

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

董海芸¹, 韩 芳¹, 齐一舟², 梅 峰¹

摘要 目的 探讨 circ_WBSCR17 通过调节 miR-30a-5p/JAK1 轴对高糖诱导的人肾小球系膜细胞纤维化和炎症的影响。方法 将人肾小球系膜细胞 HMCL 分为 NG 组(5.5 mmol/L 葡萄糖处理 HMCL 细胞)、HG 组(30 mmol/L 葡萄糖处理细胞)、si-NC 组(30 mmol/L 葡萄糖 + 转染 si-NC)、si-circ_WBSCR17 组(30 mmol/L 葡萄糖 + 转染 si-circ_WBSCR17)、si-circ_WBSCR17 + inhibitor-NC 组(30 mmol/L 葡萄糖 + si-circ_WBSCR17 和 inhibitor-NC 共转染)、si-circ_WBSCR17 + miR-30a-5p inhibitor 组(30 mmol/L 葡萄糖 + si-circ_WBSCR17 和 miR-30a-5p inhibitor 共转染); RT-qPCR 检测细胞中 circ_WBSCR17、miR-30a-5p 的表达; CCK-8 法检测细胞增殖; 流式细胞仪检测细胞凋亡; ELISA 法检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-6 和 IL-8 表达水平; Western blot 检测细胞中 JAK1、增殖细胞核抗原(PCNA)、Bax、转化生长因子- β 1(TGF- β 1)、纤维连接蛋白(FN)、IV 型胶原蛋白(collagen IV)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的表达; 荧光原位杂交(FISH)实验检测 circ_WBSCR17 的分布情况, 双荧光素酶报告基因实验分别验证 circ_WBSCR17 和 miR-30a-5p、JAK1 的关系。结果 与 NG 组比较, HG 组 HMCL 细胞增殖能力降低, TNF- α 、IL-6 和 IL-8 水平、p-JAK1/JAK1、p-STAT1/STAT1、p-STAT3/STAT3、Bax、TGF- β 1、FN、collagenIV、 α -SMA 蛋白表达升高($P < 0.05$); 与 HG 组和 si-NC 组比较, si-circ_WBSCR17 组 HMCL 细胞中 miR-30a-5p 表达、OD₄₅₀ 值、PCNA 表达升高, TNF- α 、IL-6 和 IL-8 水平、circ_WBSCR17、p-JAK1/JAK1、p-STAT1/STAT1、p-STAT3/STAT3、Bax、TGF- β 1、FN、collagenIV、 α -SMA 表达降低($P < 0.05$); 抑制 miR-30a-5p 减弱了敲低 circ_WBSCR17 对 HMCL 细胞增殖的促进作用, 增强了细胞凋亡、细胞纤维化和炎症反应; FISH 实验证实 circ_WBSCR17 主要分布在细胞质中; 双荧光素酶报告基因实验证实 circ_WBSCR17、JAK1 与 miR-30a-5p 存在靶向调控关系。结论 敲低 circ_WBSCR17 可通过调节 miR-30a-5p/JAK1 轴, 进而减轻高糖诱导的人肾小球系膜细胞纤维化和炎症。

关键词 circ_WBSCR17; miR-30a-5p; JAK1; 人肾小球系膜细胞; 纤维化; 炎症反应

中图分类号 R 587.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)10-1756-08
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.10.025

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是临床上糖尿病最常见的并发症之一,也是导致终末期肾病的主要原因之一,严重威胁着人们的生命健康安全^[1]。DN 的主要病理特征为肾小球硬化、基底膜增厚和间质纤维化等,肾小球系膜细胞是 DN 的主要效应细胞,其纤维化和炎症与 DN 的发生发展过程密切相关^[2]。高糖是 DN 发生的重要诱导因素,研究^[3]表明高糖可抑制肾小球系膜细胞增殖,促进其凋亡和氧化应激产生,从而加剧 DN 的进程。因此,深入研究高糖诱导的肾小球系膜细胞纤维化和炎症反应的作用机制对 DN 的治疗意义重大。环状 RNA(circular RNA, circRNA)是非编码 RNA 中的一员,参与细胞的增殖、凋亡等过程,对多种疾病的生物学进程具有调控作用^[4]。circ_WBSCR17 是 circRNA 中的一种,其在高糖诱导的肾小管细胞中高表达,促进细胞的炎症和纤维化,加重 DN 进程^[5]。而 circ_WBSCR17 通过调控 miR-30a-5p/JAK1 轴对高糖诱导的人肾小球系膜细胞的影响尚不明确。因此,该研究通过敲低 circ_WBSCR17 抑制 miR-30a-5p 表达,探究 circ_WBSCR17 调节 miR-30a-5p/JAK1 对高糖诱导的人肾小球系膜细胞纤维化和炎症的影响及可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料 人肾小球系膜细胞 HMCL 购自宁波明舟生物科技有限公司。

1.2 主要试剂 CCK-8 试剂盒(货号: CK04)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)检测试剂盒(货号: SEKH-0047)、白细胞介素(interleukin, IL)-6 检测试剂盒(货号: SEKH-0013)、IL-8 检测试剂盒(货号: SEKH-0016)购自北京索莱宝科技有限公司; 兔源一抗 JAK1(货号: BLL-KD10768)、转化生

2023-04-23 接收

基金项目: 青海省科技项目(编号: 2016-ZJ-709)

作者单位: ¹ 青海大学附属医院肾内科, 西宁 810000

² 昆明医科大学海源学院口腔医学, 昆明 650106

作者简介: 董海芸, 女, 副主任医师;

梅 峰, 女, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: me-ifengqh@163.com

长因子- $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$, 货号: BLL-K20220955)、纤维连接蛋白 (fibronectin, FN, 货号: BLL-K20220409) 购自上海佰利莱生物科技有限公司; 兔源一抗 IV 型胶原蛋白 (collagen IV, 货号: 33391M) 购自上海彩佑实业有限公司; 兔源一抗增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA, 货号: AF1363)、Bax (货号: AF1270)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA, 货号: AF1507)、GAPDH (货号: AF1186) 以及辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗 (货号: A0208) 购自上海碧云天生物技术有限公司; p-JAK1 (货号: ab138005)、p-STAT1 (货号: ab109461)、STAT1 (货号: ab92506)、p-STAT3 (货号: ab76315)、STAT3 (货号: ab68153) 购自英国 ABCam 公司; LipofectamineTM 2000 Reagent (货号: S30502) 购自上海源叶生物科技有限公司; circ_WBSCR17 敲低质粒 (si-circ_WBSCR17) 及对照 (si-NC)、miR-30a-5p 抑制剂 (miR-30a-5p inhibitor) 及对照 (inhibitor-NC)、miR-30a-5p 模拟物 (miR-30a-5p mimic) 及对照 (mimic-NC)、circ_WBSCR17 及 miR-30a-5p 引物购自广州锐博生物科技有限公司。

1.3 细胞培养 将 HMCL 细胞置于含 10% 胎牛血清、1% 青-链霉素的 DMEM 培养基中, 在 37 °C、5% CO₂ 的稳定环境下常规培养, 定期观察, 每 2 d 更换 1 次培养基, 当细胞融合度达到 80% 以上时, 消化传代, 收集对数期的细胞进行实验。

1.4 细胞转染与分组 将对数期的 HMCL 细胞分为 NG 组 (5.5 mmol/L 葡萄糖处理 HMCL 细胞)、HG 组 (30 mmol/L 葡萄糖处理细胞)、si-NC 组 (30 mmol/L 葡萄糖 + 转染 si-NC)、si-circ_WBSCR17 组 (30 mmol/L 葡萄糖 + 转染 si-circ_WBSCR17)、si-circ_WBSCR17 + inhibitor-NC 组 (30 mmol/L 葡萄糖 + si-circ_WBSCR17 和 inhibitor-NC 共转染)、si-circ_WBSCR17 + miR-30a-5p inhibitor 组 (30 mmol/L 葡萄糖 + si-circ_WBSCR17 和 miR-30a-5p inhibitor 共转染)。转染严格按照 Lipofectamine 2000 Transfection Reagent 操作步骤进行。

1.5 RT-qPCR 法检测 circ_WBSCR17、miR-30a-5p 表达 使用 TRIzol 试剂提取“1.4 项”中分组处理 48 h 的细胞中的总 RNA, 将 RNA 逆转录为 cDNA 后, 以 cDNA 为模板上 RT-qPCR 仪进行扩增。circ_WBSCR17 上游引物: 5'-CTTTGAGGTGCAGCGGTA-CG-3', 下游引物: 5'-AGCTCTCTGATGGGAGAG-3'; miR-30a-5p 上游引物: 5'-ACACTCCAGCTGGGTATA-AACATC-3', 下游引物: 5'-CATGTCGTGTTCTGGA-

GT-3'; GAPDH 上游引物: 5'-GGAAATCGTGCCTGACATT-3', 下游引物: 5'-CAGGCAGCTCGTAGCTCTT-3'; U6 上游引物: 5'-CTCGCTTCGGCACACA-3', 下游引物: 5'-AACGCTTCACGAATTGGT-3'。分别以 GAPDH、U6 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算细胞中 circ_WBSCR17、miR-30a-5p 的相对表达量。

1.6 CCK-8 法检测细胞增殖 将细胞以 1×10^4 个/孔接种到 96 孔板中, 按照“1.4 项”中的分组方式进行转染和葡萄糖刺激 24 h。分别将细胞培养 24、48、72 h 后, 弃去细胞上清液, 且在指定的时间点向每个孔中加入含有 10 μ l CCK-8 溶液的 100 μ l 完全培养基。孵育 2 h 后, 使用酶标仪检测 OD₄₅₀ 值。

1.7 流式细胞仪检测细胞凋亡 收集各组经转染和葡萄糖刺激 48 h 后的 HMCL 细胞, 以预冷的 PBS 洗涤 2 次, 添加 100 μ l 结合缓冲液悬浮各组 HMCL 细胞, 再分别添加 Annexin V-FITC 和 PI 染液 5 μ l, 充分混匀, 与室温下避光染色 15 min, 使用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.8 ELISA 试剂盒检测 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 水平 按照“1.4 项”中的分组方式, 收集各组 HMCL 细胞, 加入提取液, 超声破碎细胞, 收集上清液, 采用 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 检测试剂盒检测细胞内 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 水平。

1.9 Western blot 检测蛋白表达 利用 RIPA 裂解缓冲液提取经转染和葡萄糖刺激 24 h 的 HMCL 细胞总蛋白。采用电泳分离蛋白, 100 V 恒压转移蛋白至 PVDF 膜上, 用 5% 的脱脂牛奶封闭 2 h, 将膜与一抗 JAK1、p-JAK1、p-STAT1、STAT1、p-STAT3、STAT3、PCNA、Bax、TGF- $\beta 1$ 、FN、collagen IV、 α -SMA、GAPDH, 在 4 °C 孵育过夜, 再将膜与 HRP 偶联的羊抗兔二抗在室温下孵育 2 h, 弃去液体, 洗涤 3 次, 加入 ECL 试剂观察蛋白质印迹, Image J 软件评估蛋白的灰度值。

1.10 荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 实验 HMCL 细胞经固定脱水后, 加入 10 μ l 杂交缓冲液与 1 μ l 的 Cy3 标记的 circ_WBSCR17 荧光探针, 杂交 1.5 h, DAPI 溶液复染细胞核, 晾干后, 荧光显微镜下观察并拍照。

1.11 双荧光素酶报告基因实验 构建 circ_WBSCR17 野生型质粒 (circ_WBSCR17-WT) 和突变型质粒 (circ_WBSCR17-MUT), 将 circ_WBSCR17-WT 和 circ_WBSCR17-MUT 分别与 mimic-NC 或 miR-30a-5p mimic 共转染于 HMCL 细胞, 48 h 后检测荧光素酶活性。构建 JAK1 野生型质粒 (JAK1-WT) 和

突变型质粒(JAK1-MUT),将 JAK1-WT 和 JAK1-MUT 分别与 mimic-NC 或 miR-30a-5p mimic 共转染于 HMCL 细胞,48 h 后检测荧光素酶活性。

1.12 统计学处理 Graphpad Prism 7.0 软件用于分析数据。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。单因素方差分析用于多组间的比较,进一步两组间的比较采用 SNK- q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 HMCL 细胞中 circ_WBSCR17、miR-30a-5p 表达比较 与 NG 组比较,HG 组 HMCL 细胞中 circ_WBSCR17 表达升高,miR-30a-5p 表达降低($P < 0.05$);与 HG 组和 si-NC 组比较,si-circ_WBSCR17 组细胞中 circ_WBSCR17 表达降低,miR-30a-5p 表达升高($P < 0.05$);与 si-circ_WBSCR17 组和 si-circ_WBSCR17 + inhibitor-NC 组比较,si-circ_WBSCR17 + miR-30a-5p inhibitor 组 HMCL 细胞中 circ_WBSCR17 表达变化差异无统计学意义($P > 0.05$),miR-30a-5p 表达降低($P < 0.05$),见表 1。

表 1 各组 HMCL 细胞中 circ_WBSCR17、miR-30a-5p 表达比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	circ_WBSCR17	miR-30a-5p
NG	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
HG	1.74 ± 0.13 [*]	0.45 ± 0.06 [*]
si-NC	1.72 ± 0.08	0.44 ± 0.07
si-circ_WBSCR17	1.26 ± 0.14 ^{* #}	0.82 ± 0.05 ^{* #}
si-circ_WBSCR17 + inhibitor-NC	1.27 ± 0.11	0.81 ± 0.08
si-circ_WBSCR17 + miR-30a-5p inhibitor	1.25 ± 0.07	0.62 ± 0.04 ^{& ∇}
F 值	52.015	95.646

与 NG 组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与 HG 组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与 si-NC 组比较: [#] $P < 0.05$; 与 si-circ_WBSCR17 组比较: [&] $P < 0.05$; 与 si-circ_WBSCR17 + inhibitor-NC 组比较: [∇] $P < 0.05$

2.2 各组 HMCL 细胞增殖能力比较 与 NG 组比较,HG 组 HMCL 细胞中 OD₄₅₀ 值降低($P < 0.05$);与

HG 组和 si-NC 组比较,si-circ_WBSCR17 组 HMCL 细胞 OD₄₅₀ 值升高($P < 0.05$);与 si-circ_WBSCR17 组和 si-circ_WBSCR17 + inhibitor-NC 组比较,si-circ_WBSCR17 + miR-30a-5p inhibitor 组 HMCL 细胞 OD₄₅₀ 值降低($P < 0.05$),见表 2。

2.3 各组 HMCL 细胞凋亡情况比较 与 NG 组比较,HG 组 HMCL 细胞凋亡率升高($P < 0.05$);与 HG 组和 si-NC 组比较,si-circ_WBSCR17 组 HMCL 细胞凋亡率降低($P < 0.05$);与 si-circ_WBSCR17 组和 si-circ_WBSCR17 + inhibitor-NC 组比较,si-circ_WBSCR17 + miR-30a-5p inhibitor 组 HMCL 细胞凋亡率升高($P < 0.05$),见图 1 和表 3。

表 3 各组 HMCL 细胞凋亡率比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	凋亡率(%)
NG	5.46 ± 1.13
HG	32.27 ± 3.24 [*]
si-NC	31.65 ± 3.18
si-circ_WBSCR17	14.83 ± 2.15 ^{* #}
si-circ_WBSCR17 + inhibitor-NC	15.54 ± 2.07
si-circ_WBSCR17 + miR-30a-5p inhibitor	23.78 ± 2.26 ^{& ∇}
F 值	111.608

与 NG 组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与 HG 组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与 si-NC 组比较: [#] $P < 0.05$; 与 si-circ_WBSCR17 组比较: [&] $P < 0.05$; 与 si-circ_WBSCR17 + inhibitor-NC 组比较: [∇] $P < 0.05$

2.4 各组 HMCL 细胞 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 水平比较 与 NG 组比较,HG 组 HMCL 细胞中 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 水平升高($P < 0.05$);与 HG 组和 si-NC 组比较,si-circ_WBSCR17 组 HMCL 细胞 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 水平降低($P < 0.05$);与 si-circ_WBSCR17 组和 si-circ_WBSCR17 + inhibitor-NC 组比较,si-circ_WBSCR17 + miR-30a-5p inhibitor 组细胞 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 水平升高($P < 0.05$),见表 4。

2.5 各组 HMCL 细胞中 JAK1、PCNA、Bax 蛋白

表 2 各组 HMCL 细胞 OD₄₅₀ 值比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	OD ₄₅₀ 值		
	24 h	48 h	72 h
NG	1.13 ± 0.12	1.32 ± 0.14	1.54 ± 0.13
HG	0.62 ± 0.07 [*]	0.69 ± 0.05 [*]	0.76 ± 0.08 [*]
si-NC	0.63 ± 0.05	0.71 ± 0.06	0.75 ± 0.04
si-circ_WBSCR17	0.94 ± 0.06 ^{* #}	1.08 ± 0.08 ^{* #}	1.21 ± 0.11 ^{* #}
si-circ_WBSCR17 + inhibitor-NC	0.93 ± 0.08	1.07 ± 0.07	1.20 ± 0.07
si-circ_WBSCR17 + miR-30a-5p inhibitor	0.78 ± 0.04 ^{& ∇}	0.85 ± 0.03 ^{& ∇}	0.96 ± 0.05 ^{& ∇}
F 值	42.744	57.625	75.892

与 NG 组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与 HG 组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与 si-NC 组比较: [#] $P < 0.05$; 与 si-circ_WBSCR17 组比较: [&] $P < 0.05$; 与 si-circ_WBSCR17 + inhibitor-NC 组比较: [∇] $P < 0.05$

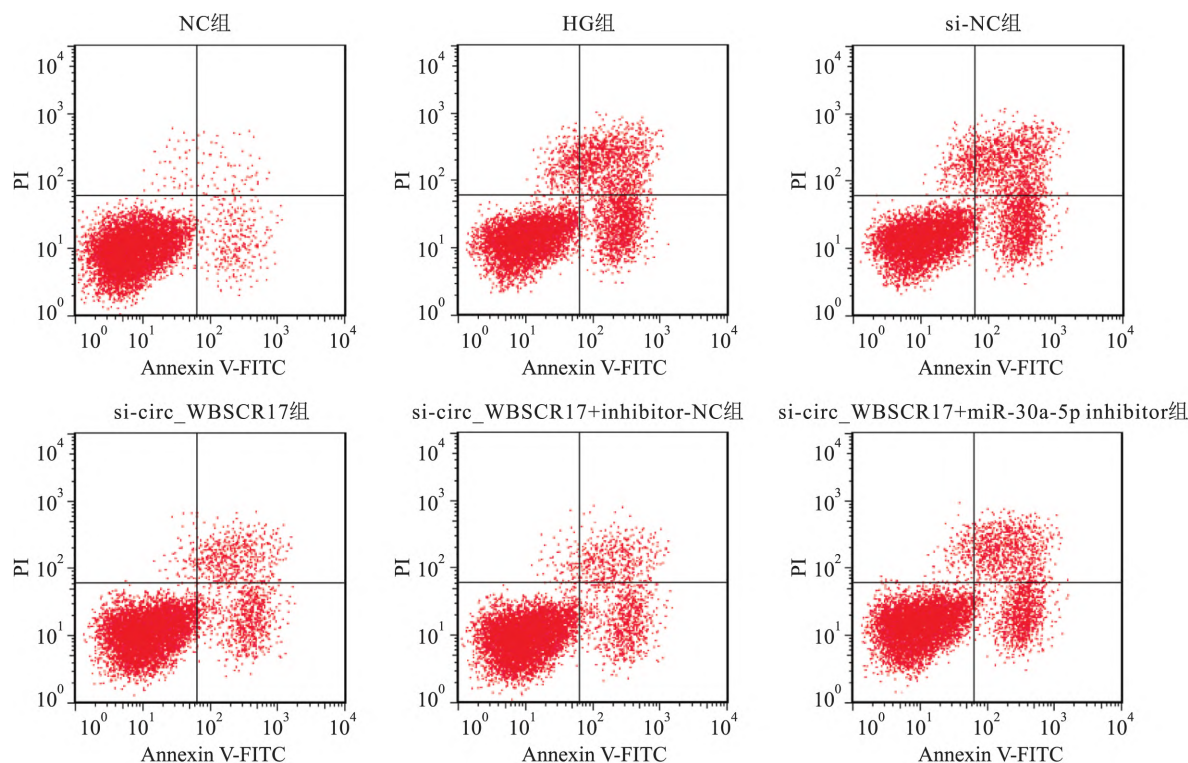


图1 各组 HMCL 细胞凋亡情况比较

表4 各组 HMCL 细胞 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 水平比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	TNF- α (ng/L)	IL-6 (ng/L)	IL-8 (μ g/L)
NG	26.35 $\pm$ 2.41	14.57 $\pm$ 1.43	1.34 $\pm$ 0.25
HG	78.64 $\pm$ 4.32 [*]	46.38 $\pm$ 3.24 [*]	7.56 $\pm$ 1.24 [*]
si-NC	76.52 $\pm$ 4.25	45.43 $\pm$ 3.17	6.82 $\pm$ 1.13
si-circ_WBSCR17	35.48 $\pm$ 3.13 [#]	21.65 $\pm$ 2.21 [#]	3.25 $\pm$ 0.26 [#]
si-circ_WBSCR17 + inhibitor-NC	37.26 $\pm$ 3.24	23.24 $\pm$ 2.18	3.18 $\pm$ 0.32
si-circ_WBSCR17 + miR-30a-5p inhibitor	54.87 $\pm$ 3.36 ^{&▽}	34.76 $\pm$ 2.35 ^{&▽}	5.27 $\pm$ 1.08 ^{&▽}
F 值	239.543	167.170	48.873

与 NG 组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与 HG 组比较: [#] $P < 0.05$; 与 si-NC 组比较: [&] $P < 0.05$; 与 si-circ_WBSCR17 组比较: [▽] $P < 0.05$; 与 si-circ_WBSCR17 + inhibitor-NC 组比较: [▽] $P < 0.05$

表达比较 与 NG 组比较, HG 组 HMCL 细胞中 p-JAK1/JAK1、p-STAT1/STAT1、p-STAT3/STAT3、Bax 表达升高, PCNA 表达降低 ($P < 0.05$); 与 HG 组和 si-NC 组比较, si-circ_WBSCR17 组 HMCL 细胞 p-JAK1/JAK1、p-STAT1/STAT1、p-STAT3/STAT3、Bax 表达降低, PCNA 表达升高 ($P < 0.05$); 与 si-circ_WBSCR17 组和 si-circ_WBSCR17 + inhibitor-NC 组比较, si-circ_WBSCR17 + miR-30a-5p inhibitor 组 HMCL 细胞 p-JAK1/JAK1、p-STAT1/STAT1、p-STAT3/STAT3、Bax 表达升高, PCNA 表达降低 ($P < 0.05$), 见图 2 和表 5。

2.6 各组 HMCL 细胞中纤维化相关蛋白表达比较

与 NG 组比较, HG 组 HMCL 细胞中 TGF- β 1、FN、collagenIV、 α -SMA 表达升高 ($P < 0.05$); 与 HG 组和

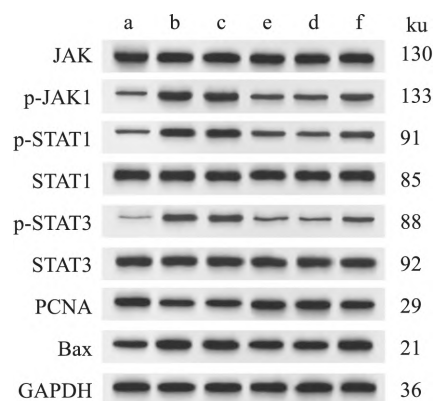


图2 Western blot 检测 HMCL 细胞中 JAK1、PCNA、Bax 蛋白表达

a: NG 组; b: HG 组; c: si-NC 组; d: si-circ_WBSCR17 组; e: si-circ_WBSCR17 + inhibitor-NC 组; f: si-circ_WBSCR17 + miR-30a-5p inhibitor 组

表5 各组 HMCL 细胞中 JAK1、PCNA、Bax 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	p-JAK1/JAK1	PCNA/GAPDH	Bax/GAPDH	p-STAT1/STAT1	p-STAT3/STAT3
NG	0.27 ± 0.02	1.15 ± 0.13	0.54 ± 0.07	0.14 ± 0.02	0.31 ± 0.03
HG	0.88 ± 0.07 [*]	0.53 ± 0.07 [*]	1.16 ± 0.11 [*]	0.79 ± 0.06 [*]	0.92 ± 0.08 [*]
si-NC	0.86 ± 0.08	0.54 ± 0.05	1.18 ± 0.12	0.80 ± 0.05	0.93 ± 0.07
si-circ_WBSCR17	0.45 ± 0.04 ^{* #}	0.89 ± 0.06 ^{* #}	0.73 ± 0.06 ^{* #}	0.27 ± 0.03 ^{* #}	0.54 ± 0.05 ^{* #}
si-circ_WBSCR17 + inhibitor-NC	0.46 ± 0.03	0.88 ± 0.04	0.74 ± 0.05	0.29 ± 0.04	0.51 ± 0.04
si-circ_WBSCR17 + miR-30a-5p inhibitor	0.63 ± 0.04 ^{& ∇}	0.71 ± 0.06 ^{& ∇}	0.95 ± 0.04 ^{& ∇}	0.46 ± 0.05 ^{& ∇}	0.75 ± 0.06 ^{& ∇}
F 值	135.562	61.762	60.939	245.353	111.437

与 NG 组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与 HG 组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与 si-NC 组比较: [#] $P < 0.05$; 与 si-circ_WBSCR17 组比较: [&] $P < 0.05$; 与 si-circ_WBSCR17 + inhibitor-NC 组比较: [∇] $P < 0.05$

表6 各组 HMCL 细胞中纤维化相关蛋白表达比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	TGF-β1/GAPDH	FN/GAPDH	collagenIV/GAPDH	α-SMA/GAPDH
NG	0.58 ± 0.07	0.37 ± 0.05	0.44 ± 0.03	0.62 ± 0.04
HG	1.25 ± 0.13 [*]	0.94 ± 0.06 [*]	0.97 ± 0.08 [*]	1.23 ± 0.07 [*]
si-NC	1.24 ± 0.11	0.93 ± 0.07	0.96 ± 0.06	1.22 ± 0.05
si-circ_WBSCR17	0.78 ± 0.06 ^{* #}	0.51 ± 0.04 ^{* #}	0.57 ± 0.05 ^{* #}	0.81 ± 0.06 ^{* #}
si-circ_WBSCR17 + inhibitor-NC	0.76 ± 0.05	0.52 ± 0.05	0.58 ± 0.04	0.82 ± 0.05
si-circ_WBSCR17 + miR-30a-5p inhibitor	0.98 ± 0.08 ^{& ∇}	0.68 ± 0.06 ^{& ∇}	0.73 ± 0.07 ^{& ∇}	1.07 ± 0.08 ^{& ∇}
F 值	58.172	106.993	86.792	103.909

与 NG 组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与 HG 组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与 si-NC 组比较: [#] $P < 0.05$; 与 si-circ_WBSCR17 组比较: [&] $P < 0.05$; 与 si-circ_WBSCR17 + inhibitor-NC 组比较: [∇] $P < 0.05$

si-NC 组比较, si-circ_WBSCR17 组 HMCL 细胞 TGF-β1、FN、collagenIV、α-SMA 表达降低($P < 0.05$); 与 si-circ_WBSCR17 组和 si-circ_WBSCR17 + inhibitor-NC 组比较, si-circ_WBSCR17 + miR-30a-5p inhibitor 组 HMCL 细胞 TGF-β1、FN、collagenIV、α-SMA 表达升高($P < 0.05$), 见图3和表6。

2.7 FISH 检测结果 通过分析 circ_WBSCR17 在 HMCL 细胞中分布, FISH 实验表明, circ_WBSCR17 主要分布在细胞质中且表达量较高, 在细胞核中表达量较低, 表明 circ_WBSCR17 在人肾小球系膜细胞中发挥 CeRNA 的作用, 见图4。

2.8 双荧光素酶报告基因检测结果 利用 Starbase 网站预测 circ_WBSCR17 与 miR-30a-5p、miR-30a-5p 与 JAK1 的结合位点, 见图5、6。与 mimic-NC 和 circ

_WBSCR17-WT 共转染组比较, miR-30a-5p mimic 和 circ_WBSCR17-WT 共转染组荧光素酶活性降低($P < 0.05$); 与 mimic-NC 和 circ_WBSCR17-MUT 共转

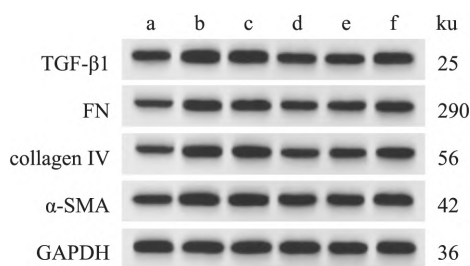


图3 Western blot 检测 HMCL 细胞中纤维化相关蛋白表达
a: NG 组; b: HG 组; c: si-NC 组; d: si-circ_WBSCR17 组; e: si-circ_WBSCR17 + inhibitor-NC 组; f: si-circ_WBSCR17 + miR-30a-5p inhibitor 组

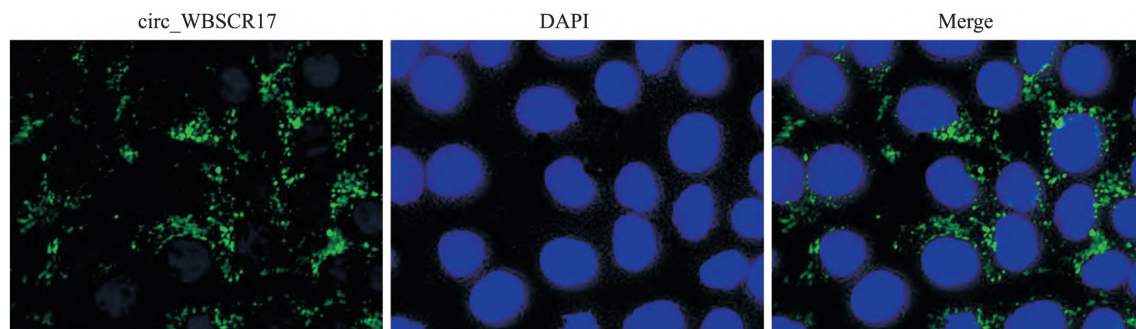


图4 circ_WBSCR17 的细胞定位 ×1 000

染组比较,miR-30a-5p mimic 和 circ_WBSCR17-MUT 共转染组荧光素酶活性差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 7。与 mimic-NC 和 JAK1-WT 共转染组比较,miR-30a-5p mimic 和 JAK1-WT 共转染组的荧光素酶活性降低 ($P < 0.05$);与 mimic-NC 和 JAK1-MUT 共转染组比较,miR-30a-5p mimic 和 JAK1-MUT 共转染组荧光素酶活性变化无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 8。



图 5 circ_WBSCR17 与 miR-30a-5p 的结合位点



图 6 miR-30a-5p 与 JAK1 的结合位点

表 7 荧光素酶活性比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	circ_WBSCR17-WT	circ_WBSCR17-MUT
mimic-NC	1.01 ± 0.13	1.03 ± 0.12
miR-30a-5p mimic	0.46 ± 0.05 [△]	1.02 ± 0.11
<i>t</i> 值	9.672	0.150
<i>P</i> 值	0	0.883

与 mimic-NC 和 circ_WBSCR17-WT 共转染组比较: [△] $P < 0.05$

表 8 荧光素酶活性比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	JAK1-WT	JAK1-MUT
mimic-NC	1.02 ± 0.06	0.99 ± 0.12
miR-30a-5p mimic	0.38 ± 0.07 [△]	1.01 ± 0.13
<i>t</i> 值	17.004	0.277
<i>P</i> 值	0	0.787

与 mimic-NC 和 JAK1-WT 共转染组比较: [△] $P < 0.05$

3 讨论

随着人们生活习惯和饮食结构的改变, DN 的发病率和病死率近年来呈上升趋势^[1]。目前 DN 的治疗主要依靠控制血糖、调节血脂、抗炎药、钙拮抗剂等药物综合治疗,但是这些药物难以预防和降低 DN 的发生率和病死率^[2]。因此,积极探索新的治疗靶点迫在眉睫。炎症是 DN 的发病机制之一,过量炎症因子的分泌可促进 DN 的进程,如 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 在 DN 的发生发展中起重要作用。肾小球硬化和肾脏间质纤维化是 DN 的主要病理特征, TGF- β 1 是 DN 肾组织形态结构调节的主要参与者,

其异常高表达是导致肾小球硬化以及肾脏纤维化病变和持续炎症的直接原因,而 FN、collagenIV、 α -SMA 是肾脏纤维化病变的主要标志物^[3]。本研究用 30 mmol/L 葡萄糖处理 HMCL 细胞,结果表明细胞增殖能力降低,炎症因子和纤维化标志因子表达升高、凋亡能力增强,提示高糖可以抑制 HMCL 细胞增殖,诱导细胞的凋亡、纤维化和炎症反应。

越来越多的研究^[4,10]表明, circRNA 是一种表达丰富,具有稳定结构等特点的非编码 RNA,其可参与到多种疾病的多种生物学过程中。研究^[11]表明, circ_0000285 通过海绵 miR-654-3p 和激活 MAPK6 促进 DN 足细胞损伤。本研究通过敲低 circ_WBSCR17 表达探究其对高糖诱导的肾小球系膜细胞的影响。结果表明,敲低 circ_WBSCR17 可使 miR-30a-5p 表达、OD₄₅₀ 值、PCNA 表达升高, TNF- α 、IL-6 和 IL-8 水平、circ_WBSCR17、JAK1、Bax、TGF- β 1、FN、collagenIV、 α -SMA 表达降低,提示敲低 circ_WBSCR17 促进高糖诱导的 HMCL 细胞增殖能力,抑制细胞凋亡、纤维化和炎症反应,这与既往研究^[3]结果一致。

circRNAs 可以通过充当分子海绵来有效抑制 miRNAs 的活性,进而调控 DN 的发生发展。如 circ-AKT3 通过调节 miR-296-3p/E-cadherin 抑制 DN 系膜细胞中的细胞外基质积聚^[12]; circSMAD4 通过缓解 miR-377-3p 介导的对 DN 进展中 BMP7 的抑制,减轻高糖诱导的小鼠肾小球系膜细胞炎症、细胞外基质沉积和凋亡^[13]。本研究通过 TargetScan 网站发现 circ_WBSCR17 与 miR-30a-5p 存在结合位点,双荧光素酶报告基因实验证实 miR-30a-5p 为 circ_WBSCR17 的靶基因。已有研究证实, miR-30a-5p 在 DN 模型大鼠中表达下调,上调 miR-30a-5p 可改善体外高糖诱导的足细胞损伤^[14]。本研究结果显示,在高糖诱导的 HMCL 细胞中敲低 circ_WBSCR17 可使 miR-30a-5p 的表达升高,推测沉默 circ_WBSCR17 对高糖诱导的 HMCL 细胞纤维化和炎症反应的影响可能与 miR-30a-5p 有关。为了验证该推测,本研究在沉默 circ_WBSCR17 的基础上再利用 miR-30a-5p inhibitor 进行干预,结果发现,沉默 circ_WBSCR17 对高糖诱导的 HMCL 细胞增殖、凋亡、纤维化和炎症反应的影响被减弱,提示沉默 circ_WBSCR17 可能通过上调 miR-30a-5p 来抑制高糖诱导的 HMCL 细胞纤维化和炎症反应。

miRNA 可通过靶向抑制其特定 mRNA 翻译或促进降解来调控基因表达,从而参与细胞增殖、凋亡

等多种生物学过程。研究^[3]表明,JAK1 在肾纤维化组织中上调,miR-30c-5p 通过下调 JAK1 表达,抑制高糖诱导的肾小管上皮细胞的上皮-间充质转化和纤维化。本研究表明,JAK1 是 miR-30a-5p 的靶标,敲低 circ_WBSCR17 可下调 JAK1 蛋白表达,下调 miR-30a-5p 减弱了敲低 circ_WBSCR17 对 JAK1 蛋白表达的抑制作用,且 miR-30a-5p 靶向负调控 JAK1 表达。

参考文献

- [1] 姜文豪,孙 艳,彭 睿,等. miR-451 通过靶向 Psmb8 抑制糖尿病肾病小鼠肾小球系膜细胞炎症反应 [J]. 中国病理生理杂志,2018,34(3):494-9.
- [2] Liang G, Song L T, Chen Z L, et al. Fibroblast growth factor 1 ameliorates diabetic nephropathy by an anti-inflammatory mechanism [J]. *Kidney Int*,2018,93(1):95-109.
- [3] Xiao D M, Yang R, Gong L, et al. Plantamajoside inhibits high glucose-induced oxidative stress, inflammation, and extracellular matrix accumulation in rat glomerular mesangial cells through the inactivation of Akt/NF- κ B pathway [J]. *J Recept Signal Transduct Res*,2021,41(1):45-52.
- [4] Peng F F, Gong W Q, Li S T, et al. circRNA_010383 acts as a sponge for miR-135a and its downregulated expression contributes to renal fibrosis in diabetic nephropathy [J]. *Diabetes*,2021,70(2):603-15.
- [5] Li G Z, Qin Y T, Qin S L, et al. Circ_WBSCR17 aggravates inflammatory responses and fibrosis by targeting miR-185-5p/SOX6 regulatory axis in high glucose-induced human kidney tubular cells - science direct [J]. *Life Sci*,2020,259:118269.
- [6] 孙 枫,王 颖. miR-132-5p 靶向 S100A9 介导高糖诱导的肾小球系膜细胞凋亡及炎症反应 [J]. 重庆医科大学学报,2022,47(6):629-34.
- [7] Yang H M, Xie T T, Li D R, et al. Tim-3 aggravates podocyte injury

in diabetic nephropathy by promoting macrophage activation *via* the NF- κ B/TNF- α pathway [J]. *Mol Metab*,2019,23:24-36.

- [8] 张楠楠,马 瑶,邓 凯,等. 两色金鸡菊黄酮提取物对高糖高脂诱导的大鼠肾小球系膜细胞纤维化的影响及相关机制研究 [J]. 中药材,2018,41(4):949-54.
- [9] Yu D, Yang X, Zhu Y, et al. Knockdown of plasmacytoma variant translocation 1 (PVT1) inhibits high glucose-induced proliferation and renal fibrosis in HRMCs by regulating miR-23b-3p/early growth response factor 1 (EGR1) [J]. *Endocr J*,2021,68(5):519-29.
- [10] Liu J, Duan P, Xu C Y, et al. CircRNA circ-ITCH improves renal inflammation and fibrosis in streptozotocin-induced diabetic mice by regulating the miR-33a-5p/SIRT6 axis [J]. *Inflamm Res*,2021,70(7):835-46.
- [11] Yao T, Zha D Q, Hu C, et al. Circ_0000285 promotes podocyte injury through sponging miR-654-3p and activating MAPK6 in diabetic nephropathy [J]. *Gene*,2020,747:144661.
- [12] Tang B, Li W L, Ji T T, et al. Circ-AKT3 inhibits the accumulation of extracellular matrix of mesangial cells in diabetic nephropathy *via* modulating miR-296-3p/E-cadherin signals [J]. *J Cell Mol Med*,2020,24(15):8779-88.
- [13] Wu R, Niu Z L, Ren G W, et al. CircSMAD4 alleviates high glucose-induced inflammation, extracellular matrix deposition and apoptosis in mouse glomerulus mesangial cells by relieving miR-377-3p-mediated BMP7 inhibition [J]. *Diabetol Metab Syndr*,2021,13(1):137.
- [14] Yang X, Yang M, Chen Y M, et al. miR-30a-5p targets Becn1 to ameliorate high-glucose-induced glomerular podocyte injury in immortalized rat podocyte cell line [J]. *Am J Transl Res*,2021,13(3):1516-25.
- [15] Gao B H, Wu H, Wang X, et al. MiR-30c-5p inhibits high glucose-induced EMT and renal fibrogenesis by down-regulation of JAK1 in diabetic nephropathy [J]. *Eur Rev Med Pharmacol*,2020,24(3):1338-49.

circ_WBSCR17 attenuates high glucose-induced fibrosis and inflammation in human mesangial cells by regulating the miR-30a-5p/JAK1 axis

Dong Haiyun¹, Han Fang¹, Qi Yizhou², Mei Feng¹

(¹Dept of Nephrology, Qinghai University Affiliated Hospital, Xining 810000;

²Oral Medicine, Haiyuan College of Kunming Medical University, Kunming 650106)

Abstract Objective To investigate the influences of circ_WBSCR17 on high glucose-induced fibrosis and inflammation in human mesangial cells by regulating the miR-30a-5p/JAK1 axis. **Methods** Human mesangial cells HMCL were grouped into: NG group (5.5 mmol/L glucose-treated HMCL cells), HG group (30 mmol/L glucose-treated cells), si-NC group (30 mmol/L glucose + transfected with si-NC), si-circ_WBSCR17 group (30 mmol/L glucose + transfected with si-circ_WBSCR17), si-circ_WBSCR17 + inhibitor-NC group (30 mmol/L glucose + (下转第 1768 页))

disease (HFMD) in Anhui province from 2015 to 2022, and to provide scientific evidence for prevention and control measures of HFMD. **Methods** The surveillance data of hand, foot and mouth disease in Anhui province from 2015 to 2022 were analyzed by descriptive epidemiology. Real-time PCR was used to detect and classify HFMD samples.

Results A total of 650 590 HFMD cases were reported in Anhui province from 2015 to 2022, including 1 406 severe cases and 17 deaths. The annual reported incidence was 131.45/100 000. The epidemic features of “low incidence in odd years and high incidence in even years” were presented from 2015 to 2019. The incidence showed a continuous decline from 2020 to 2022. The monthly distribution showed the characteristics of bimodal epidemic, and the main peak was not obvious in 2020. Hefei, Fuyang, Bozhou, Chuzhou and Suzhou ranked the top five cities in terms of cumulative incidence. The age of onset was mainly distributed in children aged 5 years and below, accounting for 89.26% of the total cases. The male to female ratio was 1.48 : 1. A total of 28 657 laboratory-confirmed cases had been reported from 2015 to 2022. EV71 cases accounted for 10.57%, Cox A16 cases accounted for 24.90%, and other enterovirus cases accounted for 64.53%. The dominant pathogens showed dynamic changes in different years. Since 2018, the proportion of EV71 decreased significantly, and the proportion of other enteroviruses gradually increased to become the dominant pathogens. Among other enteroviruses, Cox A6 strain was dominant (80.48%). **Conclusion** This study suggests that the prevention and control of HFMD in Anhui province should be paid more attention from April to July and from October to December. The focus areas are the cities in northern Anhui and Hefei where the floating population is large. The focus of prevention and control is on children aged 5 years and below. Other enteroviruses have become the dominant pathogens of hand-foot-mouth disease in Anhui province, Cox A6 strain is dominant.

Key words hand, foot and mouth disease; epidemiology; etiology

(上接第 1762 页)

co-transfected with si-circ_WBSCR17 and inhibitor-NC), and si-circ_WBSCR17 + miR-30a-5p inhibitor group (30 mmol/L glucose + co-transfected with si-circ_WBSCR17 and miR-30a-5p inhibitor); RT-qPCR was performed to detect the expression of circ_WBSCR17 and miR-30a-5p in cells; CCK-8 assay was performed to detect cell proliferation; flow cytometry was performed to detect apoptosis; ELISA was performed to detect the expression levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-6 and IL-8; Western blot was performed to detect the expression of JAK1, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), Bax, transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), fibronectin (FN), collagen IV, and α -smooth muscle actin (α -SMA); distribution of WBSCR17 was detected by fluorescence in situ hybridization (FISH); dual-luciferase reporter gene experiment was performed to verify the relationship between circ_WBSCR17 and miR-30a-5p, miR-30a-5p and JAK1, respectively. **Results** Compared with the NG group, the HMCL cell proliferation ability of the HG group decreased, the levels of TNF- α , IL-6 and IL-8, the protein expressions of p-JAK1/JAK1, p-STAT1/STAT1, p-STAT3/STAT3, TGF- β 1, FN, collagen IV and α -SMA, and the apoptosis ability increased ($P < 0.05$); compared with HG group and si-NC group, the expression of miR-30a-5p, OD₄₅₀ value and PCNA expression in HMCL cells of si-circ_WBSCR17 group increased, the levels of TNF- α , IL-6 and IL-8, the expressions of circ_WBSCR17, p-JAK1/JAK1, p-STAT1/STAT1, p-STAT3/STAT3, Bax, TGF- β 1, FN, collagen IV and α -SMA decreased ($P < 0.05$); inhibition of miR-30a-5p attenuated the promoting effect of knockdown of circ_WBSCR17 on proliferation of HMCL cells, and enhanced apoptosis, cellular fibrosis and inflammatory responses; FISH experiment confirmed that WBSCR17 was mainly distributed in the cytoplasm; dual-luciferase reporter gene experiment confirmed that circ_WBSCR17, JAK1 and miR-30a-5p had a targeted regulatory relationship. **Conclusion** Knockdown of circ_WBSCR17 can reduce high glucose-induced fibrosis and inflammation in human mesangial cells by regulating the miR-30a-5p/JAK1 axis.

Key words circ_WBSCR17; miR-30a-5p; JAK1; human mesangial cells; fibrosis; inflammatory response