

# miR133a通过下调*Gdnf*基因表达抑制输尿管芽的发育

吕中石 毛昭敏 翁亚光 周 钦\*

(重庆医科大学检验医学院, 重庆 400016)

**摘要** 该研究预测并验证了在后肾间充质细胞中miR133a对输尿管芽发育关键因子*Gdnf*(glial cell line derived neurotrophic factor)基因表达的调控作用,探讨了其抑制输尿管芽发育的作用。通过生物信息学分析发现,*Gdnf* mRNA 3'非翻译区(3' untranslated regions, 3'UTR)在不同物种间高度保守,并且存在miR133a等的结合位点。双荧光素酶报告基因实验显示,miR133a可以结合在*Gdnf* mRNA 3'UTR上。Real-time PCR和Western blot结果证实,miR133a显著地抑制*Gdnf*的mRNA水平和蛋白质水平。解离重聚胚肾离体培养实验结果显示,miR133a抑制输尿管芽的发育。该研究结果表明,miR133a通过靶向结合于*Gdnf* mRNA的3'UTR,下调*Gdnf*基因的表达,从而抑制输尿管芽的发育。

**关键词** 微RNA; miR133a; *Gdnf*; 输尿管芽发育

## miR133a Down-Regulates the Expression of *Gdnf* Gene to Inhibit the Development of Ureteric Bud

Lü Zhongshi, Mao Zhaomin, Weng Yaguang, Zhou Qin\*

(The School of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract** The present study predicted and testified that miR133a could regulate glial cell line derived neurotrophic factor (*Gdnf*), a protein generated by metanephrogenic mesenchyme (MM), which is of great importance in the development of ureteric bud (UB) and investigated inhibitory effect of miR133a towards the development of UB. Bioinformatics analysis displayed the high conservation of the *Gdnf* mRNA 3' untranslated regions (3'UTR) between different species and predicted that miR133a could probably bind to it. The results of luciferase assay confirmed that miR133a could directly target *Gdnf* mRNA 3'UTR. The results of Real-time PCR and Western blot revealed that miR133a down-regulated the expression of *Gdnf* both at mRNA and protein levels. Furthermore, we found significant reduction in the ability of miR133a treated cells to contribute to ureteric bud formation in embryonic kidney rudiments culture system. Taken together, our results suggest that miR133a might inhibit the formation of ureteric bud through its binding to complementary sequences in the *Gdnf* mRNA 3'UTR.

**Keywords** microRNA; miR133a; *Gdnf*; ureteric bud development

微RNA(microRNA, miRNA)是一类内源性的小分子(至多22 nt)RNA,属于非编码基因家族。miRNA通过碱基互补结合在编码基因的mRNA 3'非

翻译区(3' untranslated regions, 3'UTR)在多种细胞过程中发挥重要的调控作用。miRNA最为熟知的功能就是通过转录后调控方式调控编码基因的表达。据

收稿日期: 2017-02-15 接受日期: 2017-03-20

国家自然科学基金(批准号: 81572076、31271563)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 023-68485688, E-mail: zhouqin@cqmu.edu.cn

Received: February 15, 2017 Accepted: March 20, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81572076, 31271563)

\*Corresponding author. Tel: +86-23-68485688, E-mail: zhouqin@cqmu.edu.cn

网络出版时间: 2017-04-11 10:55:38

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170411.1055.014.html>

前人研究报道, 绝大多数的编码基因都可被miRNA通过靶向结合在mRNA 3'UTR所调控, 导致其蛋白质合成受到抑制或者mRNA的降解<sup>[1]</sup>。miRNA的作用很广泛, 参与了很多发育和细胞过程, 例如细胞增殖、分化和凋亡等<sup>[2]</sup>。

尽管最开始*Gdnf*(glial cell line derived neurotrophic factor)被认为是神经分子, 但是在胚肾发育过程中, 作为关键因子, 由肾单位祖先细胞——肾帽状间充质细胞旁分泌, 在调控输尿管芽形成及其之后的分支等形态发育过程中发挥重要作用<sup>[3-4]</sup>。*Gdnf*基因敲除的小鼠导致一系列的肾脏表型, 如输尿管芽不能形成、肾发育不全、肾体积严重减小等<sup>[5-8]</sup>。

*Gdnf*在胚肾发育(尤其是输尿管发育)过程中发挥至关重要的作用, 但其是否能被miRNA调控目前报道很少。本研究首次报告*Gdnf* mRNA 3'UTR上存在miRNA结合位点, 并研究miRNA对*Gdnf*基因表达的调控作用及其对输尿管芽发育的作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要材料与试剂

人胚肾293细胞(HEK293T)购自ATCC细胞库。后肾帽状间充质细胞mK3细胞系由美国儿童医学中心(Children's Hospital Medical Center, Ohio)的S. Steven Potter教授赠送。DMEM培养基、胎牛血清、Trizol总RNA提取试剂盒、逆转录试剂、蛋白质定量试剂盒、山羊抗兔和抗鼠荧光二抗、脂质体转染试剂(Lipofectamine 2000)购自Thermo公司。UltraSYBR Mixture Real-time PCR试剂购自TaKaRa公司。CalbindinD28K鼠单克隆抗体购自武汉博士德公司。羊抗兔多克隆抗体层黏连蛋白(laminin)购自Sigma公司。羊抗兔多克隆抗体*Gdnf*购自于Santa公司。辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG抗体购自Proteintech公司。电化学发光试剂(ECL)购自Millipore公司。双荧光素酶报告基因实验试剂购自Promega公司。miR133a mimic由广州锐博公司合成。C57小鼠购买并饲养于重庆医科大学动物中心。

### 1.2 质粒构建

*Gdnf*基因的3'UTR通过PCR克隆自C57小鼠基因组, 该PCR产物连接入pcDNA3.1-Luc质粒。*Gdnf*基因的编码序列(coding sequences, CDS)克隆自小鼠肾脏cDNA, 并被连接入pdsAAV-CB-EGFP载体。miRNA的种子序列克隆自C57小鼠基因组, 接入

pdsAAV-CB-EGFP质粒。突变载体的方法参考已发表的文献<sup>[9]</sup>。

### 1.3 细胞培养和细胞转染

HEK293T和mK3细胞用含有10%胎牛血清和1%的青链霉素的DMEM培养基, 在37 °C、5%二氧化碳的孵箱中培养。pCDNA3.1-Luc和pdsAAV-miRNA通过磷酸钙转染法转染进入HEK293T细胞。pdsAAV-CB-EGFP载体和miRNA mimic通过脂质体(Lipofectamine 2000)转染法转染入mK3细胞, 具体方法按照Lipofectamine 2000转染试剂说明书进行。

### 1.4 双荧光素酶报告基因实验

在HEK293T细胞中共转染pdsAAV-miRNA和pcDNA3.1-Luc质粒[野生型*Gdnf*和突变型*Gdnf*(3'UTR)]。转染48 h后, 用1×PBS缓冲液润洗细胞, 用100 μL 1×裂解液裂解细胞, 通过Promega公司配套的荧光检测仪器检测荧光素酶活性, 具体步骤根据Promega双荧光素酶报告基因实验试剂说明书。所得各组样品对应的荧光素酶活性, 以海肾荧光素酶活性为内参照, 即相对活性设置为萤火虫荧光素酶/海肾荧光素酶比值, 统计分析miRNA对荧光素酶活性的影响, 判断miRNA对*Gdnf*的调控能力。

### 1.5 免疫荧光

将离体培养的胚肾组织用4%多聚甲醛4 °C固定过夜, 加入500 μL 1×PBS清洗1次, 以去除残留多聚甲醛, 用组织冰冻切片OCT包埋剂(Tissue OCT-Freezing Medium)包埋, 冷冻固定后切片(厚度5 μm), 将切片放入培养皿, 用500 μL 1×PBS室温静置漂洗15 min。加入500 μL封闭液(1×PBS溶液中加入终浓度为3%牛血清白蛋白和0.1% Triton X-100), 室温静置2 h。在4 °C条件下, 一抗(CalbindinD28K和层黏连蛋白, CalbindinD28K为胚肾中输尿管芽的标志物, 层黏连蛋白是胚肾发育中后肾帽状间充质细胞发育形成的肾小囊的标志物<sup>[10]</sup>)孵育过夜(1:100)。取出切片放到24孔板中, 轻轻加入500 μL 1×PBS, 漂洗15 min×3次。室温荧光二抗孵育2 h, 轻轻加入500 μL 1×PBS漂洗15 min×3次。5 μg/mL DAPI染色15 min, 轻轻加入500 μL 1×PBS, 漂洗15 min×3次。荧光显微镜观察。

### 1.6 Real-time PCR

转染miRNA 48 h后收集细胞, 弃去培养基, 用1×PBS润洗3次, 加入500 μL Trizol(Invitrogen公司), 提取mK3细胞总RNA, 将1 μg总RNA用逆转录试剂

盒(Thermo Scientific公司)合成cDNA, 18S作为内参, 用Real-time PCR检测*Gdnf* mRNA水平, 反应条件参照Real-time PCR试剂盒[UltraSYBR Mixture(TaKaRa公司)]说明书。各引物见表1。

### 1.7 免疫印迹

转染miRNA 48 h后收集细胞, 用1×PBS洗涤细胞3次, 加入300 μL细胞裂解液裂解细胞, 将裂解液转移至EP管中, 煮沸10 min。将样品进行SDS-PAGE电泳, 转膜90 min, 封闭1 h, 一抗4 °C孵育过夜, 二抗常温孵育2 h, 再进行化学发光显像, 检测*Gdnf*蛋白质水平的变化。

### 1.8 解离重聚胚肾体外培养

将E12.5天的C57小鼠胚胎肾脏分离出来, 用胶原酶将其酶解成单个细胞, 再用脂质体法将miR133a和阴性对照分别转染到两组“解离”的胚肾细胞中, 做好标记, 再将其重聚形成“胚肾组织”, 培养在培养基上漂浮的滤膜上(提供其生长的张力)并让其继续分化发育, 48 h后用4%多聚甲醛固定, 包埋切片<sup>[10]</sup>。

### 1.9 数据统计

采用GraphPad Prism 5统计学软件进行数据分析, 组间差异通过One-Way ANOVA比较分析, 所有的实验至少独立重复3次, 统计结果以平均值±标准差表示,  $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 生物信息学预测miR133a靶向*Gdnf* mRNA的3'UTR

为了探究*Gdnf*的mRNA 3'UTR的保守性, 我们利用在线生物信息学工具UCSC(University of California Santa Cruz genome database)对比了不同物种间的序列。*Gdnf* mRNA 3'UTR全长共2 743 bp, 在人、恒河猴、眼镜猴、狗等不同物种间高度保守(图1)。随后, 我们试图找出能结合在*Gdnf* mRNA 3'UTR潜在的miRNAs。我们利用三个miRNA预测网站(miRWalk、microRNA.org和TargetScan)综合分析, 找到共同预测的miRNA(图2A), 包括miRNA133a、miRNA133b和miRNA96。其中, miR133a的种子序列与*Gdnf* mRNA 3'UTR的结合序列, 在不同物种之间是保守的(图2B)。这些结果表明, *Gdnf* mRNA 3'UTR高度保守, 而且miR133a有可能靶向结合*Gdnf* mRNA 3'UTR。

### 2.2 miR133a靶向结合于*Gdnf* mRNA的3'UTR

为了研究miR133a是否能够直接靶向*Gdnf* mRNA的3'UTR, 我们使用磷酸钙转染方法共转染pcDNA3.1-luciferase-3'UTR、pRL-SV40(内参质粒)和pdsAAV-miR133a-CB-EGFP或pdsAAV-CB-EGFP质粒(图3A)到HEK293T细胞。与对照组比较, 过表

表1 引物列表

Table 1 The list of the primers

基因名称 Gene name	引物序列 Primer sequence
miR133b	Upstream primer: 5'-ATT TCA GGT CCC GGA AGC TCT GTG AGA GGT TAG TC-3'
	Downstream primer: 5'-TGC ACC ACC ACC GGA TGT TGA GCA TGT GAC CTG TG-3'
miR133a	Upstream primer: 5'-ATT TCA GGT CCC GGA GTC TGA ATG TAC ATG TGA CC-3'
	Downstream primer: 5'-TGC ACC ACC ACC GGA TTC TTG GAT CTG ACC ATT GC-3'
miR96	Upstream primer: 5'-ATT TCA GGT CCC GGA AAC AGA GCA GAG ACA GAT CC-3'
	Downstream primer: 5'-TGC ACC ACC ACC GGA CAG GCA GTG AAA GGT GAT CT-3'
miR9-3	Upstream primer: 5'-ATT TCA GGT CCC GGA GTG TGT CTG TGT GTC TGT CG-3'
	Downstream primer: 5'-TGC ACC ACC ACC GGA AGG AGG AGG TGA AGG GAA TG-3'
Gdnf-3'UTR-WT	Upstream primer: 5'-CTT GGT ACC GAG CTC CGG TGT GGA TGT AIC TGA CC-3'
	Downstream primer: 5'-TGC TGG ATA TCT GCA CGA CCG AGA CAT CAG AGA GG -3'
Gdnf-3'UTR-Mut1	Upstream primer: 5'-TGC TAC AGT GCG AAG AAA GCG TGC TAC GTT CCC AGG AAA TGT-3'
	Downstream primer: 5'-GCA AAC ATT TCC TGG GAA CGT AGC ACG CTT TCT TCG CAC TGT-3'
Gdnf-3'UTR-Mut2	Upstream primer: 5'-TGC CCA GAG TGG AAG ATA ACG TGC TAC ATG GCG GAG GCA GAG-3'
	Downstream primer: 5'-CTG CCT CTG CCT CCG CCA TGT AGC ACG TTA TCT TCC ACT CTG-3'
Gdnf-Real-time	Upstream primer: 5'-CGG AGG CAG AGG CAG AAG AA-3'
	Downstream primer: 5'-GCC ACC CTG AAG TGC TCA GA-3'
18S-Real-time	Upstream primer: 5'-GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT-3'
	Downstream primer: 5'-CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG-3'

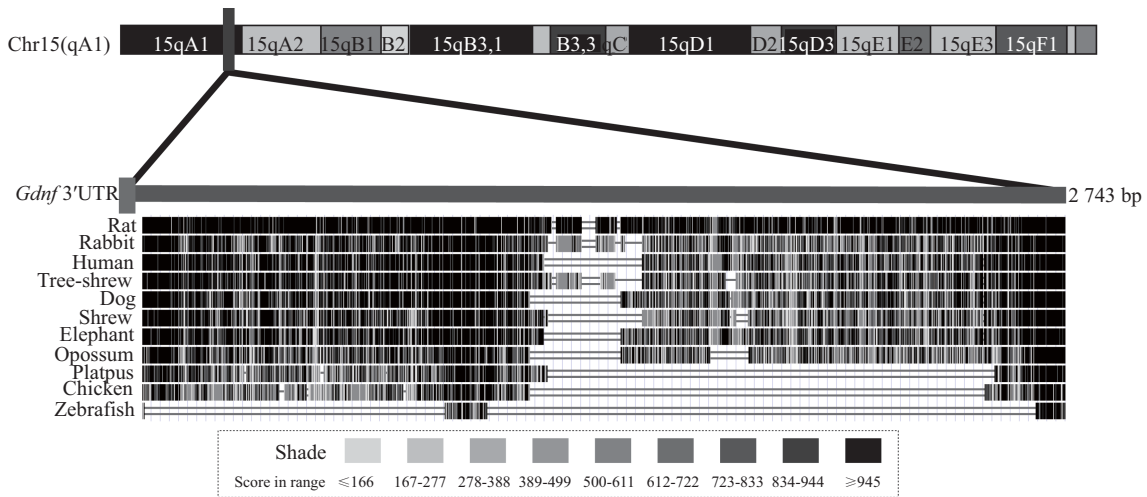
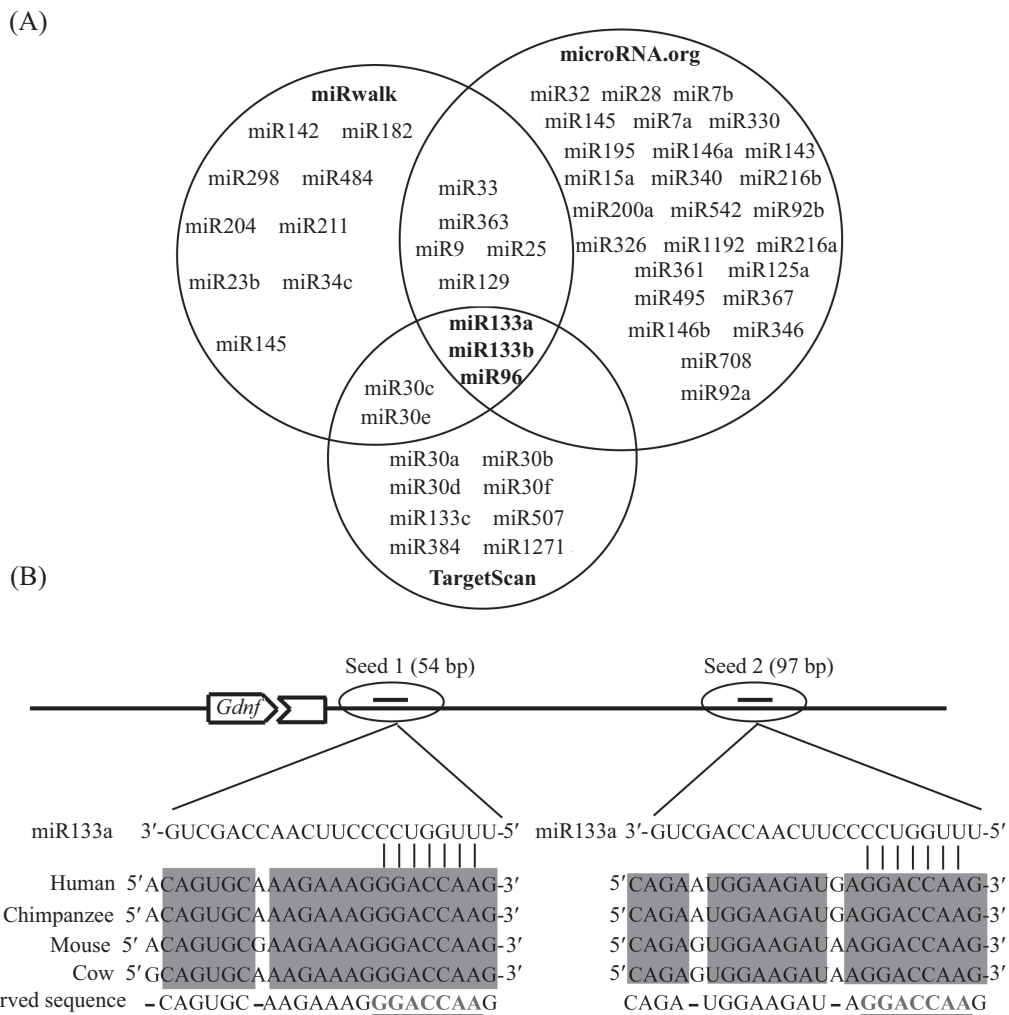


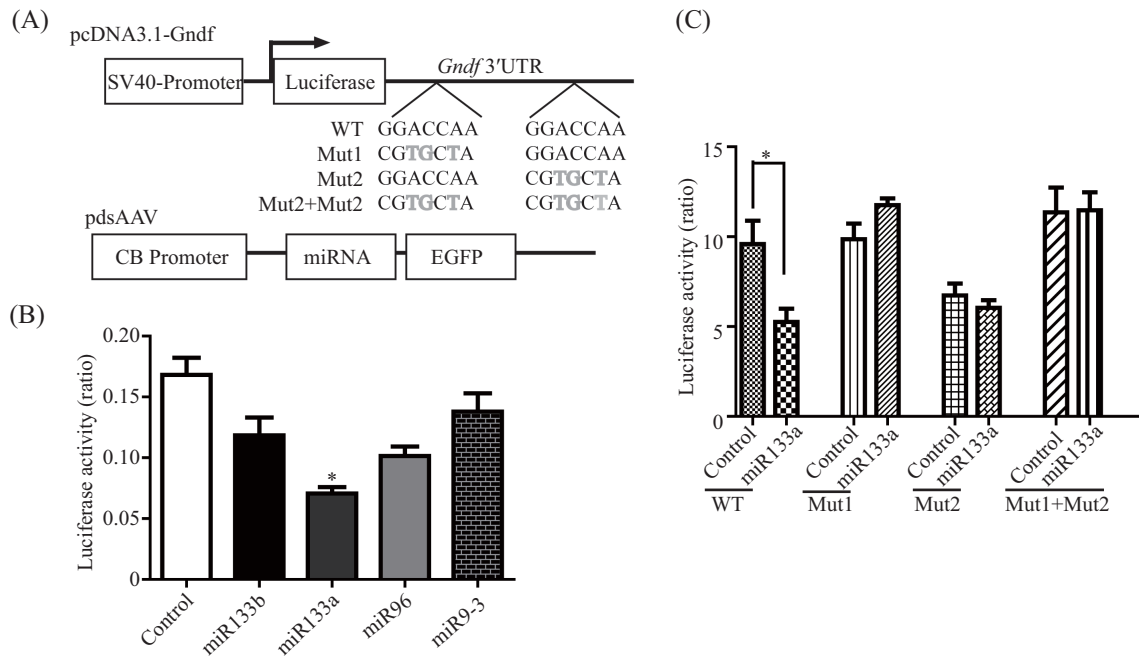
图1 生物信息学分析*Gdnf* mRNA 3'UTR在不同物种间的保守性  
 Fig.1 Bioinformatic analysis of the conservation of *Gdnf* mRNA 3'UTR



A: 三个生物信息学网站预测*Gdnf* mRNA 3'UTR上结合的潜在miRNA; B: miR133a在*Gdnf* mRNA 3'UTR上可能的结合位点。  
 A: the prediction of the potential miRNAs which can target the 3'UTR of *Gdnf* mRNA through three bioinformatics websites; B: the potential binding sites of miR133a towards the 3'UTR of *Gdnf* mRNA.

图2 生物信息学预测*Gdnf* mRNA 3'UTR上结合的miRNA及miR133a与其结合位点

Fig.2 Bioinformatic analysis of the putative miRNAs binding on *Gdnf* mRNA 3'UTR and putative target sites for miR133a



A: 荧光素酶报告试验所用质粒示意图; B: 用荧光素酶报告实验检测在转染了不同的miRNA的质粒(对照miRNA、miR133b、miR133a、miR96、miR9-3)之后,正常*Gdnf*报告载体荧光素酶活性的变化, \* $P < 0.05$ , 与对照组比较; C: 用荧光素酶报告试验检测在转染了对照miRNA或miR133a后,正常*Gdnf*报告载体和三个*Gdnf*种子序列突变载体的荧光素酶活性的变化, \* $P < 0.05$ 。

A: The schematic diagram of the plasmids used in the luciferase report assay; B: the luciferase activity of the wild type *Gdnf* reporter vector after the transfection of different plasmids of miRNA (control miRNA, miR133b, miR133a, miR96, miR9-3), \* $P < 0.05$  vs control group; C: the luciferase activity of the wild type and the mutant type *Gdnf* reporter vector after the transfection of control miRNA or miR133a, \* $P < 0.05$ .

图3 miR133a靶向结合于*Gdnf* mRNA的3'UTR  
Fig.3 miR133a targets mRNA 3'UTR of *Gdnf*

达miR133a的实验组荧光比值显著下降( $P < 0.05$ ), 而其他潜在miRNA的荧光比值变化无统计学差异(图3B)。将3'UTR上的miR133a的结合序列突变后(图3A), 实验组和对照组差异无统计学意义(图3C)。综上所述, 这些数据表明, miR133a能直接结合于*Gdnf* mRNA的3'UTR。

### 2.3 miR133a下调*Gdnf*的mRNA和蛋白质

随后, 我们探究了miR133a是否能够功能性调控内源性*Gdnf*基因的表达。将miR133a mimic和阴性对照(100 nmol/L)分别转染到后肾帽状间充质细胞mK3细胞。转染miR133a后, *Gdnf* mRNA水平( $P < 0.05$ )和蛋白质水平明显下降(图4A和图4B)。此结果提示, miR133a能功能性下调*Gdnf*的表达。

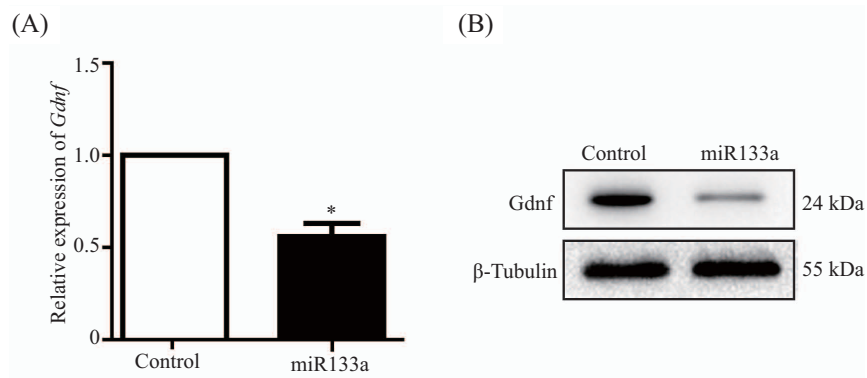
### 2.4 miR133a抑制胚肾输尿管芽的发育

根据前人研究, 在胚肾发育过程中*Gdnf*由后肾帽状间充质细胞分泌到帽状间充质细胞与输尿管芽的间隙, 诱导输尿管芽的生成和发育<sup>[5-8]</sup>。由于上述研究发现, miR133a抑制*Gdnf*的表达, 我们接着检测了miR133a对输尿管芽发育调控的影响。采用解离重聚的方法<sup>[10]</sup>体外培养胚肾组织, 并在重聚之前将

miR133a和阴性对照分别转染到离体培养的胚肾组织中。结果显示, 与对照组相比, miR133a处理组的输尿管芽数量显著减少( $P < 0.05$ )(图5A和图5B)。以上结果表明, miR133a能够抑制胚肾发育过程中的输尿管芽的发育。

## 3 讨论

哺乳动物胚胎肾脏发育主要是后肾帽状间充质细胞与输尿管芽相互诱导、共同发育的过程, 前者最终分化发育成为肾单位, 而后者发育为输尿管。两者在发育过程中的相互诱导主要依赖各自分泌的因子, 比如*Gdnf*就是已知的由后肾帽状间充质细胞分泌并调控输尿管芽发育的最重要的因子之一。研究*Gdnf*的调控网络对研究胚肾发育, 尤其是输尿管的发育过程尤为重要。已有报道称, *Gdnf*在哺乳动物的后肾发育过程中主要表达在后肾帽状间充质细胞中。作为分泌因子, 其能结合在输尿管芽细胞上的Ret酪氨酸激酶受体, 激活PI3K(phosphatidylinositol-3-kinase)和EKR(extracellular signal-related kinase)信号通路, 进而促进输尿管芽细胞的迁移和

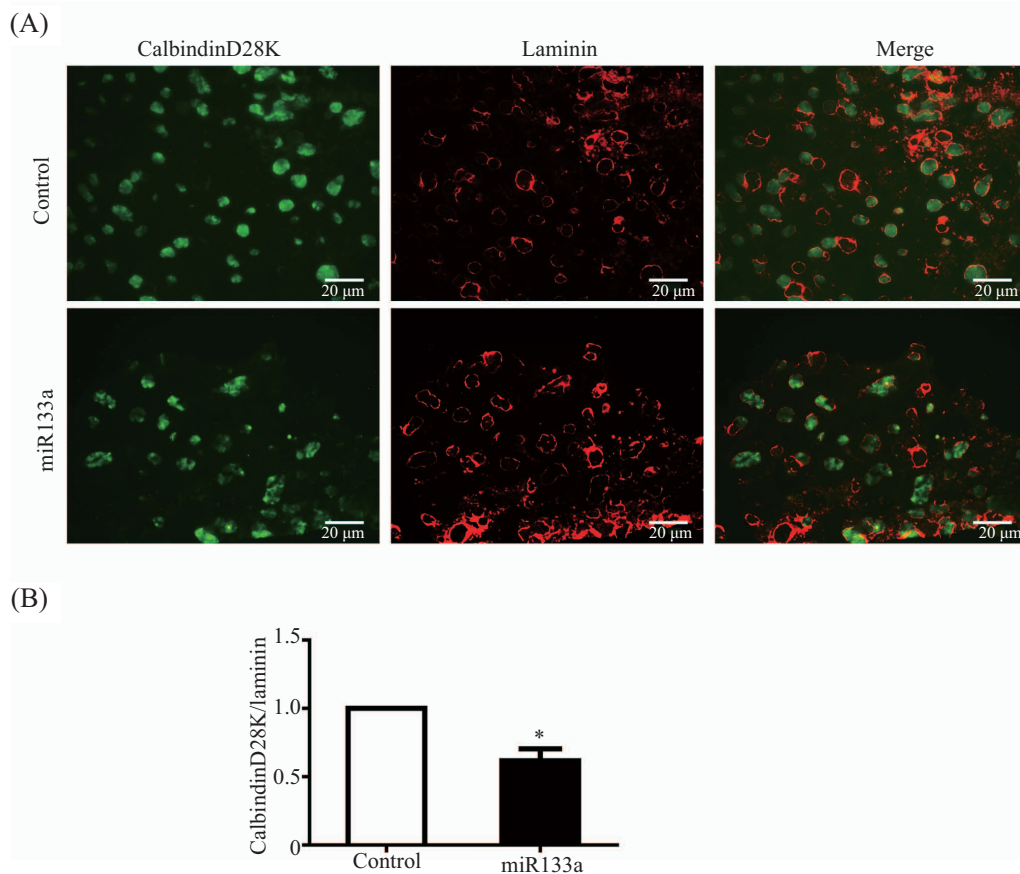


A: Real-time PCR检测转染对照miRNA或miR133a后对*Gdnf*的mRNA水平的影响,  $*P<0.05$ , 与对照组比较; B: 免疫蛋白印迹法检测转染对照miRNA或miR133a后对*Gdnf*蛋白水平的影响。

A: the mRNA level of *Gdnf* after the transfection of control miRNA or miR133a measured by Real-time PCR,  $*P<0.05$  vs control group; B: the protein level of *Gdnf* after the transfection of control miRNA or miR133a measured by Western blot.

图4 miR133a抑制*Gdnf*的mRNA和蛋白质水平

Fig.4 miR133a decreases the mRNA and protein level of *Gdnf*



A: 免疫荧光检测胚胎在解离重聚过程中转染对照miRNA或miR133a后肾脏的发育情况, CalbindinD28K为胚胎中输尿管芽的标志物, laminin(层黏连蛋白)是胚胎发育中后肾帽状间充质细胞发育形成的肾小囊的标志物; B: 免疫荧光结果的定量分析图, CalbindinD28K与laminin二者的比率代表输尿管芽的发育情况,  $*P<0.05$ , 与对照组比较。

A: the immunofluorescence detection of embryo kidney after the transfection of control miRNA or miR133a in the process of dissociation and reaggregation, CalbindinD28K is the marker of ureteric bud, laminin is the marker of renal vesicles generated from the cap mesenchymal during the embryo kidney development; B: Histogram shows the semi-quantitative analysis of the immunofluorescence results, the ratio between CalbindinD28K and laminin represents the the development of ureteric bud,  $*P<0.05$  vs control group.

图5 miR133a对输尿管芽发育的影响

Fig.5 The effect of miR133a on the development of ureteric bud

增殖,这对输尿管的发育至关重要<sup>[8]</sup>。前人的研究主要集中在研究*Gdnf/Ret*通路激活下游靶基因,促进输尿管芽的发育,而*Gdnf*的上游调控鲜有报道。本研究主要关注miRNA这一作用广泛的调控因子,尤其是通过调控*Gdnf*基因表达,参与输尿管芽发育的miRNA。前人的研究结果和本课题的前期研究结果都显示,miRNA能够通过靶向调控胚肾发育的关键因子从而参与胚肾发育。但以往的研究大多集中于调控肾单位发育的miRNA,而对调控输尿管芽发育的miRNA关注较少。本研究首次通过生物信息学方法分析了*Gdnf* mRNA的3'UTR,并预测了能与其靶向结合的miRNA。我们发现,多个网站共同预测到miR133a,并且获知能结合miR133a的*Gdnf* mRNA 3'UTR序列在多个物种中高度保守。这提示了miR133a在靶向结合*Gdnf* mRNA 3'UTR并参与输尿管芽发育的潜在可能性。

前人关于miR133a的研究主要集中于其对癌症的调控作用,例如恶性神经胶质瘤、肝细胞癌、子宫内膜癌等<sup>[14-16]</sup>。而我们的研究发现,*Gdnf* mRNA 3'UTR存在miR133a的结合位点。在双荧光素酶报告基因系统中,过表达miR133a能够显著抑制*Gdnf*荧光素酶报告基因载体的荧光酶活性。同时,miR133a能下调*Gdnf* mRNA和蛋白质水平。在离体胚肾培养实验中,miR133a还能够抑制输尿管芽的发育。这些数据,不仅很好吻合了前人关于miRNA和*Gdnf*作用的研究结果<sup>[5-8,11-13]</sup>,而且证实了miR133a能够靶向*Gdnf* mRNA,下调*Gdnf*表达,并参与胚肾输尿管芽的发育,为进一步理解胚肾发育的复杂分子机制提供了实验基础。

*Gdnf* mRNA 3'UTR是否结合其他miRNA? miR133a是否能够在体内调控*Gdnf*基因表达及输尿管芽发育? 这些都需要在miR133a基因敲除小鼠模型上作深入的研究。

### 参考文献 (References)

- Pillai RS, Bhattacharyya SN, Filipowicz W. Repression of protein synthesis by miRNAs: How many mechanisms? *Trends Cell Biol* 2007; 17(3): 118-26.
- Garofalo M, Condorelli GL, Croce CM, Condorelli G. MicroRNAs as regulators of death receptors signaling. *Cell Death Differ* 2010; 17(2): 200-8.
- Yosypiv IV. Renin-angiotensin system-growth factor cross-talk: A novel mechanism for ureteric bud morphogenesis. *Pediatr Nephrol* 2009; 24(6): 1113-20.
- Basson MA, Watson-Johnson J, Shakya R, Akbulut S, Hyink D, Costantini FD, *et al.* Branching morphogenesis of the ureteric epithelium during kidney development is coordinated by the opposing functions of GDNF and Sprouty1. *Dev Biol* 2006; 299(2): 466-77.
- Pichel JG, Shen L, Sheng HZ, Granholm AC, Drago J, Grinberg A, *et al.* Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF. *Nature* 1996; 382(6586): 73-6.
- Moore MW, Klein RD, Farinas I, Sauer H, Armanini M, Phillips H, *et al.* Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. *Nature* 1996; 382(6586): 76-9.
- Costantini F. Renal branching morphogenesis: Concepts, questions, and recent advances. *Differentiation* 2006; 74(7): 402-21.
- Costantini F, Shakya R. GDNF/Ret signaling and the development of the kidney. *Bioessays* 2006; 28(2): 117-27.
- Bryksin AV, Matsumura I. Overlap extension PCR cloning: A simple and reliable way to create recombinant plasmids. *Biotechniques* 2010; 48(6): 463-5.
- Unbekandt M, Davies JA. Dissociation of embryonic kidneys followed by reaggregation allows the formation of renal tissues. *Kidney Int* 2010; 77(5): 407-16.
- Sakr M, Takino T, Sabit H, Nakada M, Li Z, Sato H. miR-150-5p and miR-133a suppress glioma cell proliferation and migration through targeting membrane-type-1 matrix metalloproteinase. *Gene* 2016; 587(2): 155-62.
- Tao J, Wu D, Xu B, Qian W, Li P, Lu Q, *et al.* microRNA-133 inhibits cell proliferation, migration and invasion in prostate cancer cells by targeting the epidermal growth factor receptor. *Oncol Rep* 2012; 27(6): 1967-75.
- Suzuki S, Yokobori T, Tanaka N, Sakai M, Sano A, Inose T, *et al.* CD47 expression regulated by the miR-133a tumor suppressor is a novel prognostic marker in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2012; 28(2): 465-72.
- Wang J, Li J, Guo F, Yan Y. MicroRNA-133a inhibits the malignant behavior of glioma via downregulation of matrix metalloproteinase 9. *Mol Med Rep* 2016; 13(4): 3220-6.
- Ma J, Wang T, Guo R, Yang X, Yin J, Yu J, *et al.* MicroRNA133a and microRNA326 cocontribute to hepatocellular carcinoma 5fluorouracil and cisplatin sensitivity by directly targeting Bcell lymphomaextra large. *Mol Med Rep* 2015; 12(4): 6235-40.
- Yamamoto N, Nishikawa R, Chiyomaru T, Goto Y, Fukumoto I, Usui H, *et al.* The tumor-suppressive microRNA-1/133a cluster targets PDE7A and inhibits cancer cell migration and invasion in endometrial cancer. *Int J Oncol* 2015; 47(1): 325-34.