

有氧运动通过调控miR-21/miR-29对糖尿病大鼠 肾纤维化的影响

梁嘉 刘霞* 袁涛 龙博兴

(湖南师范大学, 体适能与运动康复湖南省重点实验室, 长沙 410012)

摘要 该文旨在探讨T2DM大鼠肾纤维化的形成及有氧运动的干预作用, 同时基于miR-21/miR-29调控的TGF- β 1/Smad3信号通路, 探讨miR-21与miR-29在有氧运动减轻糖尿病肾纤维化中的作用机制。从50只大鼠中随机抽取10只作为空白对照(NC)组, 其余40只为T2DM模型(DM)组, 在建模过程中, 先进行5周高脂饲料喂养, 再结合小剂量链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)腹腔注射进行诱导。将成功建立糖尿病模型的大鼠随机分为糖尿病对照(DC)组和糖尿病有氧运动(DE)组。DE组进行有氧运动, 每周6次, 每次60 min, 共进行8周。检测各组大鼠尿液及血液指标; 采用HE和Masson染色观察肾纤维化程度; Western blot检测各组大鼠TGF- β 1、Smad3、 α -SMA、Collagen I蛋白表达水平; RT-qPCR检测各组大鼠miR-21、miR-29表达水平。与NC组相比, DC组大鼠体质量在第6周和8周出现显著下降($P<0.05$, $P<0.01$); 与DC组相比, DE组体质量上升, 但无显著性。与NC组相比, DC组大鼠FBG、HOMA-IR、HbA1c、TC、LDL、TG、尿蛋白、尿素氮、尿肌酐水平均显著升高($P<0.05$, $P<0.01$), INS、HDL水平显著下降($P<0.05$, $P<0.01$); 与DC组相比, DE组大鼠FBG、HbA1c、TC、LDL、TG、尿蛋白、尿素氮、尿肌酐水平均显著降低($P<0.05$, $P<0.01$), INS水平显著升高($P<0.05$), HDL水平有升高趋势但无显著性。HE染色显示: DC组大鼠肾小球形态不规则, 肾小管上皮细胞空泡样变性; DE组大鼠各种损伤减轻。Masson染色显示: DC组大鼠蓝染面积显著增加($P<0.01$), 胶原纤维沉积增多; DE组大鼠蓝染面积显著减少($P<0.01$), 胶原纤维沉积减少。Western blot结果显示, 与NC组相比, DC组大鼠肾组织中 α -SMA、Collagen I蛋白表达量显著增加($P<0.05$); 与DC相比, DE组的Collagen I表达量显著下降($P<0.05$), α -SMA表达量有下降趋势但无显著性。与NC组相比, DC组大鼠肾脏组织miR-21表达量极显著增加($P<0.01$), miR-29表达量显著减少($P<0.05$); 与DC相比, DE组大鼠肾脏组织miR-21表达量显著下降($P<0.05$), miR-29表达量有上升趋势, 但无显著性。与NC组相比, DC组大鼠肾脏组织TGF- β 1、Smad3蛋白表达量均极显著增加($P<0.01$); 与DC相比, DE组TGF- β 1、Smad3的表达量均显著下降($P<0.05$)。8周有氧运动可能通过降低miR-21的表达水平和提高miR-29的表达水平, 抑制TGF- β 1/Smad3信号通路, 进而减轻T2DM大鼠肾纤维化。

关键词 有氧运动; 糖尿病肾纤维化; miRNA; TGF- β 1/Smad3

The Effect of Aerobic Exercise on Renal Fibrosis in Diabetic Rats through the Modulation of miR-21/miR-29

LIANG Jia, LIU Xia*, YUAN Tao, LONG Boxing

(Hunan Provincial Key Laboratory of Physical Fitness and Exercise Rehabilitation, Hunan Normal University, Changsha 410012, China)

收稿日期: 2026-01-07 接受日期: 2026-02-27

国家自然科学基金(批准号: 22BTY103)和湖南师范大学国家级大学生创新训练项目(批准号: 2025266)资助的课题

*通信作者。E-mail: 16632@hunnu.edu.cn

Received: January 7, 2026 Accepted: February 27, 2026

This work was supported by the National Social Science Foundation of China (Grant No.22BTY103) and the National Undergraduate Innovation Training Program of Hunan Normal University (Grant No.2025266)

*Corresponding author. E-mail: 16632@hunnu.edu.cn

Abstract This study aimed to investigate the development of renal fibrosis in T2DM (type 2 diabetes mellitus) rats and the effects of aerobic exercise intervention. Furthermore, it explored the mechanism by which miR-21 and miR-29 regulate the TGF- β 1/Smad3 signaling pathway to ameliorate diabetic renal fibrosis in response to aerobic exercise. Fifty rats were randomly assigned, with ten serving as the NC (normal control) group and forty used to establish the DM (T2DM model). The modeling procedure consisted of a 5-week high-fat diet followed by a low-dose intraperitoneal injection of STZ (streptozotocin). Successfully modeled diabetic rats were then randomly divided into two groups: the DC (diabetic control) group and the DE (diabetic exercise) group. The DE group underwent an 8-week aerobic exercise program, with sessions lasting 60 min conducted six times per week. Urine and blood biochemical parameters were detected in all groups. The degree of renal fibrosis was observed using HE and Masson staining. The protein expression levels of TGF- β 1, Smad3, α -SMA, and collagen I were determined by Western blot analysis, and the expression levels of miR-21 and miR-29 were measured by RT-qPCR. Compared with the NC group, rats in the DC group exhibited significant body mass loss at weeks 6 and 8 ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Conversely, the DE group showed an increasing trend in body mass compared with the DC group, although this did not reach statistical significance. Regarding metabolic parameters, the DC group displayed significantly elevated levels of FBG, HOMA-IR, HbA1c, TC, LDL, TG, urinary protein, urinary urea nitrogen, and urinary creatinine compared with the NC group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Concurrently, INS and HDL levels were significantly reduced ($P < 0.05$) ($P < 0.01$). Aerobic exercise intervention in the DE group significantly ameliorated these alterations, resulting in marked reduction in FBG, HbA1c, TC, LDL, TG, urinary protein, urinary urea nitrogen, and urinary creatinine ($P < 0.05$, $P < 0.01$), a significant increase in INS ($P < 0.05$), and a non-significant upward trend in HDL levels compared with the DC group. Histological analysis via HE staining revealed irregular glomerular morphology and vacuolar degeneration of renal tubular epithelial cells in the DC group, both of which were ameliorated in the DE group. Masson staining demonstrated a significant increase in collagen deposition (blue-stained area) in the DC group compared with the NC group ($P < 0.01$), which was substantially attenuated in the DE group ($P < 0.01$). Consistent with these findings, Western blot analysis indicated that the expression levels of the fibrosis markers α -SMA and collagen I were significantly upregulated in the renal tissues of the DC group relative to the NC group ($P < 0.05$). Compared with the DC group, the DE group showed a significant downregulation in collagen I expression ($P < 0.05$), while α -SMA expression exhibited a decreasing trend that did not reach statistical significance. Renal tissues from the DC group showed a pronounced upregulation of miR-21 ($P < 0.01$) and a significant downregulation of miR-29 ($P < 0.05$) compared with the NC group. Exercise intervention in the DE group reversed these changes, resulting in a significant reduction in miR-21 ($P < 0.05$) and a non-significant increasing trend in miR-29 compared with the DC group. Correspondingly, the protein expression levels of the downstream targets TGF- β 1 and Smad3 were significantly higher in the DC group than in the NC group ($P < 0.01$). This activation was significantly suppressed in the DE group, with both proteins showing markedly decreased expression levels ($P < 0.05$). An 8-week regimen of aerobic exercise ameliorates renal fibrosis in T2DM rats. The underlying mechanism appears to involve the downregulation of miR-21 and the upregulation of miR-29, which consequently inhibits the TGF- β 1/Smad3 signaling pathway.

Keywords aerobic exercise; diabetic renal fibrosis; miRNA; TGF- β 1/Smad3

糖尿病(diabetic mellitus, DM)以慢性高血糖为主要特征,通常和胰岛素(insulin, INS)分泌或利用失常有关^[1]。依据病因的不同,糖尿病在临床中被分为两种,其中1型糖尿病(type 1 diabetes mellitus, T1DM)成因主要是胰腺 β 细胞分泌胰岛素功能受损,从而使得

INS绝对缺失,进而引起血液葡萄糖水平升高和低度炎症反应等症状,多见于青少年群体;另一种为2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM),其主要由机体组织对胰岛素利用率降低或抵抗所引起的INS相对缺失所致。据统计,2021年全球有5.37亿糖尿病患者,预测

到2045年,糖尿病患者绝对数量将增加46%^[2]。

T2DM患者通常会伴随着糖尿病并发症的发生,糖尿病并发症通常由大血管并发症和微血管并发症组成,微血管并发症中就包含了糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)。近年来, T2DM并发症中的DN已经受到人们的广泛关注,据统计,糖尿病肾病影响20%至40%的糖尿病患者^[3]。在DN的早期,细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度沉积和肾小球系膜增殖是其主要特征, DN晚期主要表现为肾脏纤维化、肾小球硬化以及肾功能衰竭等^[4]。肾纤维化和ECM沉积通常都表现为 α 平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)和I型胶原蛋白(collagen I)含量增加等^[5]。肾纤维化是DN病理生理学中的最终途径,肾纤维化出现后,肾小球和肾小管的功能都逐渐丧失,最后肾实质病变发生,患者肾功能下降,慢慢就会发展成为肾功能衰竭。

miRNA(microRNA)与T2DM肾纤维化有着紧密的联系, miRNA可以直接或间接介导纤维化相关靶基因的表达,调控肾纤维化病理过程。miRNA可以直接调控多种ECM蛋白的表达,或间接通过抑制TGF- β /Smad等信号通路来调节糖尿病肾纤维化。研究表明,随着纤维化的发展,肾脏组织中miR-21水平升高^[6],它通过一个正反馈回路显著促进TGF- β 信号转导,调控TGF- β 1/Smads通路^[7-8]。TGF- β 1是DN发展过程中的一种关键纤维化细胞因子,其通过激活Smad2/3信号通路,诱导肾小管上皮细胞发生上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT),这会促进细胞外基质(ECM)的沉积,最终导致广泛的肾组织纤维化。miR-21是糖尿病肾病中的促纤维化因子,与TGF- β 1/Smad3信号通路密切相关^[9]。与之相反,miR-29已被证明在心脏、肺、肾脏和肝脏等多种器官中具有抗纤维化作用^[10]。有研究表明,miR-29的表达水平在小鼠肾纤维化模型中降低,而miR-29的递送可减轻这些小鼠的肾纤维化^[8]。其保护作用部分是通过抑制TGF- β 所介导的ECM沉积与重塑来实现的。因此,miR-21的表达上调与miR-29的表达下调共同破坏了正常的促纤维化与抗纤维化平衡,最终通过调控核心的TGF- β 信号通路导致肾脏纤维化的发生与发展。

运动在T2DM的治疗过程中起到至关重要的作用。大量的研究表明,运动对T2DM有一定的干预作用,不同形式的运动对miRNA的表达具有不同的影

响。然而,有氧运动是否通过miRNA调控TGF- β /Smad通路来干预糖尿病肾纤维化,还有待我们进一步研究。本研究将采用高脂饮食饲养联合腹腔注射低剂量链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导建立T2DM模型。通过对T2DM大鼠进行8周有氧运动干预,探讨T2DM大鼠肾纤维化的形成及有氧运动的干预作用。此外,还基于TGF- β 1/Smad3信号通路,探讨有氧运动通过miRNA减轻糖尿病肾纤维化的机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选用SPF级6周龄雄性SD大鼠,样本量为50只,体质量为(0.17 \pm 0.02) kg。分笼饲养,每笼4~6只,温度、湿度适宜,每日定时更换垫料、饲料及饮用水。实验大鼠购自长沙市天勤生物技术有限公司,许可证号:SCXK(湘)2019-0014。本研究中涉及的动物实验已获湖南师范大学伦理委员会批准(批准号:2018134)。

1.2 实验试剂与仪器

葡萄糖、INS、糖化血红蛋白(glycated hemoglobin, HbA1c)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)、尿素氮(urinary urea nitrogen, UUN)及尿肌酐(urine creatinine, UCR)试剂盒均购自南京建成生物工程公司;尿蛋白酶联免疫分析试剂盒购自上海酶联科技生物有限公司;RIPA裂解液、SDS-PAGE凝胶制备试剂盒、磷酸化蛋白酶抑制剂、BCA蛋白定量检测试剂盒、蛋白Marker购自武汉塞维尔生物科技有限公司;柱式miRNA抽提试剂盒、miRNA第一链cDNA合成(加尾法)试剂盒、miRNA荧光定量PCR试剂盒、PCR引物均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;实验动物跑台(货号:SA101)购自广州飞迪生物科技有限公司;紫外可见分光光度计(货号:UV-5500)购自上海元析仪器有限公司;双垂直电泳仪(货号:DYCZ-24DN)购自北京六一仪器厂。

1.3 动物分组

适应性喂养1周之后,随机从中选取10只作为正常对照(normal control, NC)组,使用国家标准饲料喂养。剩余40只大鼠为糖尿病模型(diabetes model, DM)组,进行为期5周的高脂饲料饲养。5周后,两组大鼠均禁食12 h, DM组注射浓度为1%、

剂量为 30 mg/kg 的 STZ, NC 组注射等标准的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。之后在第三天和第八天分别测试大鼠尾静脉空腹血糖(fasting blood glucose, FBG), 两次测试值均高于 7.8 mmol/L 即为造模成功, 最终有 22 只大鼠造模成功。将造模成功的大鼠随机分成糖尿病对照(diabetic control, DC)组与糖尿病有氧运动(diabetic exercise, DE)组, 其中 DC 组 10 只, DE 组 12 只。分组之后, NC、DC、DE 三组均用国家标准饲料喂食, 每周定时测量其尾静脉空腹血糖和体质量, 每日定时添加饲料及饮用水。具体分组方案见图 1。

1.4 运动方案

运动方案参考 BROOKS 等^[11]的研究并结合现有实验条件设计, 具体为: DE 组在正式训练前, 进行为期 3 天适应性训练, 第一天跑步速度为 17 m/min, 进行 30 min; 第二天速度为 17 m/min, 进行 45 min; 第三天速度为 17 m/min, 进行 60 min。正式运动跑速为 17 m/min(60%最大摄氧量^[12]), 每次 60 min, 每周 6 次, 共进行 8 周。具体运动方案见图 1。

1.5 实验取材

第八周的运动干预结束后, 把大鼠放在代谢笼, 禁食不禁水, 收集 24 h 尿液, 第二天腹腔注射 1% 的戊巴比妥钠麻醉(40 mg/kg), 胸主动脉取血, 静置血液 30 min, 于 4 000 r/min、4 °C 离心 15 min, 离心后将上层血清吸取到干净离心管中, 放置于 -20 °C 冰箱保

存。取出大鼠肾脏, 将一部分肾脏组织浸泡在 4% 的甲醛溶液中, 用于 HE 和 Masson 染色。剩余肾脏组织保存于 -80 °C 冰箱, 用于 miRNA 与相关蛋白检测。

1.6 生化指标检测

采用葡萄糖氧化酶法检测 FBG 水平, 单试剂 GPO-PAP 法通过分光光度计检测 TC、TG 水平, 采用双试剂直接法通过分光光度计检测 HDL、LDL 水平, 酶联免疫吸附法检测 INS、HbA1c 水平。将每只大鼠 INS、FBG 测试值代入公式计算出胰岛素抵抗指数, $HOMA-IR = (INS \times FBG) / 22.5$ 。HOMA-IR ≥ 2.69 为胰岛素抵抗。酶联免疫吸附法检测尿蛋白, 脲酶法检测尿液 UUN, 肌氨酸氧化酶法检测 UCR。

1.7 HE、Masson 染色

将浸泡在 4% 甲醛溶液中的肾脏组织进行常规脱水、包埋, 并连续切成 3 μ m 厚的切片。HE 染色: 经苏木素染液染色(室温、3~5 min)及伊红染液染色(室温、5 min)后进行脱水封片, 在显微镜下观察并拍照。Masson 染色: 经 Weigert 铁苏木素染色(室温、3 min)及丽春红酸性品红液染色(室温、6~10 min), 用磷钼酸水溶液处理及苯胺蓝液复染(室温、3~6 min), 经 1% 冰醋酸分化后进行脱水封片, 在显微镜下观察并拍照。

1.8 Western blot 检测 TGF- β 1、Smad3、 α -SMA、Collagen I 蛋白表达水平

选取肾脏组织置于冰上并加入 RIPA 裂解液研磨, 提取组织总蛋白, 经 BCA 试剂盒测定总蛋白浓度后,

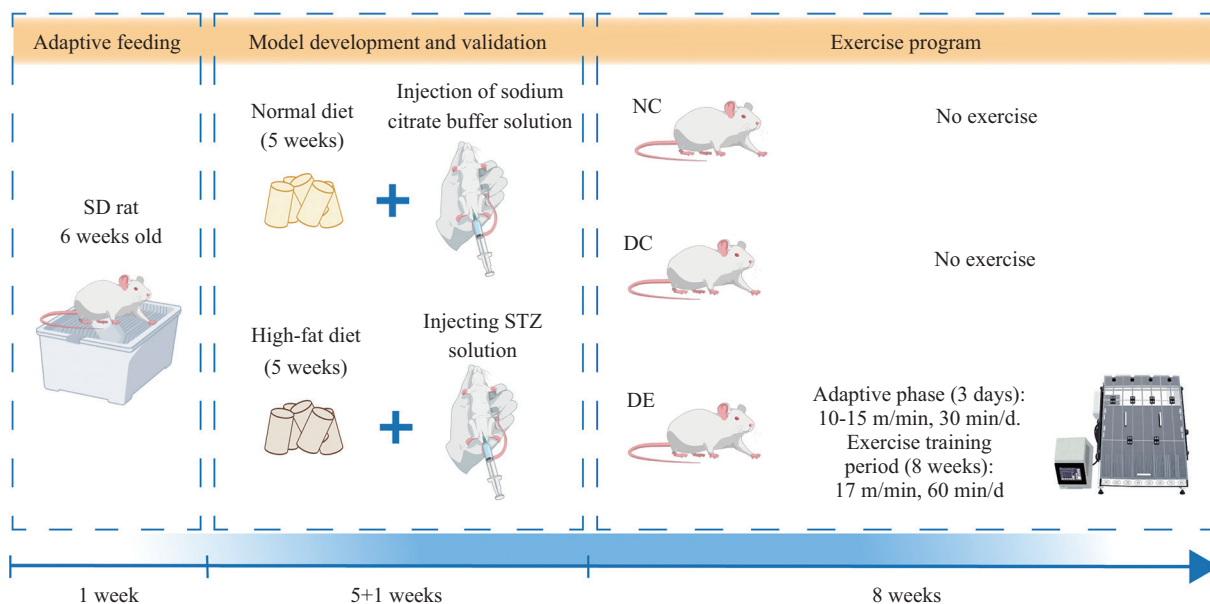


图1 动物分组及运动干预方案

Fig.1 Animal grouping and exercise intervention protocol

表1 miR-21和miR-29的引物序列
Table 1 Primer sequences of miR-21 and miR-29

引物名称 Primer names	引物序列(5'→3') Primer sequences (5'→3')
rno-miR-29	CGT ACA CCA TCT GAA ATC GGT TA
rno-miR-21	GCC GTA GCT TAT CAG ACT GAT GTT GA

取50 μg蛋白进行SDS-PAGE, 然后进行湿转膜, 转膜成功后在室温下封闭1 h(5%的脱脂牛奶)。洗膜后加入提前配制的一抗β-actin(1:5 000)、GAPDH(1:5 000)、TGF-β1(1:1 000)、Smad3(1:1 000)、α-SMA(1:1 000)、Collagen I(1:1 000), 完全浸泡PVDF膜, 4 °C孵育过夜(8~12 h)。在洗膜后倒入提前配好的二抗(1:5 000), 放在低速摇床上调至最低摇速, 室温孵育2 h。加入提前配好的ECL溶液, 充分反应约1~2 min后, 进行显影和定影, 通过ImageJ软件进行条带灰度分析。

1.9 RT-qPCR检测miR-21、miR-29表达水平

根据柱式miRNA抽提试剂盒说明书提取肾脏的miRNA, 并使用逆转录试剂盒将RNA反转录为cDNA。按照miRNA荧光定量PCR试剂盒说明书配制反应体系, 反应程序: 95 °C预变性30 s; 95 °C变性5 s, 60 °C退火/延伸30 s, 40个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算mRNA的相对表达量。引物序列见表1。

1.10 统计学分析

所有实验数据均使用SPSS 27和GraphPad Prism 10.1.2软件进行统计分析, 数据经正态性检验(Shapiro-Wilk检验)及方差齐性检验后, 符合正态分布且方差齐的结果以平均值±标准差($\bar{x}\pm s$)的形式表示。组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。当整体差异具有统计学意义($P<0.05$)时, 采用LSD法或Tukey法进行比较。不符合正态分布或方差不齐的采用非参数检验(Kruskal-Wallis检验), 若整体差异具有显著性($P<0.05$), 则使用Dunn检验进行事后两两比较。 $P<0.05$ 代表差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 实验大鼠运动期间体质量及FBG、INS、HOMA-IR、HbA1c的变化

如图2A所示, 在8周运动期间, NC组大鼠体质量稳步增长, 增幅最大, DC组大鼠体质量增幅最小。与NC组相比, DC组大鼠体质量在运动干预后6周和8周出现显著下降($P<0.05$, $P<0.01$); 与DC组相比, DE组体质量上升, 但无显著性($P>0.05$)。与NC组相

比, DC组大鼠血清INS水平显著下降($P<0.05$), FBG、HOMA-IR、HbA1c水平极显著升高($P<0.01$); 与DC组相比, DE组大鼠血清INS水平显著升高($P<0.05$), FBG、HbA1c水平呈极显著降低($P<0.01$), HOMA-IR水平下降但无显著性(图2B~图2E)。

2.2 实验大鼠血清TC、TG、HDL、LDL的变化

由图3可知, 与NC组相比, DC组大鼠血清TC、LDL水平极显著升高($P<0.01$), TG水平显著升高($P<0.05$), HDL水平极显著下降($P<0.01$); 与DC组相比, DE组大鼠血清TC、LDL水平极显著下降($P<0.01$), TG水平显著下降($P<0.05$), HDL水平有升高趋势但无显著性。

2.3 实验大鼠尿蛋白、尿素氮、尿肌酐的变化

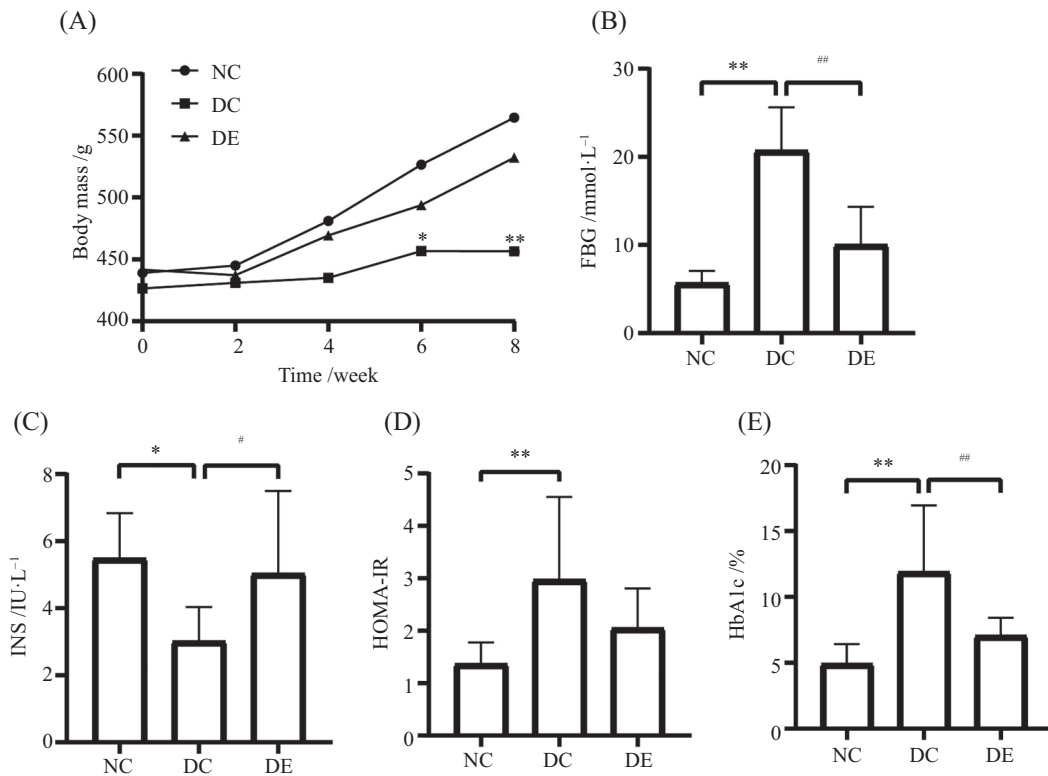
如图4所示, 与NC组相比, DC组大鼠尿蛋白、尿素氮、尿肌酐水平极显著升高($P<0.01$); 与DC组相比, DE组大鼠尿蛋白、尿素氮、尿肌酐水平极显著下降($P<0.01$)。

2.4 实验大鼠肾组织形态学变化

由HE染色结果可知, 与NC组大鼠相比, DC组大鼠肾小球形态不规则, 系膜外基质增加, 肾小管上皮细胞空泡样变性、刷状缘减少, 间质可见炎症细胞浸润; 与DC组大鼠相比, DE组大鼠肾小球形态较规则, 肾小管细胞排列较整齐(图5A)。Masson染色结果表明, NC组大鼠肾组织蓝染面积小, 细胞形态大小正常; 与NC组大鼠相比, DC组大鼠蓝染面积显著增加($P<0.01$), 胶原纤维沉积增多; 与DC组大鼠相比, DE组大鼠蓝染面积显著减少($P<0.01$), 细胞排列较整齐规则, 胶原纤维沉积减少, 表明有氧运动对糖尿病肾纤维化有一定程度上的减轻作用(图5B和图5C)。

2.5 实验大鼠肾组织α-SMA、Collagen I蛋白表达水平

胶原蛋白和其他ECM沉积是糖尿病肾纤维化的一个重要标志, α-SMA、Collagen I蛋白是ECM蛋白的主要代表^[13], Western blot结果表明: 与NC组大鼠相比, DC组α-SMA、Collagen I蛋白表达量在大鼠肾脏组织中均显著增加($P<0.05$); 与DC相比, DE组

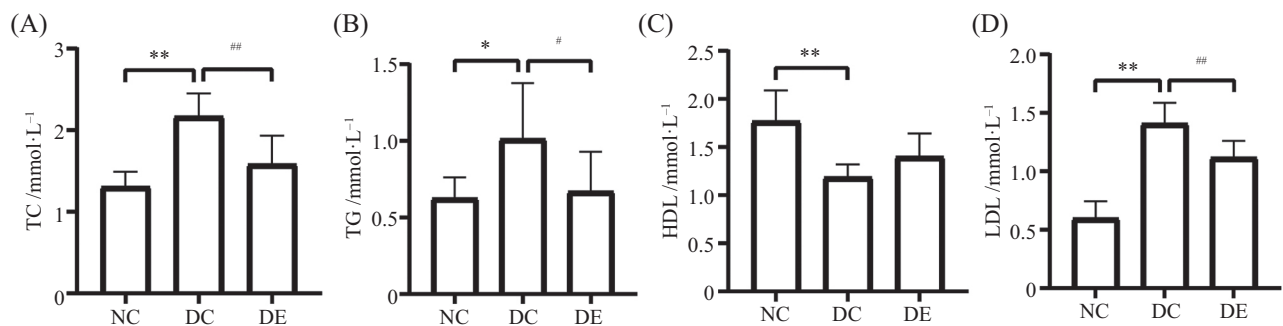


A: 体质量; B: 空腹血糖(FBG); C: 胰岛素(INS); D: 胰岛素抵抗指数; E: 糖化血红蛋白(HbA1c)。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与正常对照组相比; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

A: body mass; B: FBG (fasting blood glucose); C: INS (insulin); D: HOMA-IR; E: HbA1c (glycated hemoglobin). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with normal control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

图2 实验大鼠运动期间体质量及FBG、INS、HOMA-IR、HbA1c的变化

Fig.2 Changes in body mass, FBG, INS, HOMA-IR, and HbA1c of experimental rats during exercise



A: 总胆固醇(TC); B: 甘油三酯(TG); C: 高密度脂蛋白(HDL); D: 低密度脂蛋白(LDL)。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

A: TC (total cholesterol); B: TG (triglyceride); C: HDL (high density lipoprotein); D: LDL (low density lipoprotein). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

图3 实验大鼠血清TC、TG、HDL、LDL水平的变化

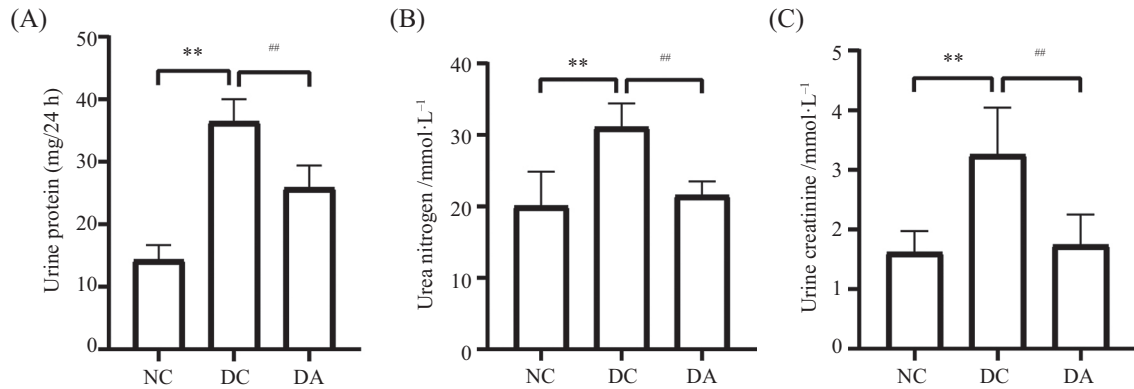
Fig.3 Changes in serum TC, TG, HDL, and LDL levels in experimental rats

的Collagen I表达量显著下降($P < 0.05$), α -SMA表达量有下降趋势但无显著性($P > 0.05$), 见图6。

2.6 实验大鼠肾组织中miR-21、miR-29、TGF- β 1、Smad3的表达水平

从图7A可知, 与NC组相比, DC组大鼠肾脏组织miR-21表达量极显著增加($P < 0.01$); 与DC相比, DE组

大鼠肾脏组织miR-21表达量下降, 并且具有显著性差异($P < 0.05$)。与NC组相比, DC组miR-29表达量显著减少($P < 0.05$); 与DC相比, DE组miR-29的表达量有一定上升, 但无显著性差异($P > 0.05$)。由图7B可知, 与NC组相比, DC组大鼠肾脏组织TGF- β 1、Smad3蛋白量均极显著增加($P < 0.01$); 与DC相比, DE组TGF- β 1、

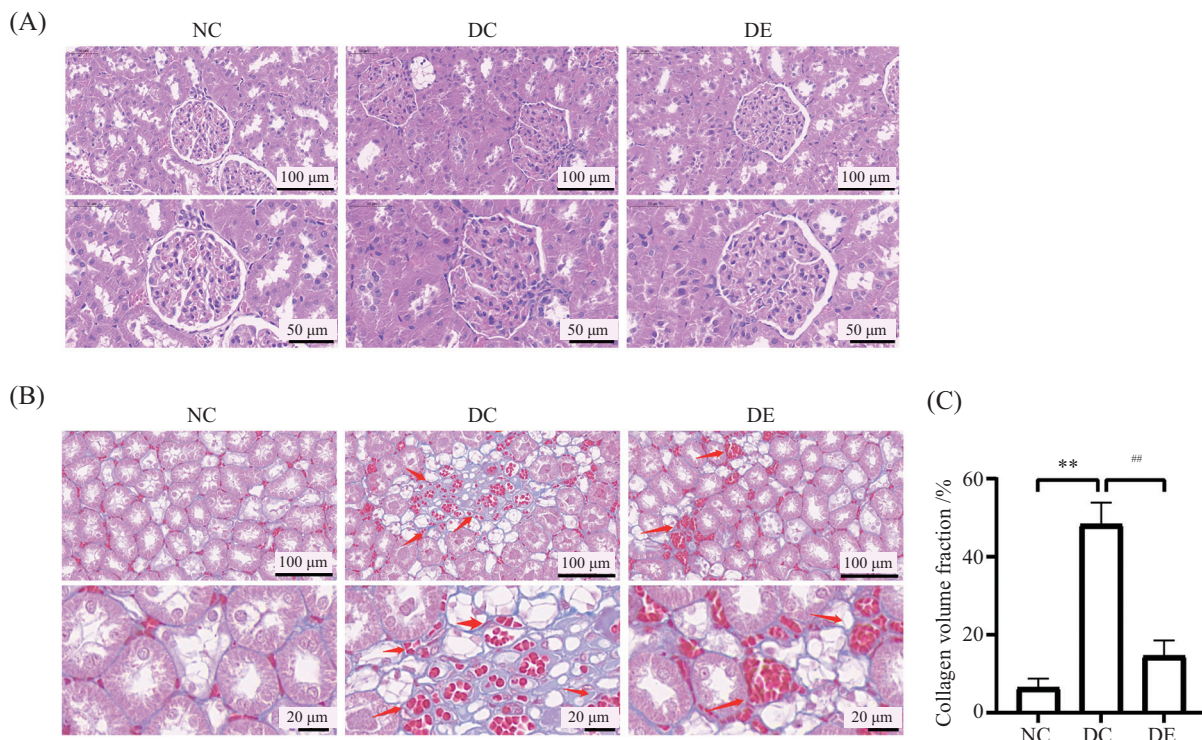


A: 尿蛋白; B: 尿素氮; C: 尿肌酐。 ** $P < 0.01$, ## $P < 0.01$ 。

A: urine protein; B: urea nitrogen; C: urine creatinine. ** $P < 0.01$, ## $P < 0.01$ 。

图4 实验大鼠尿蛋白、尿素氮、尿肌酐的变化

Fig.4 Changes in urine protein, urea nitrogen, and urine creatinine levels in experimental rats



A: 各组大鼠HE染色结果; B: 各组大鼠Masson染色结果, 红色箭头指示胶原纤维沉积; C: 各组大鼠胶原蛋白体积分数。 ** $P < 0.01$, ## $P < 0.01$ 。

A: HE staining results in each group of rats; B: Masson staining results in each group of rats, with red arrows indicating collagen fiber deposition; C: collagen volume fraction in each group of rats. ** $P < 0.01$, ## $P < 0.01$ 。

图5 实验大鼠肾组织形态学变化

Fig.5 Morphological changes in renal tissues of experimental rats

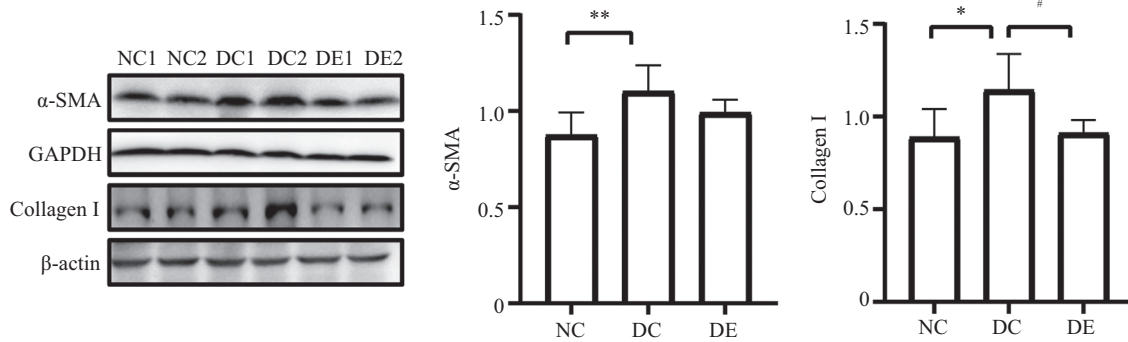
Smad3的表达量均显著下降($P < 0.05$)。

3 分析与讨论

3.1 T2DM大鼠肾纤维化的形成及有氧运动的干预作用

T2DM病因极其复杂, 通常是由胰岛素分泌与

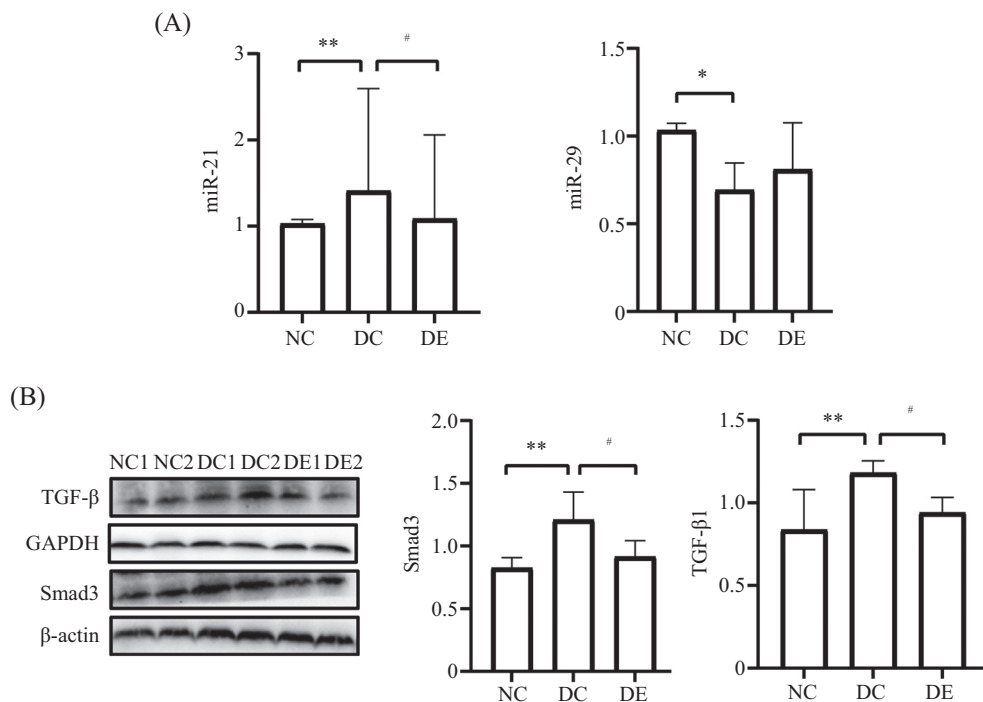
利用不足所引起, 主要特征为血糖高、肥胖等, 并且伴有血管与微血管并发症的发生, 从而对人体造成重要的危害, 是危害人类健康的重大公共卫生问题之一。有氧运动能够预防糖尿病或延缓其发生与发展。有研究表明, 有氧运动组与非运动组相比糖尿病风险降低了53%, 且HbA1c水平也显著降低^[14]。



$n=6$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, # $P<0.05$.

图6 实验大鼠肾组织 α -SMA、Collagen I蛋白表达水平

Fig.6 Protein expression levels of α -SMA and collagen I in rat renal tissues



A:大鼠肾组织中miR-21和miR-29的表达水平; B: 不同组别大鼠肾组织中TGF- β 1和Smad3的蛋白水平。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, # $P<0.05$ 。

A: the expression levels of miR-21 and miR-29 in rat renal tissues; B: the protein levels of TGF- β 1 and Smad3 in rat renal tissues of different groups. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, # $P<0.05$.

图7 实验大鼠肾组织中miR-21、miR-29、TGF- β 1及Smad3的表达水平

Fig.7 Expression levels of miR-21, miR-29, TGF- β 1 and Smad3 in rat renal tissues

有氧运动能够减轻糖尿病,其机制与调节糖脂代谢有关,如加快肌细胞内葡萄糖的分解、抑制肝脏糖异生、促进脂肪酸氧化、缓解胰岛素抵抗等^[15]。因此本实验中T2DM模型采用高脂饮食结合药物注射的形式来进行造模,首先采用高脂饮食饲养,使得大鼠产生胰岛素抵抗,再通过注射STZ使得胰岛 β 细胞被破坏,这更符合临床特征^[16]。在本实验中,DC组大鼠体质量增幅最小,血清FBG、HOMA-IR以及HbA1c的含量与NC组相比显著升高,而血清INS含

量显著减少。此外,DC组大鼠TC、TG、LDL水平显著高于NC组,HDL水平显著低于NC组。以上数据表明T2DM大鼠模型构建成功。

糖尿病肾纤维化对肾组织结构有影响,对肾的正常功能也有损害作用,且糖尿病肾纤维化的病理机制繁多,主要为炎症反应、氧化应激、细胞凋亡、细胞代谢异常等^[17]。此外,糖尿病肾纤维化也与许多信号通路相关,TGF- β 1/Smad信号通路是公认的导致糖尿病肾纤维化的典型信号通路,该通路能通过介导EMT

从而使ECM沉积,加快肾纤维化的发生^[18]。 α -SMA是EMT的生物标志物,在多种器官的纤维化过程中被检测到,I型胶原蛋白是ECM的典型蛋白。因此可通过减少过度合成胶原蛋白来避免肾纤维化的形成。本实验中DC组大鼠肾小球形态不规则,肾小管上皮细胞空泡样变性,蓝染面积显著增加,胶原纤维沉积增多;同时DC组大鼠肾组织中 α -SMA、Collagen I水平与NC组相比显著升高,且尿蛋白、尿素氮、尿肌酐水平极显著升高。

肾间质纤维化是导致终末期肾病的主要因素,科学的有氧运动对糖尿病肾纤维化起到一定程度的减轻作用^[19],运动可以通过控制血糖、提高胰岛素敏感性、改善脂质代谢、减轻炎症与氧化应激等减少糖尿病肾病的发生并延缓其发展^[20-21]。有研究表明,8周有氧运动可使TGF- β 等纤维化因子的表达下调,调节ECM沉积与降解,从而延缓肾纤维化^[22]。本实验结果显示,通过8周有氧跑台运动,DE组大鼠肾小球形态较规则,肾小管细胞排列较整齐,蓝染面积显著减少;DE组大鼠肾组织中ECM经典蛋白Collagen I含量显著低于DC组, α -SMA含量也有一定减少,且尿蛋白、尿素氮、尿肌酐水平极显著下降,可知有氧运动能够有效减轻T2DM肾纤维化。

3.2 miR-21、miR-29在有氧运动干预下对糖尿病肾纤维化的作用机制

miRNA起作用的主要途径是作用于靶基因,它的影响非常的广泛^[23]。研究表明,miR-21、miR-29在肾组织中呈高表达,并且对肾纤维化具有关键的调节作用^[22]。

MCCLELLAND等^[6]的研究表明,随着纤维化的发展,肾脏组织中miR-21水平升高。而PATEL等^[8]的研究表明,miR-29在小鼠肾纤维化模型中的表达量降低,miR-29可减轻肾纤维化。TGF- β 1是肾纤维化中最具代表性的因子之一。有研究表明,TGF- β 1表达水平上调会加重糖尿病肾纤维化^[24]。TGF- β 1/Samds信号通路中的Smad3可能是促纤维化的一个重要调节因子^[25]。另有研究发现,降低TGF- β 1/Smad3信号通路中Smad3的表达水平,能有效抑制EMT的发生,还能抑制 α -SMA这类EMT标记蛋白的表达^[26]。目前普遍认为,在TGF- β 1/Samds信号通路的传导过程中,TGF- β 1与其II型受体结合后,再作用于其I型受体,然后将信号传递给膜内的Smad3,Smad3磷酸化后变成p-Smad3,p-Smad3再结合Smad4并转移到核内,通过调节相关

因子的表达,从而调控EMT的发生,影响ECM的沉积,并介导糖尿病肾纤维化^[27]。人为抑制TGF- β 1/Smad3信号通路相关蛋白的表达,能减少EMT发生和ECM的沉积^[28]。许多研究表明,miR-21的上调与肾纤维化有关,受TGF- β /Smad3调控;miR-21是TGF- β /Smad3的下游介质,Smad3结合位于miR-21启动子中的Smad结合位点,并诱导pri-miR-21转录。反过来,miR-21通过抑制Smad7的表达来促进TGF- β /Smad3信号转导。因此,miR-21在一个正反馈回路中发挥作用,导致TGF- β /Smad3信号转导增强^[29]。miR-29已被证明可以直接抑制TGF- β 1转录。有研究表明,miR-29b通过抑制TGF- β 1表达和Smad3磷酸化来阻断肾纤维化,揭示了miR-29b在糖尿病TGF- β /Smad3依赖性肾纤维化中的反向调节作用^[30]。DU等^[31]发现高糖会刺激TGF- β 1的合成,进而降低miR-29a的表达水平,使近端肾小管细胞(proximal tubular cells, PTCs)中IV型胶原蛋白过度沉积,导致糖尿病肾病。ASSMANN等^[32]发现,miR-29a通过Smad3依赖性机制靶向不同类型的胶原蛋白,从而减轻肾纤维化,使ECM积累减少。有研究表明,miR-29可能通过调节TGF- β 1/Smad3信号通路参与肾纤维化的发生和发展,miR-29表达水平下降会促进TGF- β 1/Smad3信号转导进而导致肾纤维化^[33]。本实验通过RT-qPCR检测各组大鼠肾组织中miR-21、miR-29表达情况,结果显示相比于NC组,DC组大鼠肾组织中miR-21表达量显著增加,miR-29表达量显著下降;通过Western blot检测得出,相比于NC组,DC组大鼠肾组织中TGF- β 1、Smad3蛋白表达水平显著升高。由此可知,miR-21、miR-29可能通过介导TGF- β 1/Smad3通路来影响肾纤维化。

大量研究表明,有氧运动对miRNA的表达会产生影响。有实验表明表明,对大鼠进行10周的低强度游泳训练,然后进行miRNA表达谱筛选,结果发现有48种miRNA表达水平显著升高,39种miRNA水平显著降低^[34]。孙昌亮^[35]的研究表明进行8周的有氧运动后,糖尿病大鼠心脏中miR-21表达水平显著降低,这种变化减轻了大鼠的心肌纤维化。FERNANDES等^[36]的研究表明,10周游泳运动恢复了骨骼肌微循环中miR-16、miR-21和miR-126的正常表达,从而减轻了高血压。另外,有研究表明在12周的有氧训练后的3~5天,miR-21等miRNA出现下调,减轻慢性肾脏病^[37]。也有研究表明,游泳可以调节miR-1、miR-21、miR-27a/b、miR-29a/c、miR-

30e、miR-99b等 miRNA 的表达, 跑步可以调节 miR-1、miR-26、miR-27a、miR-133 等 miRNA 的表达, 这些 miRNA 影响与心脏重构和血管生成相关的基因, 对心脏具有保护作用^[38]。在本实验中, 通过8周的有氧运动干预, DE组大鼠肾组织中 miR-21 的表达量显著下降, 而 miR-29 水平有升高趋势但无显著性, 这可能是因为样本量较小或个体差异, 以及运动干预强度、运动时长、运动类型对 miR-29 的调控效应可能存在差异。但是 miR-29 表达量的增加, 表明运动可能具备调节该通路的潜在倾向, 未来需通过优化干预方案、扩大样本量及进行细胞特异性分析来进一步验证。通过 Western blot 检测可知, 相比于 DC 组, DE 组大鼠肾组织中 TGF- β 1、Smad3 蛋白的表达水平显著下降, 且 HE 及 Masson 染色显示 DE 组肾脏蓝染面积减少, 肾小管细胞排列有所改善, 表明有氧运动可能通过 miR-21/miR-29 调控 TGF- β 1/Smad3 通路, 减少肾脏胶原纤维沉积, 减轻肾纤维化。然而, 本研究存在一定的局限性。虽然本研究初步揭示了运动干预下 miRNA 与纤维化通路之间的关联, 但未进行基因层面的验证实验, 无法断定 miR-21/miR-29 与 TGF- β 1/Smad3 信号通路的直接相互作用。本研究结果提示, 调控 miR-21/miR-29 可能是运动发挥肾脏保护作用的潜在机制之一。本研究为运动减轻糖尿病肾纤维化提供了实验依据, 然而未来仍需要进一步验证 miR-21/miR-29 与 TGF- β 1/Smad3 通路之间的关系。

综上所述, 8周有氧运动可以减轻糖尿病大鼠的肾纤维化, 其机制可能与降低 miR-21 表达水平, 提高 miR-29 表达水平, 从而抑制 TGF- β 1/Smad3 信号通路, 减少 ECM 过度沉积有关。

参考文献 (References)

- [1] LI Z H, LI A X, LIU P P, et al. Mapping the evolution and impact of ketogenic diet research on diabetes management: a comprehensive bibliometric analysis from 2005 to 2024 [J]. *Front Nutr*, 2024, 11: 1485642.
- [2] SUN H, SAEEDI P, KARURANGA S, et al. IDF Diabetes Atlas: global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2021, 183: 109119.
- [3] CLEVELAND K H, SCHNELLMANN R G. Pharmacological targeting of mitochondria in diabetic kidney disease [J]. *Pharmacol Rev*, 2023, 75(2): 250-62.
- [4] ZHANG Y L, LI K Y, ZHANG C, et al. Research progress of *Cordyceps sinensis* and its fermented mycelium products on ameliorating renal fibrosis by reducing epithelial-to-mesenchymal transition [J]. *J Inflamm Res*, 2023, 16: 2817-30.
- [5] CHEN C M, JUAN S H, CHOU H C. Hyperglycemia activates the renin-angiotensin system and induces epithelial-mesenchymal transition in streptozotocin-induced diabetic kidneys [J]. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2018, 19(3): 1470320318803009.
- [6] MCCLELLAND A D, HERMAN-EDELSTEIN M, KOMERS R, et al. miR-21 promotes renal fibrosis in diabetic nephropathy by targeting PTEN and SMAD7 [J]. *Clin Sci*, 2015, 129(12): 1237-49.
- [7] WANG X L, GAO Y B, TIAN N X, et al. Astragaloside IV improves renal function and fibrosis via inhibition of miR-21-induced podocyte dedifferentiation and mesangial cell activation in diabetic mice [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2018, 12: 2431-42.
- [8] PATEL V, NOUREDDINE L. MicroRNAs and fibrosis [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2012, 21(4): 410-6.
- [9] LIU L L, WANG Y Y, YAN R, et al. BMP-7 inhibits renal fibrosis in diabetic nephropathy via miR-21 downregulation [J]. *Life Sci*, 2019, 238: 116957.
- [10] JENSEN D M, HAN P, MANGALA L S, et al. Broad-acting therapeutic effects of miR-29b-chitosan on hypertension and diabetic complications [J]. *Mol Ther*, 2022, 30(11): 3462-76.
- [11] BROOKS G A, WHITE T P. Determination of metabolic and heart rat responses of rats to treadmill exercise [J]. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*, 1979, 45(6): 1009-15.
- [12] QIN F, DONG Y N, WANG S T, et al. Maximum oxygen consumption and quantification of exercise intensity in untrained male Wistar rats [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 11520.
- [13] ZHOU J X, CHENG A S, CHEN L, et al. CD74 promotes cyst growth and renal fibrosis in autosomal dominant polycystic kidney disease [J]. *Cells*, 2024, 13(6): 489.
- [14] CHEN Y, CHEN Z, PAN L L, et al. Effect of moderate and vigorous aerobic exercise on incident diabetes in adults with obesity: a 10-year follow-up of a randomized clinical trial [J]. *JAMA Intern Med*, 2023, 183(3): 272-5.
- [15] ZHAO X F, AN X D, YANG C Q, et al. The crucial role and mechanism of insulin resistance in metabolic disease [J]. *Front Endocrinol*, 2023, 14: 1149239.
- [16] SKOVSO S. Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin [J]. *J Diabetes Investig*, 2014, 5(4): 349-58.
- [17] BAI Y F, WEN H, LIN J Y, et al. Tanshinone I improves renal fibrosis by promoting gluconeogenesis through upregulation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α [J]. *Ren Fail*, 2024, 46 (2): 2433710.
- [18] WANG Y S, CHEN B F, ZHANG J H, et al. Preclinical evidence of mulberry leaf polysaccharides on diabetic kidney disease: a systematic review and meta-analysis [J]. *Planta Med*, 2024, 90(15): 1100-14.
- [19] 牛梦竹, 朱悦, 张源源, 等. Notch/PTEN/AKT 信号通路在跑台运动减轻 db/db 小鼠肾纤维化中的作用及机制研究 [J]. *中国病理生理杂志* (NIU M Z, ZHU Y, ZHANG Y Y, et al. Role of Notch/PTEN/AKT signaling pathway in attenuating renal fibrosis in db/db mice after treadmill exercise [J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*), 2023, 39(5): 863-73.
- [20] LI R Y, GUO L. Exercise in diabetic nephropathy: protective effects and molecular mechanism [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(7): 3605.
- [21] ITARU M, YOSHIO O, JING X, et al. Exercise ameliorates dia-

- betic kidney disease in type 2 diabetic fatty rats [J]. *Antioxidants*, 2021, 10(11): 1754.
- [22] HUANG X Z, WEN D H, ZHANG M, et al. Sirt1 activation ameliorates renal fibrosis by inhibiting the TGF- β /Smad3 pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2014, 115(5): 996-1005.
- [23] MANAP A S A, WISHAM A A, WONG W F, et al. Mapping the function of microRNAs as a critical regulator of tumor-immune cell communication in breast cancer and potential treatment strategies [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2024, 12: 1390704.
- [24] WANG Y F, HE W F, REN P Y, et al. Carthamin yellow-loaded glycyrrhetic acid liposomes alleviate interstitial fibrosis in diabetic nephropathy [J]. *Ren Fail*, 2025, 47(1): 2459356.
- [25] HUANG J Y, YE J, GAO Y, et al. Identification of proteins related to SIS3 by iTRAQ and PRM-based comparative proteomic analysis in cisplatin-induced acute kidney injury [J]. *PeerJ*, 2024, 12: e17485.
- [26] WU S, JI L N, FAN X M, et al. Jieduquyuzhishen prescription attenuates renal fibrosis in MRL/lpr mice via inhibiting EMT and TGF- β 1/Smad2/3 pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 4987323.
- [27] SCHNAPER H W, HAYASHIDA T, PONCELET A C. It's a Smad world: regulation of TGF- β signaling in the kidney [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13(4): 1126-8.
- [28] MENG X, NIKOLIC-PATERSON D J, LAN H Y. TGF- β : the master regulator of fibrosis [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2016, 12(6): 325-38.
- [29] ZHAO T T, ZHANG H J, LU X G, et al. Chaihuang-Yishen granule inhibits diabetic kidney disease in rats through blocking TGF- β /Smad3 signaling [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e90807.
- [30] CHEN H Y, ZHONG X, HUANG X R, et al. MicroRNA-29b inhibits diabetic nephropathy in db/db mice [J]. *Mol Ther*, 2014, 22(4): 842-53.
- [31] DU B, MA L M, HUANG M B, et al. High glucose down-regulates miR-29a to increase collagen IV production in HK-2 cells [J]. *FEBS Lett*, 2010, 584(4): 811-6.
- [32] ASSMANN T S, RECAMONDE-MENDOZA M, DE SOUZA B M, et al. MicroRNAs and diabetic kidney disease: systematic review and bioinformatic analysis [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2018, 477: 90-102.
- [33] 徐小龙. 血浆microRNA-29c在单侧输尿管梗阻大鼠肾间质纤维化模型中的表达及意义[D]. 广州: 南方医科大学, 2015.
- [34] SOCI U P R, FERNANDES T, HASHIMOTO N Y, et al. MicroRNAs 29 are involved in the improvement of ventricular compliance promoted by aerobic exercise training in rats [J]. *Physiol Genomics*, 2011, 43(11): 665-73.
- [35] 孙昌亮. TGF- β 1/Smad及其相关miRNA在运动干预糖尿病心肌纤维化形成中的调节作用[D]. 扬州: 扬州大学, 2018.
- [36] FERNANDES T, MAGALHAES F C, ROQUE F R, et al. Exercise training prevents the microvascular rarefaction in hypertension balancing angiogenic and apoptotic factors: role of microRNAs-16, -21, and -126 [J]. *Hypertension*, 2012, 59(2): 513-20.
- [37] NIELSEN S, AKERSTROM T, RINNOV A, et al. The miRNA plasma signature in response to acute aerobic exercise and endurance training [J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e87308.
- [38] TIAGO, FERNANDES, VALERIO, et al. Aerobic exercise training promotes physiological cardiac remodeling involving a set of microRNAs [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2015, 309(4): H543-52.