

miR-21 靶向抑制 PTEN/AKT/mTOR 通路 改善小鼠慢性肾纤维化的机制研究

祁 娇,许珊珊,其其格,孟 彦,赵建荣,张丽英

(内蒙古医科大学附属医院肾内科,呼和浩特 010050)

摘要 **目的** 研究 miR-21 靶向调节磷酸酶与张力蛋白同源物(PTEN)/蛋白激酶 B(AKT)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)通路改善小鼠慢性肾纤维化的机制。**方法** 32 只慢性肾病模型小鼠随机分为模型组、miR-21 过表达组、miR-21 抑制组、miR-21 抑制+MK-2206 组各 8 只,将 8 只健康小鼠纳入对照组。miR-21 过表达组、miR-21 抑制组、miR-21 抑制+MK-2206 组尾静脉注射慢病毒(50 μ L,每只 1×10^8 TU),每周 1 次,连续 3 周。对照组、模型组注射等量空载体(LV-NC)。miR-21 抑制+MK-2206 组同时另灌胃 AKT/mTOR 通路抑制剂 MK-2206 480 mg/kg,每周 1 次,连续 3 周。比较各组 miR-21 表达、24 h 尿蛋白定量、肌酐(Scr)、血尿素氮(BUN),肾组织 I 型胶原蛋白(Collagen I)、III 型胶原蛋白(Collagen III)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、PTEN 蛋白表达及 p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR;HE 染色观察肾组织病理改变,Masson 染色观察肾组织纤维化程度;双荧光素酶实验验证 miR-21 与 PTEN 的靶向关系。**结果** 与模型组比较,miR-21 过表达组肾组织 miR-21 表达升高($P < 0.05$),miR-21 抑制组肾组织 miR-21 表达降低($P < 0.05$)。与模型组比较,miR-21 过表达组 24 h 尿蛋白定量、Scr、BUN,肾组织 Collagen I、Collagen III、 α -SMA 蛋白表达均升高($P < 0.05$),而 miR-21 抑制组均降低($P < 0.05$);与 miR-21 抑制组比较,miR-21 抑制+MK-2206 组 24 h 尿蛋白定量、Scr、BUN,肾组织 Collagen I、Collagen III、 α -SMA 蛋白表达均降低($P < 0.05$)。与模型组比较,miR-21 过表达组 PTEN 蛋白表达降低($P < 0.05$),p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 升高($P < 0.05$);miR-21 抑制组 PTEN 蛋白表达升高($P < 0.05$),p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 均降低($P < 0.05$);与 miR-21 抑制组比较,miR-21 抑制+MK-2206 组 p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 均降低($P < 0.05$),PTEN 蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。HE 和 Masson 染色显示,对照组肾脏结构正常,几乎无纤维化;模型组出现肾小球增大、毛细血管粘连及局灶性纤维化;miR-21 过表达组肾小球结构严重破坏,伴广泛纤维化和肾小管萎缩;miR-21 抑制组病理变化和纤维化程度减轻;而 miR-21 抑制+MK-2206 组仅见轻微病理改变和轻度纤维化,间质基本正常。与 PTEN-WT + NC mimics 组比较,PTEN-WT + miR-21 mimics 组相对荧光素酶活性降低($P < 0.001$),PTEN-WT + NC mimics 组和 PTEN-MUT + miR-21 mimics 组相对荧光素酶活性差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** miR-21 可能通过靶向调控 PTEN 进而抑制 AKT/mTOR 通路改善慢性肾病小鼠肾功能指标,减轻肾纤维化程度。

关键词 肾病;纤维化;肾功能;AKT/mTOR 通路;miR-21;靶向

中图分类号 R 34

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2026)02-0217-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2026.02.005

慢性肾病的发病率在过去十年间以每年 6.8% 的速度递增,已成为威胁人类健康的第三大杀手^[1]。肾纤维化是慢性肾病进展至终末期的核心病理特征^[2],该过程涉及复杂的信号网络调控,其中磷酸酶与张力蛋白同源物(phosphatase and tensin homolog, PTEN)介导的蛋白激酶 B(protein kinase B, AKT)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapa-

mycin, mTOR)通路备受关注。近年研究显示^[3-4],微小 RNA(microRNA, miRNA)-21 在多种器官纤维化进程中呈现双重调控特性,既可促进心肌成纤维细胞活化,又能抑制肝星状细胞转化,提示其可能通过不同下游靶点参与纤维化调控网络。生物信息学预测显示 PTEN mRNA 的 3'非翻译区(3'UTR)区存在 miR-21 的潜在结合位点,而 PTEN 作为 AKT/mTOR 通路的负向调控因子,其表达水平改变可能直接影响肾小管上皮细胞转分化进程^[5-6]。但现有研究尚未明确 miR-21 是否通过靶向调控 PTEN 介导 AKT/mTOR 通路参与肾纤维化进程。本研究通过构建小鼠慢性肾纤维化模型,验证 miR-21 对 PTEN/AKT/mTOR 信号通路的靶向调控作用,以期为进一步理解表观遗传调控在肾纤维化中的作用提供新视角。

2025-12-05 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81960143),内蒙古自治区科技计划项目(编号:2022YFSH0087),内蒙古自治区自然科学基金项目(编号:2022MS08063、2025QN08029)

作者简介:祁 娇,女,硕士研究生,副主任医师;

张丽英,女,博士研究生,主任医师,通信作者,Email:

85366462@qq.com

1 材料与方法

1.1 实验动物及细胞系 43只SPF级8周龄雄性C57BL/6小鼠, 体重20~25 g, 购自北京贝优生物科技有限公司, 生产许可证号: SCXK(京)2024-0016。饲养于SPF级环境, 温度(22±2)°C、相对湿度55%±10%、12 h/12 h明暗交替周期。术前适应性喂养1周, 自由饮水饮食。HEK293T细胞系购自美国菌种保藏中心。本研究获得内蒙古医科大学附属医院伦理委员会批准(批准号: Y. 2024068)。

1.2 主要试剂和仪器 携带miR-21模拟物的慢病毒、携带miR-21抑制剂的慢病毒由上海吉凯基因化学技术公司合成; AKT/mTOR通路抑制剂MK-2206(货号: HY-10358)购自美国MCE公司; 血肌酐(serum creatinine, Scr)、血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)(货号: KL-Scr-04、KL-BUN-04)检测试剂盒购自上海康朗生物科技有限公司; 实时定量逆转录聚合酶链反应(quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR)试剂盒、HE染色试剂盒、Masson染色试剂盒(货号: 170-8890、161-0403、161-0437)购自美国Bio-Rad公司; 考马斯亮蓝染液(货号: P0006)购自上海碧云天生物技术有限公司; 兔抗鼠I型胶原蛋白(collagen type I, Collagen I)、III型胶原蛋白(collagen type III, Collagen III)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、PTEN、p-AKT、AKT、p-mTOR、mTOR(货号: ab7778、ab7778、ab5694、ab32199、ab38449、ab8805、ab109268、ab2732)一抗购自美国Abcam公司; 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记兔抗小鼠二抗(货号: JM-HRP-M011)购自上海杰美基因医药科技有限公司。

SPARK 10M酶标仪购自瑞士Tecan公司; CFX96 Touch PCR仪、PowerPac Basic电泳仪、ChemiDoc MP凝胶成像系统购自美国Bio-Rad公司; DMi8倒置显微镜购自德国Leica Microsystems公司。

1.3 方法

1.3.1 小鼠慢性肾病模型构建 用经典5/6肾切除术建立小鼠慢性肾病模型^[7]。术前禁食不禁水4~6 h, 背部及侧腹部备皮、消毒。腹腔注射戊巴比妥钠50 mg/kg, 手术分两期进行。①第一期手术: 部分切除左肾。俯卧位固定小鼠, 左腰背部朝上。在左背部脊柱旁1 cm处作纵向切口约1.5 cm, 钝性分离皮下组织和背部肌肉, 暴露左肾及周围脂肪

垫。用棉签轻轻推开肾周脂肪, 暴露肾包膜。用6-0丝线结扎左肾上极和下极的血管分支, 保留中间1/3肾组织的血供。用显微剪剪除结扎区域外的肾上下极组织(约2/3体积), 保留中央1/3肾组织。电凝刀或明胶海绵止血, 避免损伤肾盂和输尿管。用5-0可吸收缝线缝合肌肉层, 4-0丝线缝合皮肤。小鼠置于37°C加热垫复苏, 苏醒后放回笼舍, 提供含镇痛药和抗生素的饮水。②第二期手术(术后7 d): 完全切除右肾。麻醉方式同第一期, 俯卧位固定, 右腰背部朝上。右背部脊柱旁1 cm处作纵向切口约1.5 cm, 分离肌肉层和脂肪垫, 暴露右肾及肾蒂。用6-0丝线双重结扎右肾动静脉和输尿管。在结扎线远端剪断血管和输尿管, 完整取出右肾。缝合步骤、术后恢复条件同第一期。术后常规饲养4周以诱导慢性肾纤维化。建模成功标准: Scr和BUN较健康小鼠升高1.5~2倍以上, 24 h尿蛋白定量达到≥50~100 mg/24 h或较基线升高2~3倍以上。

1.3.2 实验分组及处理 35只小鼠中32只建模成功, 随机分为模型组、miR-21过表达组、miR-21抑制组、miR-21抑制+MK-2206组各8只, 将8只健康小鼠纳入对照组。miR-21过表达组、miR-21抑制组、miR-21抑制+MK-2206组通过尾静脉注射携带肾特异性启动子即Nphs1启动子的慢病毒(50 μ L, 每只小鼠 1×10^8 TU), miR-21过表达组注射慢病毒携带miR-21模拟物, miR-21抑制组、miR-21抑制+MK-2206组注射的慢病毒携带miR-21抑制剂, 每周1次, 连续3周。对照组、模型组注射等量空载体(LV-NC)。miR-21抑制+MK-2206组同时另灌胃480 mg/kg MK-2206^[8], 每周1次, 连续3周。基于标准载体设计, Nphs1启动子来源于nephin基因, 能在肾小球足细胞中特异性驱动基因表达, 通过结合足细胞特异性转录因子实现高度靶向性, 减少肝、心等非靶器官的脱靶效应, 确保miR-21的调控仅限于肾脏组织, 从而增强实验的特异性和可靠性。小鼠经心脏穿刺取血后, 仰卧位固定于解剖板上, 乙醇消毒腹部。用镊子提起腹部皮肤, 沿腹中线纵向剪开皮肤和肌肉层, 暴露腹腔, 定位肾脏。用钝头镊子轻拨肠道和脂肪, 暴露肾脏, 避免挤压或牵拉。用眼科剪沿肾门处剪断肾动静脉和输尿管, 完整取出肾脏。将肾脏放入预冷的生理盐水或PBS中轻晃, 去除表面血液和杂质。用锋利刀片切除肾脏被膜及周围脂肪组织, 避免损伤肾实质。将肾组织分为两份, 一份保留于液氮中, 一份迅速浸入4%中性多聚

甲醛,4℃固定24 h。

1.3.3 qRT-PCR检测肾组织miR-21表达 取液氮速冻的肾组织进行匀浆,采用TRIzol法提取总RNA,经NanoDrop验证RNA纯度及完整性,进行反转录(16℃ 30 min,42℃ 30 min,85℃ 5 min),将miR-21特异性茎环引物与总RNA结合合成cDNA。qPCR扩增时使用SYBR Green体系,共20 μL,SYBR Green Master Mix 10 μL,cDNA模板2 μL(稀释10倍后使用),正向引物0.5 μL(10 μmol/L),通用反向引物0.5 μL(10 μmol/L),RNase-free H₂O 7 μL。扩增程序:预变性:95℃ 5 min,循环40次:95℃ 10 s,60℃ 30 s(采集荧光),熔解曲线分析:60℃,95℃,每0.5℃升1次。用2^{-ΔΔC_T}法计算miR-21表达水平。miR-21 Forward Primer:5'-TAGCTTATCAGACTGAT GTTG-3', Reverse Primer:5'-GTGCAGGCTCCGAG GTATT-3'; U6 snRNA Forward Primer:5'-CTCGCT TCGGCAGCACA-3', Reverse Primer:5'-AACGCTTC AC GAATTTGCGT-3'。

1.3.4 肾功能指标检测 将小鼠单独置于代谢笼中,笼底有尿液收集装置,持续24 h,避免食物残渣和粪便污染尿液。采用考马斯亮蓝法检测24 h尿蛋白。混匀尿液,3 000 r/min离心10 min去除沉淀,取上清液,按试剂盒说明操作,检测595 nm处吸光度,制作标准曲线。尿蛋白总量(mg/24 h)=尿蛋白浓度(mg/mL)×尿液体积(mL)。小鼠经心脏穿刺取血1.5 mL,静置30 min后,3 000 r/min离心15 min,取血清。经酶法检测Scr,酶偶联法检测BUN,根据试剂盒说明书操作。

1.3.5 肾组织Collagen I、Collagen III、α-SMA蛋白表达检测 取液氮中保存的肾组织,研磨充分后加入RIPA裂解液,冰上裂解30 min。4℃、12 000 r/min离心15 min,取上清液测蛋白浓度。配制10% SDS-PAGE分离胶,5%浓缩胶,每孔上样50 μg总蛋白,Marker作为参照,80 V恒压浓缩胶,120 V分离胶,至溴酚蓝到达胶底部。PVDF膜预活化,300 mA恒流转膜90 min。5%脱脂牛奶室温封闭1 h,加入兔抗鼠Collagen I(1:1 000)、Collagen III(1:800)、α-SMA(1:2 000)一抗,4℃孵育过夜。加入HRP标记兔抗小鼠二抗(1:5 000),室温孵育1 h。加入ECL化学发光试剂显影,凝胶成像系统采集信号。ImageJ分析条带灰度值,以GAPDH为内参计算相对表达量。

1.3.6 HE染色观察肾组织病理改变 取4%中性

多聚甲醛中保存的肾组织,梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡浸蜡包埋,切片为4 μm薄片贴附于载玻片。染色前经二甲苯脱蜡和梯度乙醇复水,依次用苏木精染核10 min,流水冲洗后以1%盐酸乙醇分色、氨水返蓝,再用伊红染细胞质3 min;染色后的切片经乙醇脱水、二甲苯透明后封片,显微镜下观察病理改变。

1.3.7 Masson染色观察肾组织纤维化程度 取石蜡切片,染色前经二甲苯脱蜡及梯度乙醇复水,依次用Weigert铁苏木精染细胞核10 min,流水冲洗返蓝后,丽春红-酸性品红混合液染胞质及肌纤维10 min,以1%磷钼酸分化非胶原成分,苯胺蓝特异性标记胶原纤维5 min;脱水透明后中性树胶封片,镜下观察纤维化程度。

1.3.8 肾组织PTEN、p-AKT、AKT、p-mTOR、mTOR蛋白表达检测 取液氮中保存的肾组织,裂解、上样、转膜等步骤同1.3.5。5%脱脂牛奶室温封闭1 h,加入兔抗鼠PTEN、p-AKT、AKT、p-mTOR、mTOR(均1:1 000)一抗,4℃孵育过夜。加入HRP标记兔抗小鼠二抗(1:5 000),室温孵育1 h。加入ECL化学发光试剂显影,凝胶成像系统采集信号。ImageJ分析条带灰度值,以GAPDH为内参计算相对表达量。

1.3.9 双荧光素酶实验验证miR-21与PTEN的靶向关系 构建野生型(WT)报告载体,将PTEN基因3'UTR含有miR-21预测结合位点的序列克隆至pmirGLO双荧光素酶报告载体中(命名为pmirGLO-PTEN-WT),突变型(MUT)报告载体:通过定点突变技术破坏miR-21结合位点的种子序列,构建pmirGLO-PTEN-MUT载体作为阴性对照。使用HEK293T细胞系,分别共转染pmirGLO-PTEN-WT + miR-21 mimics(模拟miR-21过表达)、pmirGLO-PTEN-WT + miRNA阴性对照(NC mimics)、pmirGLO-PTEN-MUT + miR-21 mimics,共转染海肾荧光素酶(renilla luciferase, hRluc)作为归一化内参,设为内参对照组。转染48 h后裂解细胞,使用双荧光素酶检测试剂盒测定荧光素酶活性,计算Firefly/Renilla荧光素酶活性比值,以NC mimics组为基准进行归一化分析。

1.4 统计学处理 用IBM SPSS 19.0软件分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多样本计量资料以单因素方差分析检验,进一步采用Bonferroni法或LSD-*t*法进行两两比较。*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠肾组织 miR-21 表达量比较 与对照组比较,模型组肾组织 miR-21 表达升高($P_{\text{Bonferroni}}=0.0036$);与模型组比较,miR-21 过表达组肾组织 miR-21 表达升高($P_{\text{Bonferroni}}=0.0003$),miR-21 抑制组肾组织 miR-21 表达降低($P_{\text{Bonferroni}}=0.0009$);miR-21 抑制组与 miR-21 抑制+MK-2206 组肾组织 miR-21 表达差异无统计学意义($P_{\text{Bonferroni}}=0.874$)。见表 1。

表 1 各组 miR-21 表达比较($\bar{x}\pm s$)

Tab. 1 Comparison of miR-21 expression in each group ($\bar{x}\pm s$)		
Group	<i>n</i>	miR-21 expression
Control	8	1.00±0.05
Model	8	2.09±0.37 [△]
MiR-21 overexpression	8	5.34±0.78 [#]
MiR-21 inhibition	8	1.02±0.04 [*]
MiR-21 inhibition + MK-2206	8	1.02±0.03
<i>F</i> value		187.129
<i>P</i> value		<0.001

[△] $P<0.05$ vs Control group; [#] $P<0.05$ vs model group.

2.2 各组小鼠肾功能指标 24 h 尿蛋白定量、Scr、BUN 比较 与对照组比较,模型组 24 h 尿蛋白定量、Scr、BUN 均升高($P_{\text{Bonferroni}}=0.036、0.024、0.045$);与模型组比较,miR-21 过表达组 24 h 尿蛋白定量、Scr、BUN 均升高($P_{\text{Bonferroni}}=0.024、0.030、0.027$),miR-21 抑制组 24 h 尿蛋白定量、Scr、BUN 均降低($P_{\text{Bonferroni}}=0.012、0.018、0.030$);与 miR-21 抑制组比较,miR-21 抑制+MK-2206 组 24 h 尿蛋白定量、Scr、BUN 均降低($P_{\text{Bonferroni}}=0.021、0.039、0.015$)。见表 2。

2.3 各组小鼠肾组织 Collagen I、Collagen Ⅲ、α-SMA 蛋白表达 与对照组比较,模型组肾组织 Collagen I、Collagen Ⅲ、α-SMA 蛋白表达均升高($P_{\text{Bonferroni}}=0.039、0.030、0.048$);与模型组比较,miR-21 过表达组肾组织 Collagen I、Collagen Ⅲ、α-SMA 蛋白表达均升高($P_{\text{Bonferroni}}=0.027、0.033、0.024$),miR-21 抑制组肾组织 Collagen I、Collagen Ⅲ、α-SMA 蛋白表达均降低($P_{\text{Bonferroni}}=0.015、0.021、0.012$);与 miR-21 抑制组比较,miR-21 抑制+MK-2206 组肾组织 Collagen I、Collagen Ⅲ、α-SMA 蛋白表达均降低($P_{\text{Bonferroni}}=0.018、0.030、0.009$)。见表 3。

2.4 各组小鼠肾组织病理变化 HE 染色显示,对照组肾小球结构完整,毛细血管祥开放良好,近曲

表 2 各组肾功能指标比较 ($n=8, \bar{x}\pm s$)
Tab. 2 Comparison of renal function indicators

in each group ($n=8, \bar{x}\pm s$)			
Group	24 h urine protein quantification (mg/24 h)	Scr (μmol/L)	BUN (mmol/L)
Control	4.57±0.81	35.49±5.06	6.02±1.07
Model	39.87±6.13 [△]	100.36±18.85 [△]	17.69±3.31 [△]
MiR-21 overexpression	48.55±8.94 [#]	126.68±23.44 [#]	22.19±4.15 [#]
MiR-21 inhibition	17.04±3.19 [#]	66.25±13.09 [#]	13.41±2.95 [#]
MiR-21 inhibition+MK-2206	9.14±2.82 [*]	40.22±7.14 [*]	8.12±1.53 [*]
<i>F</i> value	110.152	53.388	44.089
<i>P</i> value	<0.001	<0.001	<0.001

[△] $P<0.05$ vs Control group; [#] $P<0.05$ vs model group; ^{*} $P<0.05$ vs miR-21 inhibition group.

表 3 各组肾组织 Collagen I、Collagen Ⅲ、α-SMA 蛋白表达比较 ($n=8, \bar{x}\pm s$)

Tab. 3 Comparison of protein expressions of Collagen I, Collagen Ⅲ and α-SMA in renal tissues in each group ($n=8, \bar{x}\pm s$)			
Group	Collagen I	Collagen Ⅲ	α-SMA
Control	0.21±0.04	0.09±0.01	0.11±0.03
Model	0.47±0.08 [△]	0.37±0.04 [△]	0.58±0.09 [△]
MiR-21 overexpression	0.69±0.13 [#]	0.54±0.06 [#]	0.73±0.12 [#]
MiR-21 inhibition	0.31±0.04 [#]	0.22±0.04 [#]	0.31±0.04 [#]
MiR-21inhibition+MK-2206	0.23±0.03 [*]	0.11±0.02 [*]	0.09±0.01 [*]
<i>F</i> value	58.569	196.329	128.733
<i>P</i> value	<0.001	<0.001	<0.001

[△] $P<0.05$ vs Control group; [#] $P<0.05$ vs model group; ^{*} $P<0.05$ vs miR-21 inhibition group.

小管上皮细胞排列紧密呈立方形,刷状缘完整,胞质粉染均匀,远曲小管管腔规则,间质未见炎性细胞浸润或纤维化改变,细胞核大小均一。模型组肾小球体积增大,部分毛细血管祥粘连,系膜细胞轻度增生,近曲小管出现区域性上皮细胞扁平化,刷状缘部分脱落,间质可见散在淋巴细胞浸润,局灶性胶原纤维沉积,细胞核染色质轻度浓缩。miR-21 过表达组肾小球结构严重破坏,呈现分叶状改变,毛细血管祥闭塞,广泛肾小管萎缩,部分细胞出现核碎裂。相较于模型组,miR-21 抑制组病理变化减轻,系膜基质中度扩张,小管上皮细胞空泡轻微变性,管腔结构尚存。miR-21 抑制+MK-2206 组仅见轻微病理改变,肾小球轻度充血,个别系膜细胞增生,小管上皮细胞轻度肿胀,偶见嗜酸性颗粒变性。间质基本保持正常结构。见图 1。

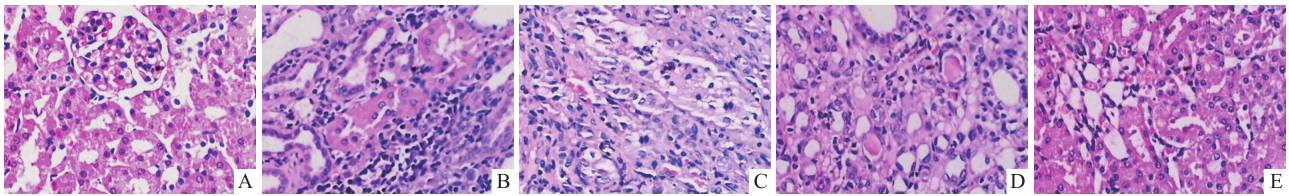


图1 肾组织病理变化 HE 染色图 ×100

Fig. 1 HE-stained section of renal tissue showing pathological changes ×100

A: Control group; B: Model group; C: MiR-21 overexpression group; D: MiR-21 inhibition group; E: MiR-21 inhibition + MK-2206 group.

2.5 各组小鼠肾组织纤维化程度 Masson 染色结果显示,对照组仅见少量蓝色纤维分布于肾小球基底膜,间质几乎无纤维化;模型组肾小球系膜区和肾小管周围可见局灶性蓝色胶原沉积;miR-21 过表达组间质 50% 以上区域被致密蓝色胶原网络占据,伴肾小球硬化和肾小管萎缩;miR-21 抑制组纤维化程度介于模型组和 miR-21 过表达组之间,呈现片状蓝色胶原分布;miR-21 抑制+MK-2206 组仅见轻度纤维化,胶原主要分布于血管周围。见图2。

2.6 各组小鼠肾组织 PTEN 蛋白表达及 p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 比较 与对照组比较,模型组 PTEN 蛋白表达降低 ($P_{\text{Bonferroni}}=0.030$), p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 均升高 ($P_{\text{Bonferroni}}=0.024$ 、 0.036);与模型组比较,miR-21 过表达组 PTEN 蛋白表达降低 ($P_{\text{Bonferroni}}=0.018$), p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 均升高 ($P_{\text{Bonferroni}}=0.027$ 、 0.021);而 miR-21 抑制组 PTEN 蛋白表达升高 ($P_{\text{Bonferroni}}=0.012$), p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 均降低 ($P_{\text{Bonferroni}}=0.015$ 、 0.009);与 miR-21 抑制组比较,miR-21 抑制+MK-2206 组 p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 均降低 ($P_{\text{Bonferroni}}=0.030$ 、 0.024), PTEN 蛋白表达差异无统计学意义 ($P_{\text{Bonferroni}}=0.630$)。见表4。

2.7 双荧光素酶实验验证 miR-21 与 PTEN 的靶向关系 与 PTEN-WT + NC mimics 组比较,PTEN-WT + miR-21 mimics 组相对荧光素酶活性降低 ($\text{LSD-}t=10.078$, $P<0.001$),表明 miR-21 通过结合 PTEN 的 3'UTR 直接抑制其表达。PTEN-WT + NC mimics 组和 PTEN-MUT + miR-21 mimics 组的相对荧光素酶

表4 各组肾组织 PTEN 蛋白表达及 p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 比较 ($n=8, \bar{x}\pm s$)

Tab. 4 Expression of PTEN protein and comparison of p-AKT/AKT and p-mTOR/mTOR in renal tissues in each group ($n=8, \bar{x}\pm s$)

Group	PTEN	p-AKT/AKT	p-mTOR/mTOR
Control	0.97±0.12	0.11±0.02	0.19±0.03
Model	0.31±0.04 [△]	0.59±0.11 [△]	0.57±0.09 [△]
MiR-21 overexpression	0.16±0.03 [#]	0.68±0.07 [#]	0.67±0.11 [#]
MiR-21 inhibition	0.45±0.07 [#]	0.24±0.03 [#]	0.25±0.04 [#]
MiR-21 inhibition + MK-2206	0.46±0.06	0.10±0.02 [*]	0.19±0.03 [*]
F value	146.535	159.636	88.610
P value	<0.001	<0.001	<0.001

[△] $P<0.05$ vs Control group; [#] $P<0.05$ vs model group; ^{*} $P<0.05$ vs miR-21 inhibition group.

活性差异无统计学意义 ($P>0.05$),表明当 PTEN 3'UTR 的 miR-21 结合位点被突变后,miR-21 mimics 对荧光素酶活性的抑制作用完全消失,证明 miR-21 的调控依赖于 PTEN 3'UTR 的特异性结合位点。图3展示了 miR-21 能够直接且特异地结合至 PTEN 基因 3'UTR 上的预测位点,证明 miR-21 通过直接靶向结合 PTEN 基因 3'UTR 的特定序列,抑制 PTEN 的表达。见图3、表5。

3 讨论

慢性肾病肾纤维化是由多种病理机制交织形成的恶性循环,其核心特征为肾实质进行性瘢痕化

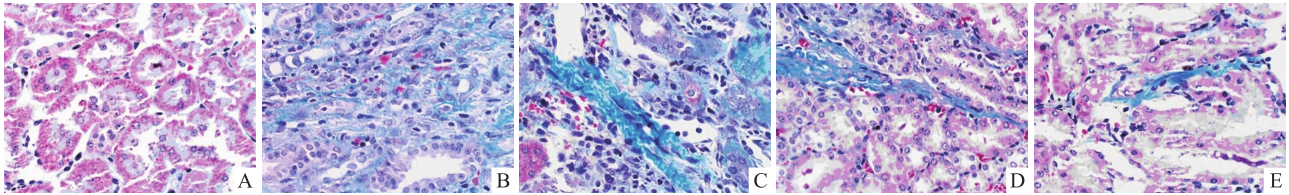


图2 肾组织纤维化程度 Masson 染色图 ×100

Fig. 2 Masson-stained section showing the degree of renal fibrosis ×100

A: Control group; B: Model group; C: MiR-21 overexpression group; D: MiR-21 inhibition group; E: MiR-21 inhibition + MK-2206 group.

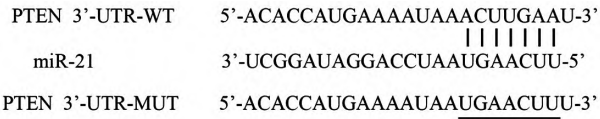


图3 双荧光素酶实验
Fig. 3 Dual-luciferase assay

表5 双荧光素酶实验结果 ($\bar{x}\pm s$)
Tab. 5 The results of dual-luciferase assay ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Relative luciferase activity
PTEN-WT + NC mimics	5	1.00±0.12
PTEN-WT + miR-21 mimics	5	0.35±0.08 ^Δ
PTEN-MUT + miR-21 mimics	5	0.92±0.10
F value		61.185
P value		<0.001

^ΔP<0.05 vs PTEN-WT + NC mimics group

与功能单位不可逆丧失^[9-11]。肾纤维化一旦进展至中晚期,常规治疗手段难以突破结构性重塑的物理屏障和信号稳态的生化屏障。目前临床主要依赖血管紧张素转换酶抑制剂/血管紧张素Ⅱ受体拮抗剂类药物延缓肾功能衰退,但疗效不佳,新型药物内皮素受体拮抗剂或钠-葡萄糖2型转运体抑制剂虽能部分改善代谢紊乱,却无法逆转已形成的间质纤维化。因此,探索精准、有效的治疗靶点,成为破解肾纤维化治疗困境的迫切需求。

本研究中,与对照组比较,模型组肾组织 miR-21 表达升高,且与模型组比较,miR-21 过表达组 24 h 尿蛋白定量、Scr、BUN 及肾组织 Collagen I、Collagen Ⅲ、α-SMA 蛋白表达均升高,miR-21 抑制组上述指标均降低,表明 miR-21 在慢性肾病肾纤维化中起促进作用,抑制其表达可改善肾功能及肾纤维化。miR-21 在正常组织中低表达,但在炎症、纤维化和肿瘤等病理状态下显著上调,其通过结合靶基因 mRNA 的 3'-UTR,抑制其翻译或促进降解,从而调控细胞增殖、凋亡、纤维化和炎症反应^[12-14]。Kim et al^[15] 研究中,miR-21 在肾纤维化模型的肾小管上皮区域显著上调,其诱导的促炎反应在肾纤维化发生中起关键作用,提示其有望作为治疗靶点。

PTEN 能抑制肾小球硬化、肾小管上皮细胞转分化及细胞外基质的积累,从而阻碍肾纤维化,并负向调控 AKT/mTOR 信号传导^[16]。AKT 参与调节活性氧稳态,影响细胞生长和增殖,并通过激活 mTORC1 抑制细胞自噬,而自噬对肾脏细胞维持稳态、活力和生理功能具有重要意义,可保护肾脏并减少纤维化。mTOR 信号通路的激活在肾脏纤维化

中起重要作用,诱导系膜细胞肥大和基质扩展,而雷帕霉素阻断 mTOR 信号可抑制转化生长因子-β₁ 诱导的成纤维细胞激活,减轻肾脏纤维化^[17]。PTEN/AKT/mTOR 通路的异常活化已被证实与促纤维化事件直接相关^[18]。miR-21 通过调控下游靶基因促进细胞外基质沉积和成纤维细胞活化,其直接结合 PTEN mRNA 的 3'UTR 区域,抑制其翻译,导致 PTEN 蛋白表达降低^[19-20]。抑制 miR-21 可恢复 PTEN 蛋白水平,PTEN 作为关键的磷酸酶,可通过去磷酸化 PIP3 抑制 PI3K/AKT/mTOR 通路的激活,从而增强对该通路的负调控作用。本研究显示,与 miR-21 抑制组比较,miR-21 抑制+MK-2206 组肾功能指标、肾纤维化蛋白标志物水平降低,且 miR-21 过表达可降低 PTEN 蛋白表达,提高 p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR,而 miR-21 抑制则发挥相反作用;双荧光素酶实验显示 PTEN 是 miR-21 的靶基因。本研究通过检测 miR-21 表达、肾功能指标、纤维化标志蛋白及 PTEN/AKT/mTOR 通路关键分子的变化,系统地揭示了 miR-21 上调、PTEN 表达抑制、AKT/mTOR 通路异常活化、胶原沉积增加、α-SMA 表达升高、肾功能恶化的级联反应过程,为 miR-21 的促纤维化作用提供了多层次的实验证据。

本研究揭示了 miR-21 通过调控 PTEN-AKT/mTOR 轴在肾纤维化中的关键作用,具有重要的临床转化潜力。一方面,miR-21 在肾组织及循环中表达升高,且与肾功能损伤和纤维化程度正相关,有望成为早期诊断、风险评估和疗效监测的无创生物标志物。另一方面,抑制 miR-21 能显著改善肾功能与纤维化,提示其可作为治疗靶点,与 AKT/mTOR 通路抑制剂联合使用,可能产生协同抗纤维化效果。然而,该策略迈向临床仍面临挑战,包括开发肾脏靶向递送系统、评估长期安全性及明确在不同人群中的异质性等。未来需着力解决这些问题,推动 miR-21 靶向诊疗策略的转化应用。

综上所述,miR-21 可能通过靶向调控 PTEN/AKT/mTOR 通路改善小鼠慢性肾功能指标,减轻肾纤维化程度。但本研究使用的小鼠模型无法完全复制人类慢性肾病的复杂性和多样性,从而限制了研究结果的外推性。未来应加强从动物实验到临床应用的转化研究,开展临床试验来验证 miR-21 靶向治疗在人类慢性肾病患者中的安全性和有效性。

参考文献

[1] Ying M, Shao X, Qin H, et al. Disease burden and

- epidemiological trends of chronic kidney disease at the global, regional, national levels from 1990 to 2019[J]. *Nephron*, 2024, 148(2): 113-23. doi: 10.1159/000534071.
- [2] 董海芸, 韩芳, 齐一舟, 等. circ_WBSCR17通过调节miR-30a-5p/JAK1轴减轻高糖诱导的人肾小球系膜细胞纤维化和炎症反应[J]. *安徽医科大学学报*, 2023, 58(10): 1756-62, 1768. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.10.025.
- [2] Dong H Y, Han F, Qi Y Z, et al. circ_WBSCR17 attenuates high glucose-induced fibrosis and inflammation in human mesangial cells by regulating the miR-30a-5p/JAK1 axis[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2023, 58(10): 1756-62, 1768. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.10.025.
- [3] Rajabi S, Saberi S, Najafipour H, et al. Interaction of estradiol and renin-angiotensin system with microRNAs-21 and-29 in renal fibrosis: focus on TGF- β /smad signaling pathway[J]. *Mol Biol Rep*, 2024, 51(1): 137. doi: 10.1007/s11033-023-09127-4.
- [4] Rodrigues P M, Afonso M B, Simão A L, et al. miR-21-5p promotes NASH-related hepatocarcinogenesis[J]. *Liver Int*, 2023, 43(10): 2256-74. doi: 10.1111/liv.15682.
- [5] Pan S, Yuan T, Xia Y, et al. SMYD2 promotes calcium oxalate-induced glycolysis in renal tubular epithelial cells via PTEN methylation[J]. *Biomedicines*, 2024, 12(10): 2279. doi: 10.3390/biomedicines12102279.
- [6] Ha M H, Kim M S, An H J, et al. PTEN-induced kinase 1 is associated with renal aging, via the cGAS-STING pathway[J]. *Aging Cell*, 2023, 22(7): e13865. doi: 10.1111/accel.13865.
- [7] Zhong G, Cai X, Wei R, et al. Curcumenol improves renal function in 5/6 nephrectomy-induced chronic renal failure rats via the SIRT1/NF- κ B pathway[J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2023, 306(12): 3189-98. doi: 10.1002/ar.25137.
- [8] 伍祎晴, 高岩, 程梦丹, 等. 电针激活AKT/GSK-3 β /CREB通路促进脊髓损伤小鼠内源性神经干细胞增殖和分化的研究[J]. *中华神经外科杂志*, 2024, 40(7): 717-24. doi:10.3760/cma.j.cn112050-20231206-00199.
- [8] Wu Y Q, Gao Y, Cheng M D, et al. Study on electroacupuncture promoting the proliferation and neuronal differentiation of endogenous neural stem cells after spinal cord injury via AKT/GSK-3 β /CREB pathway in mice[J]. *Chin J Neurosurg*, 2024, 40(7): 717-24. doi:10.3760/cma.j.cn112050-20231206-00199.
- [9] Niculae A, Gherghina M E, Peride I, et al. Pathway from acute kidney injury to chronic kidney disease: molecules involved in renal fibrosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(18): 14019. doi: 10.3390/ijms241814019.
- [10] Naas S, Schiffer M, Schödel J. Hypoxia and renal fibrosis[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2023, 325(4): C999-C1016. doi: 10.1152/ajpcell.00201.2023.
- [11] Jacobs M E, de Vries D K, Engelse M A, et al. Endothelial to mesenchymal transition in kidney fibrosis[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2024, 39(5): 752-60. doi: 10.1093/ndt/gfad238.
- [12] Casado-Bedmar M, Roy M, Berthet L, et al. Fecal let-7b and miR-21 directly modulate the intestinal microbiota, driving chronic inflammation[J]. *Gut Microbes*, 2024, 16(1): 2394249. doi: 10.1080/19490976.2024.2394249.
- [13] Habel A, Nassar F, Itani M, et al. miR-21 and miR-125b as theranostic biomarkers for epithelial ovarian cancer in Tunisian women[J]. *Afr Health Sci*, 2023, 23(2): 256-64. doi: 10.4314/ahs.v23i2.29.
- [14] Li T, Gao X, Jia R, et al. Astragaloside IV inhibits idiopathic pulmonary fibrosis through activation of autophagy by miR-21-mediated PTEN/PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2024, 70(2): 128-36. doi: 10.14715/cmb/2024.70.2.18.
- [15] Kim J, Ha S, Son M, et al. TLR7 activation by miR-21 promotes renal fibrosis by activating the pro-inflammatory signaling pathway in tubule epithelial cells[J]. *Cell Commun Signal*, 2023, 21(1): 215. doi: 10.1186/s12964-023-01234-w.
- [16] Trivedi A, Bose D, Saha P, et al. Prolonged antibiotic use in a preclinical model of gulf war chronic multisymptom-illness causes renal fibrosis-like pathology via increased micro-RNA 21-induced PTEN inhibition that is correlated with low host *Lachnospiraceae* abundance[J]. *Cells*, 2023, 13(1): 56. doi: 10.3390/cells13010056.
- [17] Chen M, Yu Y, Mi T, et al. MK-2206 alleviates renal fibrosis by suppressing the Akt/mTOR signaling pathway *in vivo* and *in vitro*[J]. *Cells*, 2022, 11(21): 3505. doi: 10.3390/cells11213505.
- [18] Kuang L, You Y, Qi J, et al. Qi-Dan-Dihuang decoction ameliorates renal fibrosis in diabetic rats via p38MAPK/AKT/mTOR signaling pathway[J]. *Environ Toxicol*, 2024, 39(6): 3481-99. doi: 10.1002/tox.24179.
- [19] Guo X, Yin T, Chen D, et al. Astragaloside IV regulates insulin resistance and inflammatory response of adipocytes via modulating MIR-21/PTEN/PI3K/AKT signaling[J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2023, 23(12): 1538-47. doi: 10.2174/1871530323666230627121700.
- [20] Wang J, Guo R, Ma X, et al. Liraglutide inhibits Ang II-induced cardiac fibroblast proliferation and ECM deposition through regulating miR-21/PTEN/PI3K pathway[J]. *Cell Tissue Bank*, 2023, 24(1): 125-37. doi: 10.1007/s10561-022-10021-9.

Mechanism of miR-21 targeting inhibition of the PTEN/AKT/mTOR pathway in ameliorating chronic renal fibrosis in mice

Qi Jiao, Xu Shanshan, Qi Qige, Meng Yan, Zhao Jianrong, Zhang Liying

(Department of Nephrology, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050)

Abstract Objective To investigate the mechanism through which miR-21 improves chronic renal fibrosis in

mice *via* targeted modulation of the phosphatase and tensin homolog (PTEN)/protein kinase B (AKT)/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway. **Methods** Thirty-two chronic kidney disease model mice were randomly divided into four groups ($n=8$ each group): model group, miR-21 overexpression group, miR-21 inhibition group, and miR-21 inhibition + MK-2206 group. Eight healthy mice were included as the control group. The miR-21 overexpression, miR-21 inhibition, and miR-21 inhibition + MK-2206 groups received tail-vein injections of lentivirus (50 μL , 1×10^8 TU per mouse) once weekly for three weeks. The control and model groups were injected with an equal volume of empty vector (LV-NC). The miR-21 inhibition + MK-2206 group additionally received gavage of the AKT/mTOR pathway inhibitor MK-2206 (480 mg/kg) once weekly for three weeks. The expressions of miR-21, 24 h urinary protein, serum creatinine (Scr), blood urea nitrogen (BUN), and renal tissue levels of collagen I, collagen III, α -smooth muscle actin (α -SMA), and PTEN protein, as well as p-AKT/AKT and p-mTOR/mTOR ratios, were compared among groups. HE staining was used to observe pathological changes in renal tissue, and Masson staining was used to observe the degree of renal fibrosis. A dual-luciferase assay was performed to verify the targeting relationship between miR-21 and PTEN. **Results** Compared with the model group, miR-21 expression in renal tissue increased in the miR-21 overexpression group ($P<0.05$) and decreased in the miR-21 inhibition group ($P<0.05$). Compared with the model group, the miR-21 overexpression group showed increased 24-h urinary protein, Scr, BUN, and renal tissue expression of collagen I, collagen III, and α -SMA (all $P<0.05$), while these indicators decreased in the miR-21 inhibition group ($P<0.05$). Compared with the miR-21 inhibition group, the miR-21 inhibition + MK-2206 group exhibited lower 24-h urinary protein, Scr, BUN, and renal tissue expression of collagen I, collagen III, and α -SMA (all $P<0.05$). Compared with the model group, the miR-21 overexpression group showed decreased PTEN protein expression ($P<0.05$) and increased p-AKT/AKT and p-mTOR/mTOR ratios ($P<0.05$), while the miR-21 inhibition group showed increased PTEN expression ($P<0.05$) and decreased p-AKT/AKT and p-mTOR/mTOR ratios ($P<0.05$). Compared with the miR-21 inhibition group, the miR-21 inhibition + MK-2206 group had lower p-AKT/AKT and p-mTOR/mTOR ratios ($P<0.05$), with no significant difference in PTEN protein expression ($P>0.05$). HE and Masson staining showed normal kidney structure and almost no fibrosis in the control group. The model group exhibited glomerular enlargement, capillary loop adhesion, and focal fibrosis. The miR-21 overexpression group showed severe destruction of glomerular structure, accompanied by extensive fibrosis and renal tubular atrophy. The pathological changes and degree of fibrosis were alleviated in the miR-21 inhibition group. The miR-21 inhibition + MK-2206 group showed only mild pathological changes and mild fibrosis, with the interstitium being largely normal. Compared with PTEN-WT + NC mimics 1, the relative luciferase activity in the PTEN-WT + miR-21 mimics group decreased ($P<0.001$). There was no statistically significant difference in relative luciferase activity between PTEN-WT + NC mimics group and PTEN-MUT + miR-21 mimics group ($P>0.05$). **Conclusion** miR-21 may improve renal function indicators and alleviate renal fibrosis in chronic kidney disease mice *via* targeted modulation of PTEN and subsequently inhibiting the AKT/mTOR pathway.

Key words chronic kidney disease; renal fibrosis; renal function; AKT/mTOR pathway; miR-21; targeting

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 81960143); Science and Technology Project of Inner Mongolia Autonomous Region (No. 2022YFSH0087); Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region (Nos. 2022MS08063, 2025QN08029).

Corresponding author Zhang Liying, Email: 85366462@qq.com