

• 基础研究 •

tRF-AsnGTT-33 减轻阿霉素肾病小鼠足细胞损伤的机制研究

徐明星, 黄 婵, 宁蓓蓓, 施会敏, 甘卫华*

南京医科大学第二附属医院儿肾科, 江苏 南京 210003

[摘要] 目的: 探讨 tRNA 衍生片段 AsnGTT-33 (tRNA-derived fragment AsnGTT-33, tRF-AsnGTT-33) 在阿霉素 (adriamycin, ADR) 肾病小鼠足细胞损伤中的作用和机制。方法: 尾静脉一次性注入 ADR (10 mg/kg), 构建 ADR 肾病小鼠模型, 尾静脉注射 tRF-AsnGTT-33 腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV) 0.5 mL/只实现体内过表达, 采用肌氨酸氧化酶法检测小鼠血清肌酐 (serum creatinine, Scr)、脲酶法检测血尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN)、苏木精和伊红染色 (hematoxylin and eosin staining, HE) 和过碘酸-雪夫染色 (periodic acid-schiff stain, PAS) 观察肾小球及肾小管损伤程度, 并通过 qPCR 和 Western blot 分析足细胞标志物 Nephritin 和 Podocin 的表达变化。体外以 1 mg/L ADR 诱导足细胞损伤, 转染 tRF-AsnGTT-33 mimic 后, 通过 qPCR 和 Western blot 检测细胞内 nephritin 和 podocin 表达变化。基于 miRDB 数据库预测 RAB21 为靶基因, 检测足细胞及小鼠肾脏组织中 tRF-AsnGTT-33 过表达对 RAB21 表达的影响。结果: ADR 肾病小鼠肾脏组织 tRF-AsnGTT-33 表达显著下调, 伴随 Scr、BUN 升高, nephritin 和 podocin 表达降低, 肾脏病理损伤加重, 如肾小球基底膜增厚、肾小管内可见蛋白管型、间质纤维化等; tRF-AsnGTT-33 过表达可显著降低 Scr 及 BUN 水平, 减轻病理损伤, 上调 Nephritin 和 Podocin 的表达。ADR 诱导的足细胞中 tRF-AsnGTT-33 表达下调, 且 Nephritin 和 Podocin 表达下降, tRF-AsnGTT-33 过表达后 Nephritin 和 Podocin 表达升高。tRF-AsnGTT-33 过表达后足细胞及小鼠肾脏组织中 RAB21 表达均显著下调。结论: tRF-AsnGTT-33 可能通过靶向调控 RAB21 减轻 ADR 诱导的足细胞损伤, 为寻找慢性肾脏病治疗靶点提供理论依据。

[关键词] 阿霉素肾病; 足细胞; 细胞凋亡; tRF-AsnGTT-33; RAB21

[中图分类号] R329

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2026)05-664-09

doi: 10.7655/NYDXBNSN250685

Mechanism of podocyte injury attenuation by tRF-AsnGTT-33 in adriamycin-induced in nephropathy mice

XU Mingxing, HUANG Chan, NING Beibei, SHI Huimin, GAN Weihua*

Department of Pediatric Nephrology, the Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210003, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the role and mechanism of the tRNA-derived fragment AsnGTT-33 (tRF-AsnGTT-33) in podocyte injury within a murine model of adriamycin (ADR)-induced nephropathy. **Methods:** An ADR nephropathy mouse model was established via a single tail vein injection of ADR (10 mg/kg). tRF-AsnGTT-33 adeno-associated virus (AAV) (0.5 mL per mouse) was administered via tail vein to achieve *in vivo* overexpression. Renal function was assessed by measuring serum creatinine (Scr) levels using the sarcosine oxidase method and blood urea nitrogen (BUN) levels using the urease method. Renal pathological injury was evaluated by hematoxylin and eosin staining (HE) and periodic acid-schiff staining (PAS) to observe glomerular and tubular damage. The mRNA and protein expression levels of the podocyte markers nephritin and podocin were analyzed by quantitative PCR (qPCR) and Western blot, respectively. *In vitro*, podocyte injury was induced by 1 mg/L ADR. Following transfection with a tRF-AsnGTT-33 mimic, the expression levels of nephritin and podocin were detected by qPCR and Western blot. The miRDB database was used to predict Ras-related protein RAB21 as a potential target gene. The effect of tRF-AsnGTT-33 overexpression on RAB21 expression was subsequently examined in both cultured podocytes and mouse renal tissues. **Results:** Renal tissues from ADR nephropathy mice exhibited significantly downregulated tRF-AsnGTT-33 expression, accompanied by markedly elevated Scr and BUN levels, reduced expression of nephritin and podocin, and aggravated renal pathological injury, including thickening of the glomerular basement membrane,

[基金项目] 国家自然科学基金(82400864); 南京市卫生科技发展专项(YKK23288, YKK23289)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: weihuagan@njmu.edu.cn (ORCID: 0000-0002-4649-2368)

intratubular protein casts, and interstitial fibrosis. Overexpression of tRF-AsnGTT-33 significantly lowered Scr and BUN levels, alleviated pathological damage, and upregulated the expression of nephrin and podocin. In ADR-induced podocytes, tRF-AsnGTT-33 expression was decreased, along with reduced nephrin and podocin expression; these effects were reversed by tRF-AsnGTT-33 overexpression. Furthermore, tRF-AsnGTT-33 overexpression led to a significant downregulation of RAB21 expression in both podocytes and mouse renal tissues. **Conclusion:** tRF-AsnGTT-33 may alleviate ADR-induced podocyte injury by targeting RAB21, providing a theoretical foundation for identifying novel therapeutic targets for chronic kidney disease.

[Key words] adriamycin nephropathy; podocyte; apoptosis; tRF-AsnGTT-33; RAB21

[J Nanjing Med Univ, 2026, 46(05): 664-672]

慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)已成为威胁人类健康的全球性重大公共卫生问题,其发病率高、并发症多、死亡率高,且近些年有年轻化趋势,目前尚无有效根治手段^[1]。研究表明,蛋白尿是影响CKD进展的独立危险因素^[2]。足细胞损伤与蛋白尿的产生密切相关^[3]。由于足细胞的修复和再生能力有限,其损伤程度是影响CKD预后的主要决定因素^[4-5]。因此,研究足细胞损伤的分子机制对诊治CKD及改善患者预后具有重要意义。

转运RNA(transfer RNA, tRNA)衍生片段(tRNA-derived RNA fragment, tRF)是一类从成熟tRNA或tRNA前体经特定核酸酶(如Dicer、ANG等)切割所产生的短链非编码RNA,长度通常为14~30个核苷酸^[6]。研究表明,tRF在细胞应激、蛋白质翻译、细胞增殖、DNA损伤调节和表观遗传修饰调节等方面有着重要作用^[7-11]。在疾病诊疗领域,tRF在肿瘤性疾病、神经退行性疾病、心血管疾病等多种人类疾病中展现出巨大的临床应用潜力。然而,tRF在肾脏领域中的功能探索仍处于起步阶段。

本课题组前期应用阿霉素(adriamycin, ADR)诱导足细胞损伤模型,通过高通量测序技术筛选出203条差异表达的tRF,其中101条上调,102条下调,基因本体(Gene Ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路分析提示这些差异表达的tRF参与了众多与足细胞损伤相关的信号通路,如Ras信号通路、Wnt信号通路、PI3K-Akt信号通路等^[12]。其中,tRF-AsnGTT-33表达下调最为显著,因此本研究探讨其在ADR肾病足细胞损伤中的作用和分子机制,以期为开发以tRF为靶点的CKD精准治疗策略提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

胎牛血清(WISENT公司,加拿大);青霉素-链

霉素溶液(HyClone公司,美国);RPMI1640培养基、胰酶(含EDTA)(Gibco公司,美国);ADR、Lipofectamine 2000转染试剂(Med Chem Express公司,美国);血清肌酐(serum creatinine, Scr)及血尿素氮(blood urine nitrogen, BUN)定量试剂盒(南京建成生物公司);CCK-8试剂盒、双荧光素酶测定试剂盒(上海碧云天生物公司);tRF-AsnGTT-33腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)和阴性对照(negative control, NC)(上海吉凯基因有限公司);tRF-AsnGTT-33 mimic及NC(广州锐博生物科技有限公司); γ 干扰素(interferon γ , IFN- γ)(PeproTech公司,美国);Trizol试剂(Invitrogen公司,美国);逆转录试剂盒、PCR试剂盒、RIPA裂解液、蛋白酶抑制剂PMSF及BCA定量试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司);PCR引物由南京锐真生物技术有限公司设计合成并验证;RAB21质粒和空载(vector)(南京科瑞斯生物公司);GAPDH、nephrin、podocin抗体(Affinity公司,美国);RAB21抗体(湖南艾方生物科技有限公司);羊抗兔二抗(武汉Abbkine生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物实验

20只雄性SPF级BALB/c小鼠(雄性,8周,22~25 g)购自南京医科大学动物实验中心生产部,于南京医科大学实验动物屏障环境内饲养,正常进食与活动,温度保持在20~26℃、湿度保持在40%~70%,每隔12 h昼夜交替。适应性喂养2周后,随机分为4组($n=5$):①Control组,PBS尾静脉一次性注入;②ADR组,10 mg/kg ADR尾静脉一次性注入^[8];③ADR+tRF-NC组,10 mg/kg ADR尾静脉一次性注入,2 h后注射tRF-AsnGTT-33 NC AAV 50 nmoL;④ADR+tRF-AAV组,10 mg/kg ADR尾静脉一次性注入,2 h后注射tRF-AsnGTT-33 AAV 50 nmoL。2周后处死小鼠,收集血清及保存肾脏备用。动物实验已获得南京医科大学实验动物伦理委员会批准(伦理

号: IACUC-2408032)。

1.2.2 肾功能指标检测

检测Scr: 取96孔板, 各样本取6 μL 加入孔内, 标准孔及空白孔分别加入标准品6 μL 、蒸馏水6 μL , 向各孔分别加入酶溶液A 180 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育5 min, 546 nm波长测定吸光度值, 计为A1, 向各孔内加入酶溶液B 60 μL , 546 nm波长测定吸光度值, 计为A2, 计算 $\Delta A = A2 - K \times A1$, K为稀释因子, 数值为31/41, 则Scr结果为 $(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times C_{\text{标准}} / (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}})$, 其中 $C_{\text{标准}}$ 为标准品浓度, 为442 $\mu\text{mol/L}$ 。

检测BUN: 取96孔板, 待测定样本取4 μL 加入孔内, 标准孔及空白孔分别加入10 mmol/L BUN标准品4 μL 、蒸馏水4 μL , 每孔再加入50 μL 缓冲酶液, 混匀后37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育10 min, 依次向各孔加入酚显色液及碱性次氯酸钠各200 μL , 混匀后37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育10 min, 酶标仪测定546 nm处吸光度, 则BUN结果为 $(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times C_{\text{标准}} / (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}})$, 其中 $C_{\text{标准}}$ 为标准品浓度, 为10 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.2.3 苏木精和伊红染色(hematoxylin and eosin staining, HE)和过碘酸-雪芙染色(periodic acid-schiff stain, PAS)

HE染色: 用切片机将蜡块切成厚度为3~5 μm 薄片后80 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱烤30 min, 再贴附于载玻片上; 将载玻片依次放入二甲苯I、二甲苯II中各5~10 min完成脱蜡, 再依次经过100%、95%、90%、80%、70%酒精各2~3 min, 最后用蒸馏水冲洗, 苏木精染色10 min, 清水冲洗, 1%盐酸酒精分化20 s, 清水冲洗3次, 伊红染色2 min, 封片。

PAS染色: 石蜡切片脱蜡复水后放入过碘酸溶液中氧化7 min, 蒸馏水冲洗3次, 雪夫试剂染色20 min, 蒸馏水冲洗, 苏木精染色2 min, 清水冲洗, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 封片。

1.2.4 细胞培养

永生化小鼠肾小球足细胞(MPC5细胞系)来源于南京医科大学第二附属医院肾脏病研究中心。将足细胞培养在含0.1% IFN- γ 、10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素的RPMI 1640完全培养基中, 置于33 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱中隔天换液, 细胞融合至80%~90%用胰酶消化传代。足细胞培养于不含IFN- γ 的RPMI 1640完全培养基中, 置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱中诱导分化7~14 d。待细胞融合至70%时进行分组干预。

1.2.5 tRF-AsnGTT-33过表达转染

足细胞处于对数生长期时按照 2×10^5 个/mL密度将其接种至6孔板中, 置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的孵箱

内, 待细胞融合至40%时, 将室温孵育5 min后的Lipofectamine 2000分别与tRF-AsnGTT-33 mimic、tRF-AsnGTT-33 NC mimic混匀(转染浓度: 50 nmol/L), 缓慢加入无血清培养基内, 每孔加入2 mL, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的孵箱内孵育4~6 h后更换为正常含血清培养基, 转染完成24 h后加入ADR干预24 h(干预浓度为1 $\mu\text{g/mL}$), 依据转染条件不同分为4组: Control组、ADR组、ADR+tRF NC组、ADR+tRF mimic组。

1.2.6 CCK-8检测细胞存活率

足细胞分化完成后以 5×10^3 个/mL密度接种于96孔板内, 每组6个复孔, 置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱内继续培养至细胞完成贴壁, 每孔PBS洗2遍后根据ADR浓度分为0、0.5、1.0、1.5、2.0 $\mu\text{g/mL}$ 共5组, 分组进行干预, 每孔加入10% CCK-8溶液, 放回孵箱内继续培养3 h, 酶标仪检测各孔在450 nm处吸光度。

1.2.7 Real-time qPCR

取小鼠肾脏组织每只约20 mg, 每管加入1 mL Trizol试剂后置于研磨机内充分研磨, 通风橱内向各管加入200 μL 氯仿, 振荡30 s, 冰上静置15 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min离心15 min, 小心吸取上清液, 加入等体积异丙醇摇晃混匀, 冰上静置10 min后4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min离心15 min, 弃上清液, 每管加入500 μL 75%乙醇, 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min离心10 min, 弃上清, 擦干管内液体, 向管底加入20 μL DEPC水, 小心吹打混匀即得到总RNA。细胞经Trizol充分裂解完成后, 经氯仿萃取、异丙醇沉淀、75%乙醇漂洗等步骤提取细胞总RNA。分光光度计测出总RNA浓度及纯度, 依据反转录试剂盒操作说明书进行反转录, 得到cDNA, 各样本均设置3个复孔, RT-qPCR法检测各样本tRF-AsnGTT-33及足细胞标志蛋白mRNA的ct值(tRF-AsnGTT-33引物序列: 5'-CTGTTAACC-GAAAGGTTGGTG-3'), U6作为内参, 用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算tRF-AsnGTT-33相对表达量, β -actin为内参, 用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算足细胞标志蛋白mRNA相对表达量。U6和tRF-AsnGTT-33引物均由广州锐博生物设计合成, 其余引物由上海锐真生物公司合成, 序列如表1。

1.2.8 Western blot

取小鼠肾脏组织加入RIPA及PMSF, 充分研磨后离心(4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min)30 min, BCA法测定上清液蛋白浓度, 用SDS-PAGE上样缓冲液制备上样蛋白, 沸水浴5 min后-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。提取细胞蛋白时在加入RIPA裂解液及PMSF后冰上静置40 min, 刮取细胞后离心(4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min)15 min, 余步骤与提取组织蛋白相同。每孔蛋白上样量10 μg , 经SDS-

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

Gene	Primer sequence(5'→3')
β-actin	F: CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC R: ATGGAGCCACCGATCCACA
nephrin	F: ATGGGAGCTAAGGAAGCCACA R: GATGGAGAGGATTACGCTGGG
podocin	F: GCATCAAGCCCTCTGGATTAG R: AGACGGAGATCAACCTTGTGATA
RAB21	F: ACGCCATTAGAGGGAGGA R: CGAGAGAAAGTCCCAGAATGAA

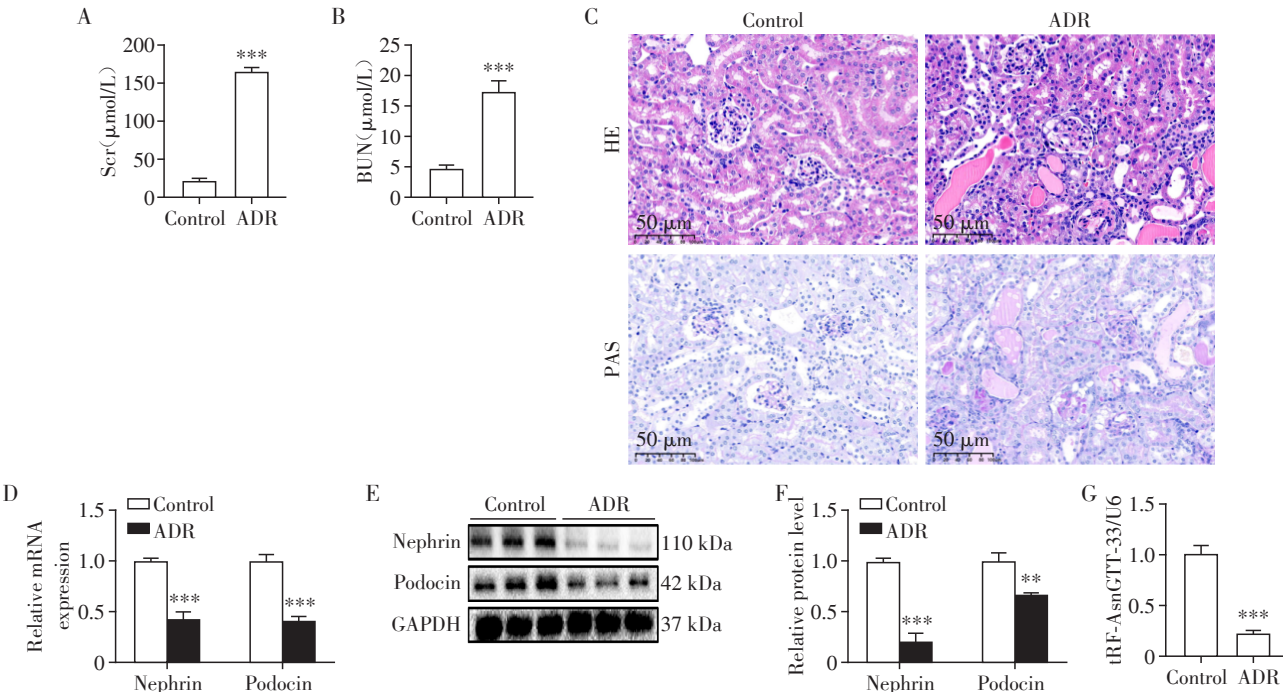
PAGE电泳(160 V、50 min)、转膜(400 mA、40 min)、5%脱脂牛奶常温封闭2 h,置于兔源nephrin、podocin、RAB21一抗稀释液中4℃过夜(1:2 000),TBST洗3次,每次5 min,放入羊抗兔二抗稀释液(1:10 000)中,室温孵育1 h后TBST洗膜,ECL曝光液充分浸润后凝胶成像仪显影。ImageJ软件计算灰度值,以GAPDH为内参计算目的蛋白表达量。

1.2.9 双荧光素酶报告基因实验
分别构建野生型RAB21(WT-RAB21)和突变型RAB21(MUT-RAB21)质粒载体,将WT-RAB21、MUT-RAB21分别与tRF-AsnGTT-33 mimics、tRF-

AsnGTT-33 NC mimics共同转染,转染48 h后依据双荧光素酶报告基因实验说明书测定相对荧光素酶活性。

1.3 统计学方法
实验数据使用GraphPad Prism 8进行数据分析。两组间比较采用非配对*t*检验,多组间比较采用单因素方差分析,*P* < 0.05为差异有统计学意义。

2 结 果
2.1 tRF-AsnGTT-33在ADR肾病小鼠肾组织中表达显著下调
与Control组相比,ADR组小鼠Scr和BUN水平显著升高(图1A、B);HE和PAS染色显示,Control组、ADR组肾小管损伤评分分别为(0.63±0.25)分、(2.63±0.27)分,ADR组肾小管损伤更显著(*P* < 0.01,表2),ADR组小鼠肾组织表现为肾小球系膜基质和细胞数量增加,伴有肾小管扩张、肾小管变性、肾小管蛋白管型(图1C);RT-qPCR和Western blot结果显示,与Control组相比,ADR组中Nephrin和Podocin的mRNA与蛋白表达量显著下降(图1D~F);此外,tRF-AsnGTT-33在ADR肾病小鼠肾组织中表达显著下调(图1G)。



A: Scr levels in ADR-induced nephropathy mice. B: BUN levels in ADR-induced nephropathy mice. C: Representative renal histopathology (HE and PAS staining, scale bar=50 μm) in ADR-induced nephropathy mice. D: Relative mRNA expression levels of Nephrin and Podocin in renal tissues. E, F: Representative Western blot bands and relative protein expression levels of Nephrin and Podocin. G: Expression level of tRF-AsnGTT-33 in renal tissues of ADR-induced nephropathy mice. Compared with the control group, ***P* < 0.01 and ****P* < 0.001 (*n*=5).

图1 tRF-AsnGTT-33在ADR肾病小鼠肾组织中的表达
Figure 1 tRF-AsnGTT-33 expression in renal tissue of ADR nephropathy mice

2.2 过表达 tRF-AsnGTT-33 减轻 ADR 肾病小鼠的足细胞损伤

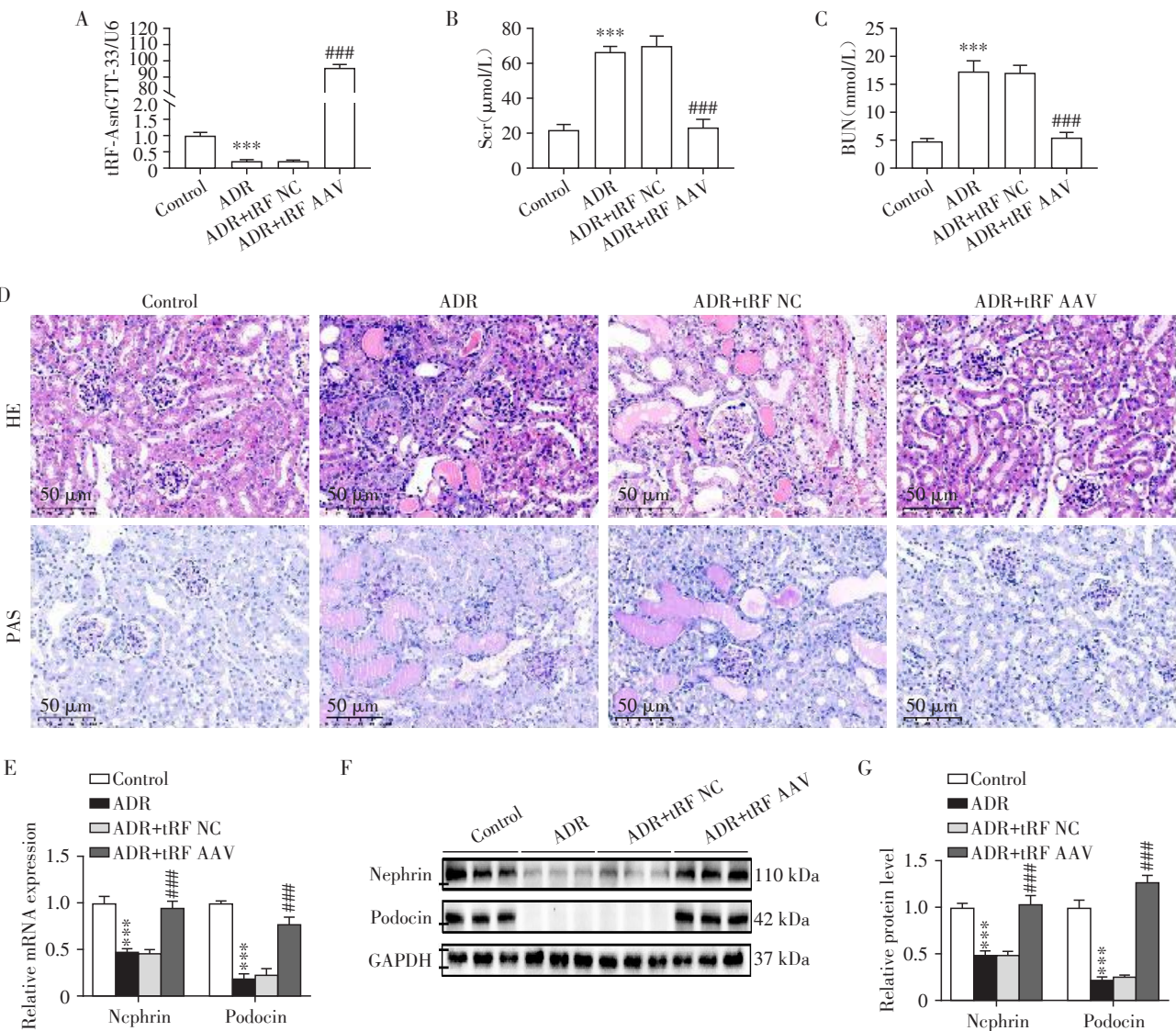
与 ADR+tRF NC 组相比, ADR+tRF AAV 组 tRF-AsnGTT-33 的表达量显著升高, 证实体内过表达成功(图 2A); 与 ADR+tRF NC 组相比, ADR+tRF AAV 组小鼠 Scr 及 BUN 水平明显下降(图 2B、C), HE 和 PAS 染色显示肾组织病理损伤明显减轻(图 2D); 肾小管损伤减轻(表 2); Real-time qPCR 和 Western blot 结果显示, ADR+tRF AAV 组 Nephrin 和 Podocin 的 mRNA 和蛋白表达量明显高于 ADR+tRF NC 组(图

表 2 tRF-AsnGTT-33 过表达后各组肾小管损伤评分
Table 2 Tubular injury scores in different groups after tRF-AsnGTT-33 overexpression ($\bar{x} \pm s$)

Group	Tubular injury score
Control(n=5)	0.63 ± 0.27
ADR(n=5)	2.63 ± 0.27**
ADR+tRF NC(n=5)	2.75 ± 0.21
ADR+tRF AAV(n=5)	0.88 ± 0.41##

Compared with the control group, ***P* < 0.01; compared with the ADR group, ##*P* < 0.01.

2E~G)。



A: Expression of tRF-AsnGTT-33 in renal tissues across groups. B: Scr levels in mice from different groups. C: Changes in BUN levels among experimental groups. D: Representative renal histology (H&E and PAS staining, scale bar=50 μm) in mice of each group. E: Relative mRNA expression levels of Nephrin and Podocin in renal tissues across groups. F, G: Representative Western blot bands and relative protein expression levels of Nephrin and Podocin in renal tissues from all groups. Compared with the control group, ****P* < 0.001; compared with the ADR+tRF NC group, ###*P* < 0.001 (*n*=5).

图 2 过表达 tRF-AsnGTT-33 对 ADR 肾病小鼠足细胞损伤的影响

Figure 2 Effect of tRF-AsnGTT-33 overexpression on podocyte injury in ADR-induced nephropathy mice

2.3 tRF-AsnGTT-33在ADR诱导足细胞损伤中显著下调

用不同浓度ADR干预足细胞24 h, CCK-8实验结果显示随着ADR浓度增加, 足细胞生存率呈剂量依赖性下降(图3A), tRF-AsnGTT-33表达也呈剂量依赖性下调(图3B)。用ADR(1 μg/mL)干预足细胞24 h, RT-qPCR和Western blot结果显示, ADR组足细胞中Nephrin和Podocin的mRNA和蛋白表达量

显著低于Control组(图3C~E)。
2.4 过表达tRF-AsnGTT-33可抑制ADR诱导的足细胞损伤

与ADR+tRF NC组相比, ADR+tRF mimics组tRF-AsnGTT-33的表达量显著增加, 表明过表达成功(图4A); Real-time qPCR和Western blot结果显示, 与ADR+tRF NC组相比, Nephrin和Podocin的mRNA和蛋白相对表达量在ADR+tRF mimics组显

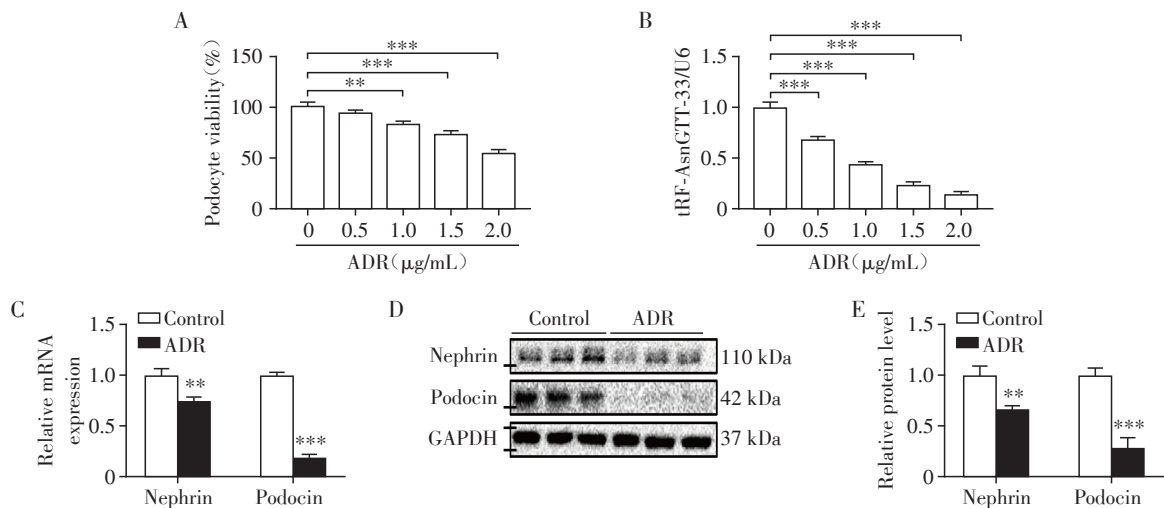


图3 tRF-AsnGTT-33在ADR诱导足细胞损伤中的表达
Figure 3 Expression of tRF-AsnGTT-33 in ADR-induced podocyte injury
A: Viability of podocytes treated with varying concentrations of ADR $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ ($n=3$). B: Expression levels of tRF-AsnGTT-33 in podocytes induced by different concentrations of ADR $^{***}P < 0.001$ ($n=3$). C: Relative mRNA expression levels of Nephrin and Podocin. D, E: Representative Western blot bands and relative protein expression levels of Nephrin and Podocin. Compared with the control group, $^{**}P < 0.01$ and $^{***}P < 0.001$ ($n=3$).

著增加(图4B~D)。

2.5 tRF-AsnGTT-33调控下游靶基因RAB21的表达

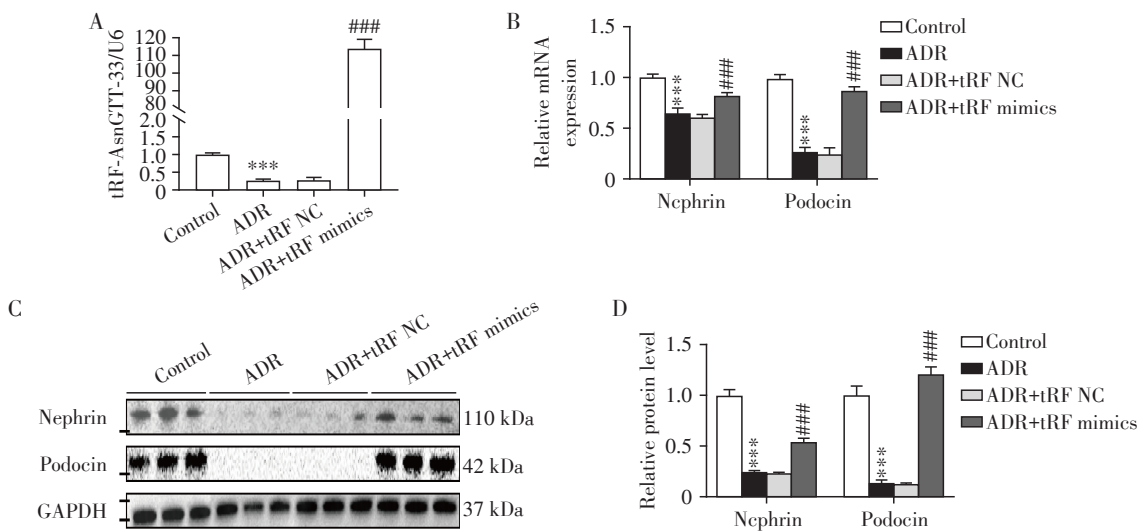
运用miRDB数据库预测tRF-AsnGTT-33的下游靶基因RAB21。双荧光素酶报告实验结果显示, tRF-AsnGTT-33与WT载体共转染至足细胞后双荧光素酶活性降低, 而与MUT载体共转染足细胞后双荧光素酶活性比较差异无统计学意义(图5A); Real-time qPCR结果显示, 与Control组相比, RAB21的mRNA表达量在ADR组显著升高, tRF-AsnGTT-33过表达后其mRNA表达量明显减少, 体内和体外结果一致(图5B、C); Western blot结果显示, RAB21的蛋白表达量在ADR组显著增加, tRF-AsnGTT-33过表达后其mRNA表达量明显减少, 体内和体外结果一致(图5D~G)。

3 讨论

CKD是一种严重的慢性进行性肾脏疾病, 严重

危害人类健康, 目前全球CKD患病率在8%~14%, 且近年来患病率持续增长^[1,13], 给世界各国带来沉重的经济负担, 因此, 积极预防和有效治疗CKD就成了全人类急需解决的难题。足细胞即肾小囊脏层上皮细胞, 其与血管内皮细胞、肾小球基底膜共同构成肾小球滤过屏障, 在蛋白质滤过方面发挥重要作用。足细胞损伤是蛋白尿产生的主要诱因, 而蛋白尿作为CKD恶化的独立危险因素, 其背后的发病机制一直是该领域的研究热点。

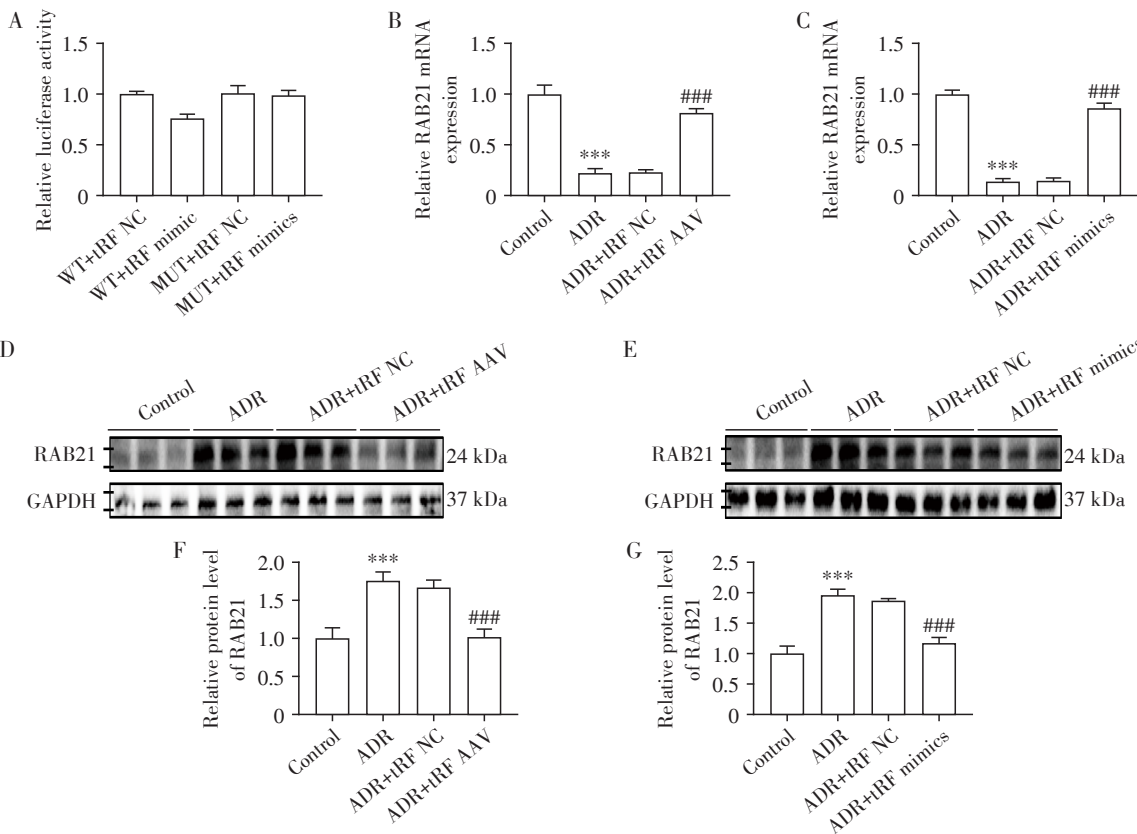
ADR肾病模型是实验室内构建的最常用模型之一, ADR产生的化学损伤可导致类似人类疾病的免疫和结构变化, 这种变化与人类免疫介导所致的CKD具有相似性, 其病理特征主要为肾小球增大、肾小管损伤以及间质增生, 同时伴有巨噬细胞和单核细胞的浸润^[14]。动物实验中通过对BALB/c小鼠尾静脉注射ADR, 小鼠肾脏呈肾小球体积增大, 肾小管水肿, 部分肾小管坏死, 肾小球基底膜增厚、系



A: Expression levels of tRF-AsnGTT-33 in podocytes across experimental groups. B: Relative mRNA expression levels of Nephrin and Podocin in podocytes from different groups. C, D: Representative Western blot bands and relative protein expression levels of Nephrin and Podocin in podocytes among groups. Compared with the control group, *** $P < 0.001$; compared with the ADR + tRF NC group, *** $P < 0.001$ ($n=3$).

图4 过表达 tRF-AsnGTT-33 对 ADR 诱导足细胞损伤的影响

Figure 4 Effect of tRF-AsnGTT-33 overexpression on ADR-induced podocyte injury



A: Luciferase reporter assay. B: Relative mRNA expression levels of RAB21 in podocytes from each group *in vivo*. C: Relative RAB21 mRNA expression levels in podocytes from each group *in vitro*. D: Representative Western blot bands of RAB21 protein in podocytes from each group *in vivo*. E: Representative Western blot bands of RAB21 protein in podocytes from each group *in vitro*. F: Relative protein expression levels of RAB21 in podocytes from each group *in vivo*. G: Relative protein expression levels of RAB21 in podocytes from each group *in vitro*. Compared with the control group, *** $P < 0.001$; compared with the ADR+tRF NC group, *** $P < 0.001$ ($n=3$).

图5 tRF-AsnGTT-33 对 RAB21 表达的影响

Figure 5 Effect of tRF-AsnGTT-33 on RAB21 expression

膜细胞增多,伴炎症细胞浸润等病理改变,足细胞损伤标志物Nephrin和Podocin表达显著降低,这些指标共同表明ADR肾病模型构建成功,为后续研究提供了可靠的实验基础。

tRF是一类来源于tRNA的非编码小RNA分子,越来越多的研究表明tRF与人类疾病密切相关,如癌症、免疫失调、认知障碍性疾病等。例如,tRF-29-79可通过调节谷氨酰胺转运蛋白的表达进而抑制肺癌进展^[15],tRF-011690可抑制阿霉素诱导的足细胞自噬^[16],tRF^{Ala-AGC-3-M8}通过减轻神经元炎症从而改善认知功能^[17]。本课题组前期研究中通过对ADR诱导足细胞损伤模型进行测序,发现tRF-AsnGTT-33是下调最为显著的tRF^[11]。本研究通过不同浓度ADR干预足细胞,结果显示tRF-AsnGTT-33的表达呈剂量依赖性下降,与测序结果一致。此外,体内实验表明,过表达tRF-AsnGTT-33可显著减轻ADR导致的肾脏病理改变及足细胞损伤,表明tRF-AsnGTT-33可能是治疗CKD的一个潜在靶点。

tRF主要通过影响蛋白质的生物合成而发挥作用,在蛋白质翻译过程中与mRNA竞争核糖体,tRF与核糖体亚基结合形成tRF-核糖体复合物,诱导应激颗粒组装调节翻译^[18]。tRF调控靶基因的方式主要有竞争性结合AGO蛋白家族、以转录因子调节mRNA稳定性等,Jehn等^[19]发现tRF还可通过特异性序列调节靶基因表达。RAB蛋白是构成小GTP酶的一部分,主要在细胞内负责运输物质,因此要保证细胞的正常生命状态就需要维持RAB蛋白的正常功能,越来越多的研究表明RAB蛋白与癌症、炎症及神经相关疾病有着密切联系^[20],其中RAB21已被证实其过表达可促进炎症进展,敲低RAB21可减轻炎症反应^[21]。本研究通过基因预测网站初步判定RAB21为tRF-AsnGTT-33的下游靶基因,实验验证tRF-AsnGTT-33可以负向调控RAB21的表达,但tRF-AsnGTT-33调控RAB21表达的机制仍有待研究。

综上,本研究发现tRF-AsnGTT-33在ADR肾病中显著下调,其过表达后可能通过负调控RAB21减轻ADR肾病中的足细胞损伤,这为开发以tRF为靶点的CKD治疗策略提供了一定的理论基础。

利益冲突声明:

作者声明本文无已知可影响文章内容的经济利益冲突或个人关系冲突。

Conflict of Interests:

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have

appeared to influence the work reported in this paper.

作者贡献声明:

徐明星负责实验研究设计、数据整理、统计分析及初稿写作,黄婵参与了统计分析与论文修改,宁蓓蓓负责数据整理,施会敏负责概念构思、研究设计、项目管理,甘卫华对本研究进行可行性分析及监督指导。

Author's Contributions:

XU Mingxing was responsible for the design of the experimental study, data curation, statistical analysis, and writing of the initial draft. HUANG Chan contributed to the statistical analysis and assisted in the writing, review, and editing of the manuscript. NING Beibei was responsible for data curation. SHI Hui-min was responsible for conceptualization, study design, and project administration. GAN Weihua performed the feasibility analysis for this study and provided supervision and guidance. All authors have reviewed and approved the final manuscript.

[参考文献]

- [1] KOVESDY C P. Epidemiology of chronic kidney disease: an update 2022[J]. *Kidney Int Suppl*, 2022, 12(1): 7-11
- [2] ZHANG X H, FANG Y, ZOU Z H, et al. Risk factors for progression of CKD with and without diabetes[J]. *J Diabetes Res*, 2022, 2022: 9613062
- [3] FENG Y, LI M M, WANG Y L, et al. Activation of TRPC6 by ang II induces podocyte injury and participates in proteinuria of nephrotic syndrome [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 915153
- [4] AGRAWAL S, HE J C, THARAUX P L. Nuclear receptors in podocyte biology and glomerular disease [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2021, 17(3): 185-204
- [5] TRIMARCHI H. Mechanisms of podocyte detachment, podocyturia, and risk of progression of glomerulopathies[J]. *Kidney Dis*, 2020, 6(5): 324-329
- [6] LUO L L, CAO Y, ZHANG J J, et al. The role of tRF-Val-CAC-010 in lung adenocarcinoma: implications for tumorigenesis and metastasis[J]. *BMC Cancer*, 2024, 24(1): 1033
- [7] YANG W H, GAO K P, QIAN Y H, et al. A novel tRNA-derived fragment AS-tDR-007333 promotes the malignancy of NSCLC via the HSPB1/MED29 and ELK4/MED29 axes [J]. *J Hematol Oncol*, 2022, 15(1): 53
- [8] CAI J X, LI C X, LIU S Y, et al. Angiogenin-mediated tsRNAs control inflammation and metabolic disorder by regulating NLRP3 inflammasome [J]. *Cell Death Differ*, 2024, 31(8): 1057-1069
- [9] KARACICEK B, KATKAT E, BINOKAY L, et al. The role of tRNA fragments on neurogenesis alteration by H₂O₂-induced oxidative stress [J]. *J Mol Neurosci*, 2025, 75(2): 47

- [10] LONG D B, DENG Z F, LI M, et al. tRNA-derived fragment 3031B regulates human anterior cruciate ligament cell proliferation and survival by targeting RELA [J]. *Gene*, 2025, 933: 148897
- [11] ZHU J J, WU X, MU M, et al. TEC-mediated tRF-31R9J regulates histone lactylation and acetylation by HDAC1 to suppress hepatocyte ferroptosis and improve non-alcoholic steatohepatitis[J]. *Clin Epigenetics*, 2025, 17(1): 9
- [12] LI S W, LIU Y W, HE X W, et al. tRNA-derived fragments in podocytes with adriamycin-induced injury reveal the potential mechanism of idiopathic nephrotic syndrome[J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 7826763
- [13] HILL N R, FATOBA S T, OKE J L, et al. Global prevalence of chronic kidney disease-a systematic review and meta-analysis[J]. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0158765
- [14] GUO J C, ANANTHAKRISHNAN R, QU W, et al. RAGE mediates podocyte injury in adriamycin-induced glomerulosclerosis[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2008, 19(5): 961-972
- [15] SHI Y J, PAN Z H, FENG Y P, et al. tRF-29-79 regulates lung adenocarcinoma progression through mediating glutamine transporter SLC1A5 [J]. *Carcinogenesis*, 2024, 45(6): 409-423
- [16] 赵唐明, 王 娥, 张琳琳, 等. tRF-011690对阿霉素诱导的足细胞自噬的影响[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2023, 43(11): 1515-1519
- ZHAO T M, WANG E, ZHANG L L, et al. The effect of tRF-011690 on autophagy in podocytes induced by doxorubicin[J]. *Journal of Nanjing Medical University (Natural Science)*, 2023, 43(11): 1515-1519
- [17] DENG Z H, LI Y D, CHI W J, et al. tRF(Ala-AGC-3-M8) attenuates neuroinflammation and neuronal damage in Alzheimer's disease *via* the EphA7-ERK(1/2)-p70S6K signaling pathway[J]. *Alzheimers Res Ther*, 2025, 17(1): 104
- [18] KIM H K, FUCHS G, WANG S C, et al. A transfer-RNA-derived small RNA regulates ribosome biogenesis[J]. *Nature*, 2017, 552(7683): 57-62
- [19] JEHN J, TREML J, WULSCH S, et al. 5' tRNA halves are highly expressed in the primate hippocampus and might sequence-specifically regulate gene expression[J]. *RNA*, 2020, 26(6): 694-707
- [20] LI X J, NI J J, QING H, et al. The regulatory mechanism of Rab21 in human diseases[J]. *Mol Neurobiol*, 2023, 60(10): 5944-5953
- [21] LI P, WU Y H, ZHU Y T, et al. Requirement of Rab21 in LPS-induced TLR4 signaling and pro-inflammatory responses in macrophages and monocytes[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 508(1): 169-176
- (收稿: 2025-06-20; 修回: 2025-11-14; 录用: 2025-12-17)
(本文编辑: 戴王娟)