Province (Grant No.2013-1-50) and the Ningde Planning Project of Science and Technology (Grant No.20130203, 20130199)

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

网络出版时间: 2015-01-19 15:39 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150119.1539.004.html>

胞的转分化过程。既往研究发现,波动性高糖能显著促进内皮细胞、心肌细胞的纤维化进程^[3],其潜在机制是:高糖导致活性氧的增多,而活性氧通过激活多种生长因子与激素类(如血管紧张素II、转化生长因子- β 、结缔组织生长因子),导致细胞外基质的沉积^[4]。

miRNA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,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mRNA 3'UTR(untranslated region)区的碱基互补配对,使其降解或抑制其表达,从而导致特定基因的沉默。miRNA在疾病诊断方面具有优势,近年研究发现,免疫球蛋白A(IgA)肾病人尿液中miR-146a、miR-155大量增加,在IgA肾病诊断中起着重要的作用^[5];尿液中miR-96与miR-183可作为膀胱上皮癌的肿瘤标记^[6],因此,特异miRNA可能给疾病诊断带来巨大的便利与突破。

本课题组前期研究发现,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^[7],且在波动高糖诱导的肾小管上皮的转分化过程中,有49个miRNAs表达显著上调,其中6个miRNAs已证实实在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;另外,miR-4258在肾小管上皮细胞转分化中表达上调近30倍^[8]。本文拟构建miR-4258-siRNA-LV,探讨干扰miR-4258对肾小管上皮细胞HK-2转分化的影响,以明确miR-4258在肾小管上皮细胞转分化过程中的作用。

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。慢病毒载体系统(由GV159 Vector、pHelper 1.0、pHelper 2.0三种质粒组成)、293T细胞、miR-4258实时定量PCR引物、内参U6购自上海吉玛生物技术有限公司;Real-time qPCR试剂盒购自大连TaKaRa公司;限制性内切酶、T4 DNA连接酶、质粒抽提试剂盒、miRNeasy mini试剂盒购自Qiagen公司;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。

Stepone plus PCR仪购自美国ABI公司;NanoDrop-1000仪购自德国NanoDrop技术公司;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。

1.2 细胞分组

HK-2细胞培养于D-MEM/F12培养基中(含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素),当细胞融合达到60%左右,换用无血清培养基饥饿培养12 h,之后将HK-2细胞分为正常组(normal group, NG)、阴性对照组(Lenti-nc group, NC)和干扰组(miRNA-4258-siRNA-LV group, IG)。各组采用波动高糖(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,所有分组均在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养3 d,分别收集24 h、48 h和72 h细胞。

1.3 慢病毒载体的构建、包装及滴度测定

Has-miR-4258反向互补序列5'-CCA AGG CGG TGG CGG GG-3',根据该序列合成两条互补的siRNA DNA oligos, miRNA-4258-a: 5'-AAT TCA AAA ACC CCG CCA CCG CCT TGG-3', miRNA-4258-b: 5'-CCG GCC AAG GCG GTG GCG GGG TTT TTG-3';阴性对照核心序列为: TTC TCC GAA CGT GTC ACG T,把合成后成对的引物干粉溶解于退火缓冲液中,90 $^{\circ}$ C水浴15 min,然后自然冷却至室温,制成双链DNA,用T4 DNA连接酶将双链与Age I和EcoR I双酶切后的GV112载体条带连接、转化,PCR法筛选阳性克隆,提取质粒并测序验证,测序引物为: 5'-GGA AAG AAT AGT AGA CAT AAT AGC-3'。将制备编码慢病毒颗粒的重组慢病毒质粒和辅助包装元件共转染293T细胞,获得重组慢病毒miR-4258-siRNA-LV。采用逐孔稀释滴度测定法进行病毒滴度测定。

1.4 miR-4258-siRNA-LV和Lenti-nc感染HK-2细胞

将miR-4258-siRNA-LV和Lenti-nc感染HK-2细胞,分别获得干扰组(miRNA-4258-siRNA-LV group, IG)和阴性对照组(Lenti-nc group, NC),加入病毒的感染参数(MOI)为10。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱培养24 h。吸去病毒液,用完全培养基换液培养,48 h后在荧光显微镜下根据绿色荧光蛋白(GFP)的表达计算感染效率(即同一视野下表达绿色荧光蛋白的细胞总数占明场细胞总数的百分比),每瓶细胞选择三个视野观察计数。感染效率大于90%者继续培养,用于后续实验。

1.5 实时定量PCR检测

转染后24, 48, 72 h收集各组细胞,提取细胞总RNA,用分光光度计定量检测。采用TaKaRa SYBR

PrimeScript™ miRNA RT-PCR Kit, 将RNA样品逆转录为cDNA, 以cDNA为模板定量样本中miR-4258的表达量。采用的特异性引物序列为: miR-4258 F: 5'-ACC CCG CCA CCG CCT-3', 内参U6 F: 5'-CGA TAA AAT TGG AAC GAT ACA GA-3', 反应条件为 95 °C 30 s, 预变性; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40个循环, 反应结束后得到各个标本和内参U6的基本循环数(Ct值)。通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值计算目的基因的相对表达量, 即miR-4258的相对含量。实验独立重复3次。

1.6 Western blot检测Fibronectin、E-cadherin和 α -SMA的表达

分别收集各组培养24, 48, 72 h的细胞, 用冰冷PBS洗3次, 加入细胞裂解液RIPA(每毫升加入5 μ L蛋白酶抑制剂、10 μ L PMSF、5 μ L DTT), 冰浴30 min(每10 min振荡10 s), 4 °C、12 000 r/min离心10 min, 提取细胞总蛋白; BCA法测定蛋白浓度。取细胞裂解蛋白20 μ g, 经10% SDS-PAGE凝胶电泳2 h, PVDF转膜(200 mA, 1 h); 5%脱脂奶粉封闭PVDF膜2 h, 分别加入兔抗E-钙黏蛋白(E-cadherin)多克隆抗体、兔抗 α -SMA多克隆抗体、兔抗Fibronectin单克隆抗体, 4 °C过夜。洗膜后加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体或羊抗小鼠抗体(1:5 000稀释), 37 °C孵育1 h; 洗膜后加ECL试剂, 然后将PVDF膜放入X光片暗盒, 压片、显影、定影。每组实验独立重复3次。

1.7 统计学分析

实验数据以mean $\pm$ S.D.形式表示, 显著性差异分析用SPSS 13.0软件进行。 $P<0.05$ 为差异显著, $P<0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 重组慢病毒载体miR-4258-siRNA-LV的构建和测序

采用逐孔稀释滴度测定法进行重组慢病毒载体miR-4258-siRNA-LV滴度测定, 所测滴度为 8×10^8 TU/mL。重组病毒经菌液PCR筛选阳性克隆, 提取质粒进行测序。测序结果表明, miR-4258-siRNA-LV寡核苷酸链序列插入正确(图1)。

2.2 重组病毒感染HK-2细胞

重组病毒miR-4258-siRNA-LV和Lenti-nc分别感染HK-2细胞, 48 h后观察两组细胞绿色荧光蛋白的表达情况, 计算感染效率, IG组为 $92.52\%\pm 1.32\%$, NC组为 $94.57\%\pm 1.79\%$ (图2)。

2.3 miR-4258-siRNA-LV对HK-2细胞形态的影响

按实验分组培养HK-2细胞72 h, NG和NC组80%的细胞具有成纤维细胞典型形态的梭形, 而IG组约60%细胞出现正常上皮细胞所具有的椭圆形(图3)。以上表明, miR-4258的下调表达和抑制HK-2细胞转分化过程具有密切的相关性。

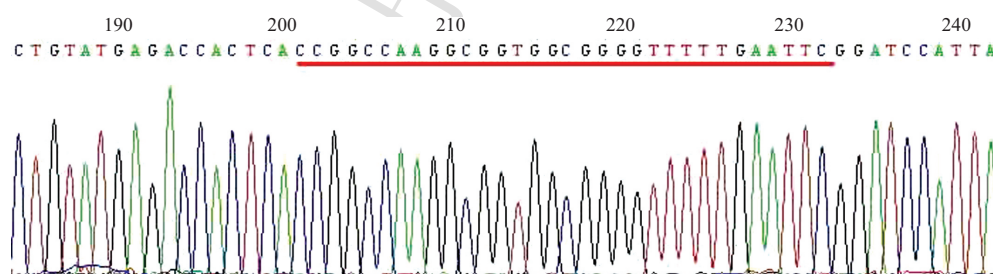
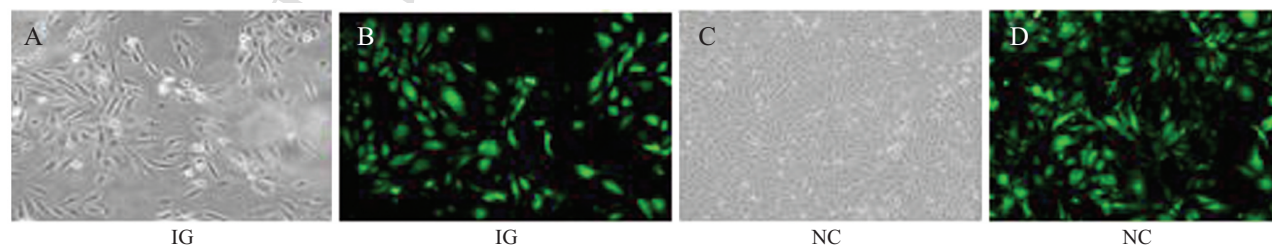


图1 质粒miR-4258-LV测序结果

Fig.1 DNA sequence of miR-4258-LV plasmid



A, C: 在明场下观察; B, D: 在荧光下观察。

A,C: under the white light; B,D: under the fluorescence.

图2 重组慢病毒感染效率(100 $\times$)

Fig.2 The infection efficiency in HK-2 cells (100 $\times$)

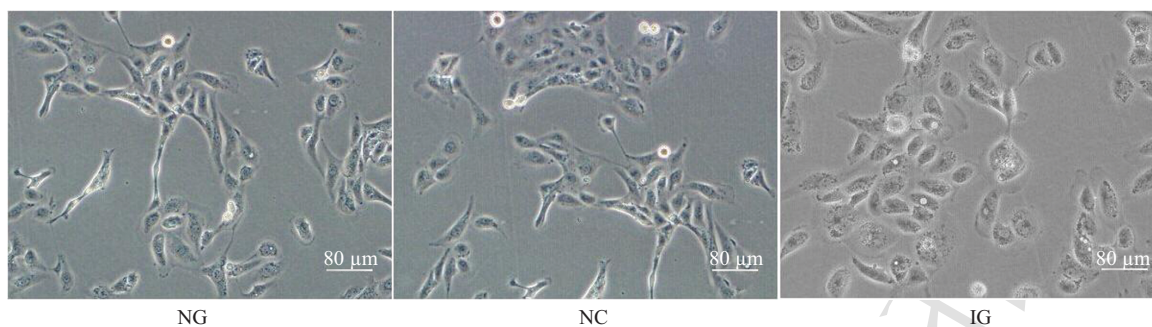
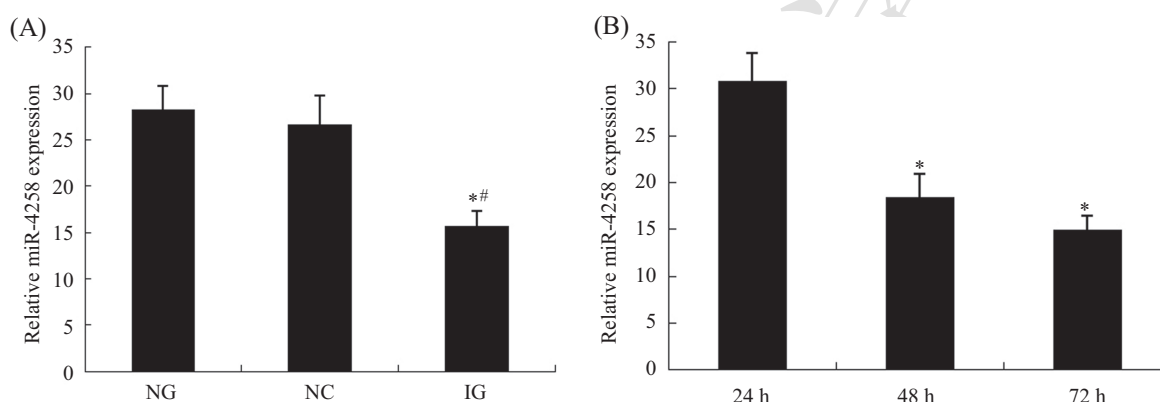


图3 各组细胞形态变化

Fig.3 The variation of morphology in HK-2 cells

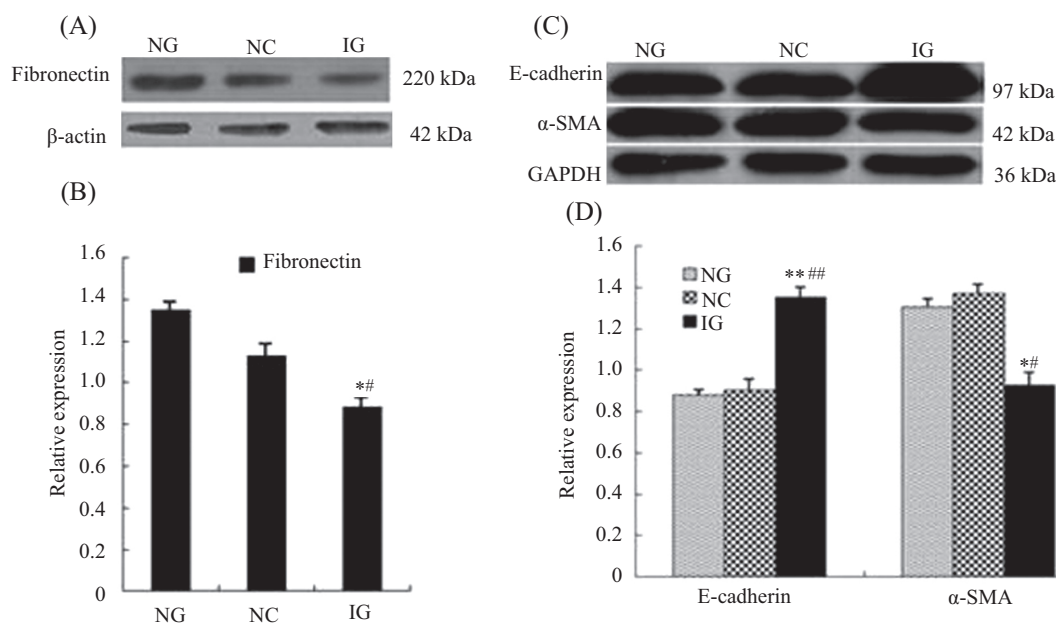


A: $*P<0.05$, 与NC组比较; $\#P<0.05$, 与NG组比较; B: $*P<0.05$, 与24 h组比较。

A: $*P<0.05$ vs NC group; $\#P<0.05$ vs NG group; B: $*P<0.05$ vs 24 h group.

图4 Real-time qPCR检测miR-4258在各组细胞中的表达

Fig.4 The expression of miR-4258 in each group of HK-2 cells detected by Real-time qPCR

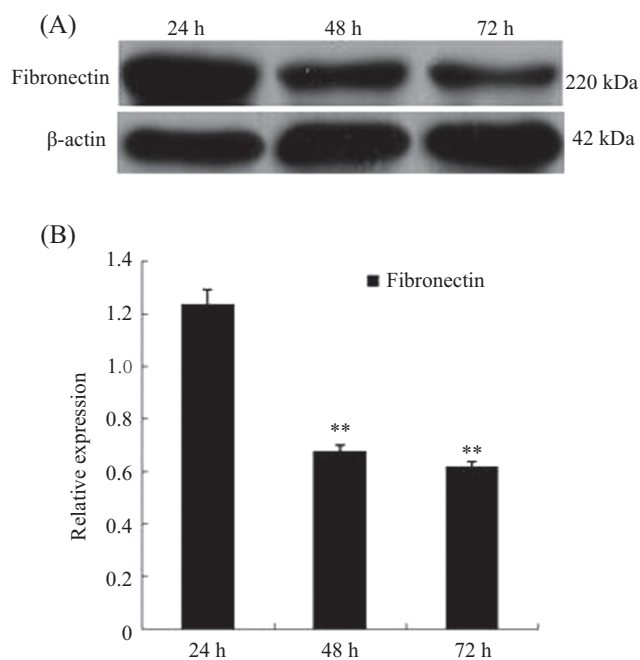


A: Western blot检测Fibronectin蛋白的表达; B: 统计分析Fibronectin蛋白表达水平; C: Western blot检测E-cadherin和α-SMA蛋白的表达; D: 统计分析E-cadherin和α-SMA蛋白表达水平。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与NC组比较; $\#P<0.05$, $\##P<0.01$, 与NG组比较。

A: Fibronectin protein was detected by Western blot; B: statistical analysis of relative levels of Fibronectin protein; C: E-cadherin and α-SMA protein were detected by Western blot; D: statistical analysis of relative levels of E-cadherin and α-SMA protein. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs NC group; $\#P<0.05$, $\##P<0.01$ vs NG group.

图5 各组Fibronectin、E-cadherin与α-SMA的相对表达情况

Fig.5 Relative protein expression levels of Fibronectin, E-cadherin and α-SMA in HK-2 cells



A: Western blot检测Fibronectin蛋白的表达; B: 统计分析Fibronectin蛋白表达水平, ** $P < 0.01$, 与24 h组比较。

A: Fibronectin protein was detected by Western blot; B: statistical analysis of relative levels of Fibronectin protein, ** $P < 0.01$ vs 24 h group.

图6 miR-4258-siRNA-LV对Fibronectin表达的影响

Fig.6 Effect on relative protein expression level of Fibronectin by miR-4258-siRNA-LV

2.4 实时荧光定量PCR检测miR-4258在HK-2细胞中的表达

实时荧光定量PCR结果显示, 重组慢病毒转染HK-2细胞72 h时IG组中miR-4258的表达量较NC组和NG组明显降低, 具有显著差异; 而NG组和NC组的表达量差异无统计学意义(图4A)。IG组中miR-4258 48 h、72 h表达量较24 h下调明显, 具有显著差异($P < 0.05$); 而48 h和72 h的表达量差异无统计学意义(图4B)。

2.5 干扰miR-4258抑制Fibronectin和 α -SMA的表达, 促进E-cadherin的表达

收集各组细胞, 提取总蛋白, 经Western blot检测, IG组Fibronectin和 α -SMA的表达量较NC组明显下降, 差异具有统计学意义($P < 0.05$), 而NG组和NC组的表达量差异无统计学意义(图5A和图5B)。IG组E-cadherin的表达量较NC组得到极显著提高($P < 0.01$), 而NG组和NC组的表达量差异无统计学意义(图5B)。

IG组中miR-4258 siRNA-LV的稳定表达可下调Fibronectin的表达, 在干扰48, 72 h时Fibronectin的表达量较24 h极显著下调($P < 0.01$), 而72 h与48 h相比, Fibronectin表达量差异无统计学意义(图6)。

3 讨论

肾纤维化是慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)发展至终末期的共同途径, 加速了不可逆性肾损伤进程, 因此, 肾纤维化的早期诊断是延缓和防治CKD进展的关键。由于肾纤维化早期临床症状不明显, 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, 难于连续获得纤维化指标数据以评价疗效。因此, 探寻一种非创伤性又能较准确反映肾纤维化程度的客观评价方法是医学工作者亟需解决的难题。

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^[9]。在糖尿病模型小鼠早期糖尿病肾病miRNA表达研究中发现, miR-21在早期糖尿病肾病中表达下调, 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的尿蛋白排泄率^[10]。高糖下调了肾小管上皮细胞miR-29a的表达, 而miR-29a的下调通过调控胶原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^[11]; 尿液中miR-29c可作为反映肾功能和纤维化的生物标记^[12]。高糖诱导miR-29表达, 但TGF- β 1抑制其表达; miR-377在高糖诱导的肾小球系膜细胞和糖尿病小鼠肾中表达上调; 而miR-200a和miR-141在肾小管上皮细胞中则是表达下调^[13]。miR-192和miR-205在局灶性节段性肾小球硬化和间质纤维化伴随出现蛋白尿的患者血清中表达显著上调^[14]。以上研究表明, miRNAs为无创诊断肾纤维化提供了可能性。通过targetscan靶位点扫描, 锌指蛋白385A是miR-4258潜在的靶位点, 目前对miR-4258的研究报导较少, 其机制研究是本课题组后续工作的重点。

本文通过miR-4258-RNAi慢病毒感染波动高糖诱导的肾小管上皮细胞转分化细胞, 发现下调miR-4258的表达可抑制Fibronectin和 α -SMA的分泌, 促进E-cadherin的分泌(图5)。 α -SMA与纤维组织的结合是成纤维母细胞的重要特征, 而E-cadherin是维持上皮细胞表型和极性的重要分子, 因此, E-cadherin和 α -SMA是EMT过程中最重要的蛋白分子。HK-2细胞培养72 h, NG和NC组80%的细胞具有成纤维细胞典型形态的梭形, 而IG组约60%细胞出现正常细胞所具有的椭圆形(图3), 说明miR-4258的下调表达

可促进波动高糖诱导的HK-2细胞E-cadherin的分泌,进而维持上皮细胞的表型和极性。

本课题组前期研究发现,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,且甘露醇对HK-2细胞转分化过程的影响与正常组之间的差异性无统计学意义^[7]。而本研究中,IG组波动高糖诱导HK-2转分化过程中48 h miR-4258表达量较24 h下降显著,而48 h与72 h相比差异无统计学意义(图4);IG组中Fibronectin表达的变化与miR-4258表达情况具有一致性,48 h的Fibronectin的表达量较24 h显著下调,而72 h与48 h相比差异无统计学意义(图6)。该结果说明,波动高糖诱导HK-2转分化过程中,miR-4258的表达下调与Fibronectin表达量下降具有直接的相关性。Hsieh等^[15]在研究中也证明,高糖刺激HK-2细胞能够促进Fibronectin的表达;高糖的作用在于促进了Fibronectin等细胞外基质的形成。肾纤维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来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。miRNAs在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作为肾纤维化诊断指标奠定了理论基础。而近年来,越来越多的研究进一步验证了miRNAs作为疾病诊断的可行性^[6,12,16-18]。

本文通过miR-4258-RNAi慢病毒感染波动高糖诱导的肾小管上皮细胞转分化细胞的研究说明, HK-2细胞转分化过程与miR-4258的差异表达密切相关。我们后续将探究肾纤维化患者体液中miR-4258的差异表达情况,探寻无创便捷的肾纤维化早期临床诊断方法,这将会给肾纤维化早期诊断提供科学依据与理论基础,具有较大的应用价值与科学意义。

参考文献 (References)

- Phillips AO. The role of renal proximal tubular cells in diabetic nephropathy. *Curr Diab Rep* 2003; 3(6): 491-6.
- Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 2003; 112(12): 1776-84.
- Fragiadaki M, Mason RM. Epithelial-mesenchymal transition in renal fibrosis—evidence for and against. *Int J Exp Pathol* 2011; 92(3): 143-50.
- Carew RM, Wang B, Kantharidis P. The role of EMT in renal fibrosis. *Cell Tissue Res* 2012; 347(1): 103-16.
- 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.
- 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.
- 曹罗元, 黄宝英, 富显果, 杨菁, 林峰. 波动高糖诱导肾小管上皮细胞转分化差异表达miRNAs分析. *中国细胞生物学学报* (Cao Luoyuan, Huang Baoying, Fu Xianguo, Yang Jing, Lin Feng. Analysis of aberrantly expressed miRNAs in intermittent high glucose induced renal epithelial-mesenchymal transition. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2013; 35(8): 1155-60.
- 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.
- Lü LL, Cao YH, Ni HF, Xu M, Liu D, Liu H, *et al.* MicroRNA-29c in urinary exosome/microvesicle as a biomarker of renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2013; 305(8): F1220-7.
- Wei Q, Mi QS, Dong Z. The regulation and function of microRNAs in kidney diseases. *IUBMB Life* 2013; 65(7): 602-14.
- Cai X, Xia Z, Zhang C, Luo Y, Gao Y, Fan Z, *et al.* Serum microRNAs levels in primary focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol* 2013; 28(9): 1797-801.
- Hsieh PF, Liu SF, Lee TC, Huang JS, Yin LT, Chang WT, *et al.* The role of IL-7 in renal proximal tubule epithelial cells fibrosis. *Mol Immunol* 2012; 50(1/2): 74-82.
- 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.
- 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.
- 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.