

WD40 重复结构域蛋白 6 影响肾脏脂质代谢 促进糖尿病肾病进展

辛培青¹, 孙丽娜², 牛少娜³, 孙 雪⁴, 孙 雪¹

1. 山东第二医科大学临床医学院, 山东 潍坊 261000

2. 临沂市人民医院肾内科, 山东 临沂 276000

3. 临沂市人民医院内分泌代谢病科, 山东 临沂 276000

4. 临沂市人民医院病理科, 山东 临沂 276000

[摘 要] **目的:**探讨 WD40 重复结构域蛋白 6(WDR6)调控肾脏脂质代谢参与糖尿病肾病(DKD)进展的作用及机制。**方法:**选取 2015—2023 年于临沂市人民医院行肾活检的 97 例患者,分为非 DKD 组(38 例)、DKD-Ⅱ组(24 例)和 DKD-Ⅲ组(35 例)。收集患者血常规、肝功能、肾功能、糖代谢和脂质代谢相关分子等临床指标;通过肾穿刺病理结果评估肾组织损伤程度;采用免疫组织化学染色检测肾组织 WDR6 及脂肪分化相关蛋白(ADRP)的表达。利用高糖刺激人肾小管上皮(HK-2)细胞,通过油红 O 染色观察细胞脂质沉积情况,运用蛋白质印迹法和定量逆转录聚合酶链反应检测 WDR6 和脂质代谢相关分子表达,并观察转染小干扰 RNA 沉默 WDR6 对上述指标的影响。**结果:**与非 DKD 组比较,DKD-Ⅱ组和 DKD-Ⅲ组肾功能和脂质代谢相关指标显著异常,且肾组织出现不同程度损伤。WDR6 在人肾脏组织中表达,且 DKD 组肾组织中 WDR6 及 ADRP 表达均增加(均 $P<0.01$)。高糖刺激 HK-2 细胞 48 h 后脂质沉积明显,且 WDR6、ADRP、固醇调节元件结合蛋白 1、脂肪酸合成酶等蛋白及其信使 RNA 表达较空白对照组均升高(均 $P<0.01$)。沉默 WDR6 基因后,高糖诱导的脂质沉积减少,脂质代谢相关分子表达均降低(均 $P<0.05$)。**结论:**WDR6 水平升高可影响肾脏脂质代谢,从而加速 DKD 病理进展。



[关键词] 糖尿病肾病;WD40 重复结构域蛋白 6;脂质代谢;人肾小管上皮细胞

[中图分类号] R587.2 **[文献标志码]** A

WD40 repeat-containing protein 6 aggravates diabetic kidney disease by promoting lipid accumulation in kidney

收稿日期(Received):2025-08-26 修改返回日期(Revised):2025-12-04 接受日期(Accepted):2026-01-07 网络预发表日期(Online):2026-03-18

基金项目(Funding):山东第二医科大学附属医院科研发展基金(2025FYM053)

第一作者(First author):辛培青,硕士研究生,主要从事糖尿病肾病机制研究;E-mail:pei Qingxin854@163.com;ORCID:0009-0001-5338-0153

通信作者(Corresponding author):孙丽娜,副主任医师,硕士生导师,主要从事糖尿病肾病机制研究;E-mail:linasun0539@outlook.com;ORCID:0009-0006-9755-8941

XIN Peiqing¹, SUN Lina², NIU Shaona³, SUN Xue⁴, SUN Xue¹ (1. School of Clinical Medicine, Shandong Second Medical University, Weifang 261000, Shandong Province, China; 2. Department of Nephrology, Linyi People's Hospital, Linyi 276000, Shandong Province, China; 3. Department of Endocrinology and Metabolism, Linyi People's Hospital, Linyi 276000, Shandong Province, China; 4. Department of Pathology, Linyi People's Hospital, Linyi 276000, Shandong Province, China)

Corresponding author: SUN Lina, E-mail: linasun0539@outlook.com, ORCID: 0009-0006-9755-8941

[**Abstract**] **Objective:** To investigate the role and mechanism of WD40 repeat-containing protein 6 (WDR6) in the regulation of renal lipid metabolism and its involvement in the progression of diabetic kidney disease (DKD). **Methods:** A total of 97 patients who underwent renal biopsy in Linyi People's Hospital between 2015 and 2023 were enrolled. Based on pathological diagnoses, the patients were divided into three groups: non-DKD ($n=38$), DKD stage II ($n=24$), and DKD stage III ($n=35$). Clinical indicators, including complete blood count, liver and kidney function tests, and markers of glucose and lipid metabolism, were assessed. Renal tissue damage was evaluated by renal biopsy pathology. Immunohistochemistry was used to detect the expressions of WDR6 and adipose differentiation-related protein (ADRP). Human renal tubular epithelial (HK-2) cells were stimulated with high glucose, and lipid deposition was observed by oil red O staining. Protein and mRNA levels of lipid metabolism-related molecules were measured by Western blotting and qRT-PCR. Additionally, the effect of small interfering RNA-mediated WDR6 silencing on the above indicators was examined. **Results:** Compared with the non-DKD group, DKD stage II and DKD stage III groups exhibited significant abnormalities in renal function- and lipid metabolism-related parameters, along with varying degrees of renal tissue injury. WDR6 was expressed in human kidney, and its expression together with ADRP was elevated in the DKD groups (both $P<0.01$). After 48 hours of high-glucose stimulation, HK-2 cells exhibited prominent lipid deposition, accompanied by increased protein and mRNA levels of WDR6, ADRP, sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP1), and fatty acid synthase compared with the blank control group (all $P<0.01$). Silencing WDR6 reduced high glucose-induced lipid deposition and the expression of these lipid metabolism-related molecules (all $P<0.05$). **Conclusion:** Elevated WDR6 levels may affect renal lipid metabolism, thereby accelerating the pathological progression of DKD.

[**Key words**] Diabetic kidney disease; WD40 repeat-containing protein 6; Lipid metabolism; Human renal tubular epithelial cells

[J Zhejiang Univ (Med Sci), 2026, 55(5): 465-474.]

[**缩略语**] 糖尿病肾病(diabetic kidney disease, DKD); WD40 重复结构域蛋白(WD40 repeat-containing protein, WDR); 苏木精-伊红染色(hematoxylin and eosin staining, HE 染色); 过碘酸希夫染色(periodic acid-Schiff staining, PAS 染色); 二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB); 杜氏改良 Eagle 培养基(Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM); 聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR); 焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC); 脂肪分化相关蛋白(adipose differentiation-

related protein, ADRP); 脂肪酸合成酶(fatty acid synthase, FASN); 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP); 固醇调节元件结合蛋白1(sterol regulatory element-binding protein 1, SREBP1); 小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA); 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH); 肾小球滤过率估算值(estimated glomerular filtration rate, eGFR); 丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶1(serine/threonine-protein phosphatase 1, PPP1CB)

DKD是糖尿病常见的微血管并发症,是慢性肾脏病和终末期肾病的重要病因,肾小管间质损伤在疾病进展中起关键作用^[1-3]。目前,脂质代谢异常导致肾小管脂毒性损伤的机制尚未完全阐明。WDR在信号转导、细胞内转运、染色质重塑、细胞死亡、转录调控、免疫反应等多种细胞功能中发挥重要作用^[4],对维持机体稳态和正常运作至关重要,与人类神经系统疾病、癌症、肥胖、内分泌等疾病密切相关^[5]。WDR6是WDR家族成员,可促进小鼠肝脏脂肪新生,参与脂质代谢调控^[6-7]。本研究将从临床研究和细胞实验两个角度验证WDR6在肾脏脂质沉积中的作用,为靶向脂质代谢治疗DKD提供依据。

1 对象与方法

1.1 对象及分组

选择2015—2023年在临沂市人民医院行肾活检的患者。纳入标准:①2015—2023年在临沂市人民医院行肾活检,性别不限,年龄18~75岁,病理结果明确;②住院期间血脂、血糖、肾功能检查记录完整。排除标准:①病理表现为狼疮肾炎、血管炎肾损害等继发性肾病;②肾活检前三个月内服用过影响血脂的药物;③既往或目前存在恶性肿瘤、严重自身免疫病、肝脏疾病、心力衰竭、急性糖尿病并发症、其他肾脏疾病和尿路感染等;④关键临床参数缺失。最终共纳入97例患者,根据病理诊断结果和糖尿病肾小球病变病理分型标准^[8]分为非DKD组38例(IgA肾病11例、局灶节段性肾小球硬化11例、膜性肾病16例),DKD-II组24例,DKD-III组35例。

1.2 资料收集

收集各组患者肾活检时的相关信息和实验室检测结果,包括年龄、性别、血常规、尿常规、肝功能、肾功能、糖代谢和脂质代谢相关分子等。

1.3 细胞、试剂和仪器

人肾小管上皮细胞HK-2(FH0228)为中国上

海富衡生物科技有限公司产品;HE染色试剂盒(G1120)、Masson三色染色试剂盒(G1340)、糖原PAS染色试剂盒(G1281)、油红O染色试剂盒(G1262)、青链霉素混合液(P1400)、全蛋白提取试剂盒(BC3710)、甘氨酸(G8200)、5×蛋白上样缓冲液(P1040)为中国北京索莱宝科技有限公司产品;免疫组化抗原修复缓冲液(ZLI-9065)、兔二步法检测试剂盒(PV-9001)、DAB溶液(ZLI-9017)为中国北京中杉金桥生物技术有限公司产品;胎牛血清(BS-1105)为中国内蒙古金源康生物工程股份有限公司产品;DMEM/F12培养基(C11330500BT)、Opti-MEM减血清培养基(31985070)为美国Thermo Fisher Scientific公司产品;葡萄糖溶液(49163)为美国Sigma公司产品;RNA提取试剂盒(AG21023)为中国南京诺唯赞生物科技股份有限公司产品;Evo M-MLV反转录试剂预混液(AG11706)、SYBR Green Pro Taq HS预混型qPCR试剂盒(AG11701)为美国APEX BIO公司产品;Lipo8000™转染试剂(C0533)、Western一抗稀释液(P0023A)、Western二抗稀释液(P0023D)、DEPC水(R0021)为中国上海碧云天生物技术有限公司产品;WDR6兔多克隆抗体(A7780)为中国爱博泰克生物科技股份有限公司产品;抗ADRP抗体(DF7603)、抗FASN抗体(DF6106)、HRP标记羊抗鼠二抗(S0002)、HRP标记羊抗兔二抗(S0001)为中国亲科生物研究中心有限公司产品;SREBP1抗体(66875-1-Ig)为中国武汉三鹰生物技术有限公司产品。定量逆转录PCR所用引物由中国湖南艾科瑞生物工程有限公司合成,靶向WDR6基因的siRNA(siWDR6)由通用生物(安徽)股份有限公司合成。

二氧化碳培养箱(371)、实时荧光定量PCR仪(7500)为美国Thermo Fisher Scientific公司产品;多功能酶标仪(SpECTRAMAX-M5)为美谷分子仪器(上海)有限公司产品;光学生物显微镜(CKX53)为日本奥林巴斯株式会社产品;倒置显微镜(BX53/DP74)为日本尼康株式会社产品;电泳仪

(Pa300型)为美国Bio-Rad公司产品;漩涡混匀器(VORTEX-5)、掌中宝离心机(LX800)为中国海门市其林贝尔仪器制造有限公司产品;化学发光成像仪(FlourChem E)为美国ProteinSimple公司产品。

1.4 HE染色、Masson染色和PAS染色观察患者肾活检组织病理学改变

取患者肾脏组织固定在4%多聚甲醛中24 h,常规石蜡包埋,切片,放入二甲苯并进行浓度梯度乙醇脱蜡后,按照试剂盒说明书对肾组织进行HE染色、PAS染色和Masson染色等。

1.5 免疫组织化学染色观察患者肾活检组织WDR6和ADRP蛋白表达

将石蜡包埋好的肾脏切片置于100℃下烤20 min,经二甲苯和不同浓度梯度的乙醇脱蜡和脱水。将切片浸泡于免疫组织化学抗原修复缓冲液(pH值为6.0)中进行抗原修复。将切片与WDR6、ADRP抗体(1:100)在4℃下孵育过夜,加入强化剂后于37℃下孵育20 min,再与相应二抗在37℃恒温箱中孵育20 min。用DAB溶液显色,苏木精复染后,切片脱水并用树脂封片,在光学显微镜下观察并拍照分析。

1.6 HK-2细胞培养及处理

HK-2细胞在由双抗、10%胎牛血清、DMEM/F12培养基配制的完全培养基中,于37℃、含5%二氧化碳的加湿培养箱中培养24 h。取生长状态良好的HK-2细胞,消化后接种于洁净的六孔板中。细胞汇合度达到80%时进行siRNA转染。转染前将六孔板内细胞液换为2 mL新鲜完全培养基。取一个洁净无菌离心管,加入125 μL Opti-MEM减血清培养基和100 pmol siRNA,轻轻吹打混匀;再加入4 μL Lipo8000转染试剂,轻轻吹打混匀,并置于室温孵育20 min。将上述复合物均匀滴加到六孔板内,轻轻晃动使培养基与复合物充分混匀。置于培养箱中4~6 h后更换新鲜完全培养基,培养24~48 h后检测转染效率。

将HK-2细胞分为空白对照组、高糖模型组和siWDR6组。空白对照组用低糖溶液(5.5 mmol/L)培养48 h;高糖模型组用高糖溶液(30 mmol/L)培养48 h;siWDR6组先用siWDR6转染4~6 h,再用高糖溶液(30 mmol/L)培养48 h。

1.7 油红O染色观察HK-2细胞脂质沉积

取培养好的HK-2细胞,弃培养基,用磷酸盐缓冲液轻柔清洗,加入1 mL油红O固定液固定;经蒸馏水清洗两次及60%异丙醇浸洗后,加入1 mL新鲜配制的油红O染色液(油红B1染液与油红B2染液按3:2比例混合)浸染20 min。弃染色液,用60%异丙醇漂洗至间质清晰,再用蒸馏水清洗至无多余染液脱出。随后用苏木素进行细胞核染色,蒸馏水清洗后加入1 mL油红O缓冲液孵育返蓝,静置1 min后弃染色液。最后加入蒸馏水覆盖细胞,于倒置显微镜下观察并拍照。

1.8 定量逆转录PCR测定HK-2细胞脂质代谢相关基因表达

消化并收集各组细胞沉淀,使用快速RNA提取试剂盒提取RNA,测定浓度后逆转录为互补DNA。以互补DNA为模板,按说明书配制PCR反应体系。将反应体系瞬时离心后置于实时荧光定量PCR仪中,反应程序:保温阶段(95℃ 30 min);循环阶段(95℃ 5 min,60℃ 30 min);熔解曲线阶段(60℃ 60 min,95℃ 30 min,60℃ 15 min)。每组设置三个复孔,以GAPDH作为内参,采用2^{-ΔΔCt}法进行归一化处理。引物序列见表1。

1.9 蛋白质印迹法测定HK-2细胞脂质代谢相关蛋白质表达

将处理后的各组细胞消化并收集沉淀,加入适量含磷酸酶抑制剂、蛋白酶抑制剂及苯甲基磺酰氟的RIPA裂解缓冲液,充分混合后置于4℃冰箱内振荡裂解30 min。离心机提前预冷,随后将裂解后的细胞悬液以12 000×g、4℃离心30 min。吸取上清液。使用酶标仪测定各样品在562 nm波长处的吸光度,根据标准品的浓度和吸光度绘制标准曲线,计算各组蛋白质浓度。确定上样蛋白质质量及上样总体积后,计算所需蛋白质样品、5×蛋

表1 各目的基因引物序列
Table 1 Primer sequences for target genes

基 因	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
GAPDH	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	TGGTGAAGACGCCAGTGGA
WDR6	ATAAGCGATGTGTCTCTCAAGGT	CAGTGGAGTCATGGTCTAGCA
ADRP	GGCAGAGAACGGTGTGAAGAC	TTACAGGCATAGGTATTGGCAAAT
SREBP1	CAACACAGCAACCAGAAACTCAA	GTCTCCACCTCAGTCTTCAC
FASN	CACCTATGAAGCCATCGTGGA	AGAAGAAGGAGAGCCGGTTG

GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶;WDR6:WD40重复结构域蛋白6;ADRP:脂肪分化相关蛋白;SREBP1:固醇调节元件结合蛋白1;FASN:脂肪酸合成酶。

白质上样缓冲液及DEPC水的体积,混合后煮沸变性蛋白质。随后使用Tris-甘氨酸电泳缓冲液进行电泳。电泳结束后,于250 mA恒流条件下转膜50 min,将蛋白质转移至聚偏二氟乙烯膜上。将膜与一抗于4℃下孵育过夜,次日使用对应二抗室温孵育1 h。最后,通过化学发光成像仪检测目的条带及内参,并使用ImageJ软件进行半定量分析。

1.10 统计学方法

使用SPSS 25.0和Graphpad Prism 10.1.2软件进行统计分析。所有数据均来自至少三组独立实验,符合正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组

间两两比较采用Scheffe法;非正态分布的资料以中位数(上下四分位数)[$M(Q_1, Q_3)$]表示,多组间比较采用Kruskal-Wallis检验,组间两两比较采用Bonfferoni法;计数资料以例数(百分比)[$n(\%)$]表示,组间比较采用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 DKD患者临床指标变化

与非DKD组比较,DKD-Ⅱ组和DKD-Ⅲ组肾功能损伤及脂质代谢指标显著异常,见表2。结果提示,DKD患者相比非DKD患者肾脏损伤更严重,脂质代谢紊乱更显著。

表2 各组一般资料及实验室检测结果比较
Table 2 Comparison of clinical data and laboratory test results among groups

[$\bar{x}\pm s$ 或 $n(\%)$ 或 $M(Q_1, Q_3)$]								
组 别	n	年龄 (岁)	男性	血红蛋白 (g/L)	白细胞 ($\times 10^9/L$)	尿素 (mmol/L)	血肌酐 ($\mu\text{mol/L}$)	血尿酸 ($\mu\text{mol/L}$)
非DKD组	38	50 $\pm$ 10	25 (65.79)	143.50 (123.75, 151.25)	7.52 (5.61, 9.43)	6.05 (4.59, 7.87)	68.95 (52.93, 106.00)	367.45 $\pm$ 105.60
DKD-Ⅱ组	24	53 $\pm$ 11	18 (75.00)	137.00 (124.75, 150.00)	7.61 (5.90, 8.71)	6.50 (4.83, 7.82)	74.25 (55.25, 119.50)	336.30 $\pm$ 64.85
DKD-Ⅲ组	35	49 $\pm$ 8	23 (65.71)	111.00 (97.00, 134.00)***	6.88 (5.56, 8.41)	8.80 (7.47, 12.14)**	106.00 (72.90, 119.00)*	370.77 $\pm$ 89.65
$F/\chi^2/H$ 值	—	1.50	0.71	21.46	0.96	15.41	6.07	1.18
P 值	—	>0.05	>0.05	<0.01	>0.05	<0.01	<0.05	>0.05
组 别	n	eGFR [$\text{mL}/(\text{min}\cdot 1.73\text{m}^2)$]	尿蛋白(mg/24 h)	总蛋白 (g/L)	白蛋白 (g/L)	球蛋白 (g/L)	空腹血糖 (mmol/L)	
非DKD组	38	106.84 (64.31, 157.08)	928.65 (431.95, 2425.35)	59.85 (53.45, 68.08)	35.40 (28.35, 40.93)	26.31 $\pm$ 5.29	6.85 (5.79, 8.54)	
DKD-Ⅱ组	24	96.98 (61.99, 126.36)	3402.95 (2305.90, 7459.38)**	50.40 (43.83, 61.55)*	29.45 (23.33, 39.73)	22.55 $\pm$ 4.85*	7.38 (5.45, 9.35)	
DKD-Ⅲ组	35	68.77 (53.46, 95.70)*	6010.00 (3582.20, 9033.80)**	49.80 (46.90, 56.80)**	27.20 (23.70, 30.90)**	23.42 $\pm$ 4.07*	6.77 (5.80, 10.40)	
$F/\chi^2/H$ 值	—	6.63	42.75	15.14	11.35	5.58	0.49	
P 值	—	<0.05	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	>0.05	
组 别	n	甘油三酯 (mmol/L)	总胆固醇 (mmol/L)	高密度脂蛋白 胆固醇(mmol/L)	低密度脂蛋白 胆固醇(mmol/L)	α -脂蛋白 (mg/L)	TyG 指数	
非DKD组	38	1.77 (1.37, 3.24)	5.27 (4.38, 6.03)	1.09 (0.96, 1.43)	3.27 (2.67, 3.75)	165.65 (53.15, 484.63)	9.21 (8.85, 9.86)	
DKD-Ⅱ组	24	2.09 (1.72, 3.16)	6.04 (4.72, 7.59)	1.11 (0.91, 1.59)	4.27 (2.97, 5.24)*	477.55 (97.63, 952.98)	9.47 (9.10, 9.90)	
DKD-Ⅲ组	35	1.84 (1.36, 2.43)	6.70 (5.38, 8.74)**	1.15 (0.93, 1.49)	4.16 (3.20, 5.94)**	389.50 (194.60, 1001.00)*	9.31 (8.97, 9.73)	
$F/\chi^2/H$ 值	—	2.51	11.99	0.10	15.29	8.34	1.95	
P 值	—	>0.05	<0.01	>0.05	<0.01	<0.05	>0.05	

—:无相关数据. 与非DKD组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与DKD-Ⅱ组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$. DKD:糖尿病肾病; eGFR:肾小球滤过率估算值; TyG指数:甘油三酯-葡萄糖指数.

2.2 DKD患者肾组织病理变化

非DKD组肾小球系膜区无明显增殖,系膜基质无扩大,内皮细胞无增生;肾小球毛细血管壁略显增厚,节段皱缩,部分肾小球查见局灶节段性硬化改变。DKD-II组肾组织HE染色表现为肾小球系膜区轻度节段增殖,系膜基质节段性扩大,肾小管灶状萎缩;PAS染色显示肾小球存在局灶节段性硬化;Masson染色显示肾间质灶性水肿、纤维化,多灶性淋巴细胞及单核细胞浸润,但未见明显嗜复红蛋白沉积。DKD-III组肾组织HE染色显示肾小球系膜区弥漫性增殖,系膜基质弥漫扩大,内皮细胞肿胀,肾小管萎缩,肾小管上皮细胞肿胀,空泡变性,可见少量蛋白管型,肾间质灶性水肿、纤维化;PAS染色显示K-W结节形成;Masson染色显示散在嗜复红蛋白沉积,间质内小动脉、细动脉节段增厚,玻璃样变性。见图1。结果提示DKD可造成患者肾组织不同程度损伤且DKD-III组病变普遍重于DKD-II组。

2.3 DKD患者肾组织中WDR6和ADRP表达增加

与非DKD组比较,DKD-II组和DKD-III组肾组织中WDR6、ADRP表达均增加,且DKD-III组

WDR6、ADRP表达水平高于DKD-II组(图2和表3),提示DKD可能促使患者肾组织WDR6和ADRP表达增加。

2.4 高糖诱导增加HK-2细胞脂质沉积

HK-2细胞用高糖分别刺激0、24、48、72 h,结果显示高糖刺激48 h后细胞内脂滴形成最为明显(附图1),WDR6在48和72 h升高明显,ADRP在48 h升高最显著(附图2和附表1),因此确定高糖诱导时间为48 h。油红O染色结果显示,高糖模型组脂质沉积较空白对照组明显增多(图3),且WDR6、ADRP、SREBP1、FASN蛋白表达及mRNA表达显著增加(图4和表4)。结果提示,高糖环境促进HK-2细胞WDR6表达和脂质沉积。

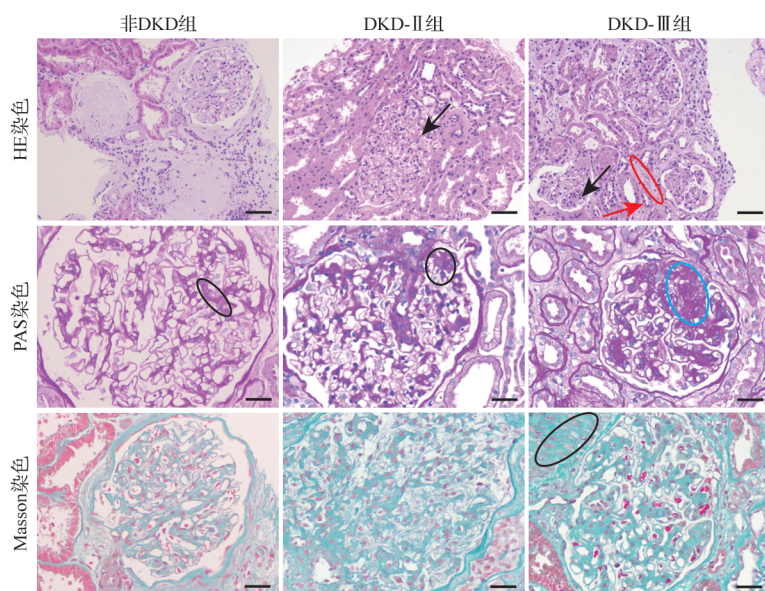
2.5 WDR6影响肾小管细胞脂质代谢

siWDR6转染后细胞中WDR6蛋白和mRNA表达显著减少(均 $P<0.01$),见附图3和附表2。在高糖刺激下,siWDR6组细胞中脂质沉积较前减少(图5),且细胞中ADRP、SREBP1蛋白和mRNA表达减少,FASN的mRNA表达减弱(图6和表5)。进一步证实WDR6影响肾小管细胞脂质代谢。

3 讨论

DKD作为糖尿病的微血管并发症之一,其进展与肾小管损伤密切相关。研究表明,脂质代谢异常导致的脂毒性是介导肾小管损伤的关键机制^[9]。本文资料通过临床样本分析和细胞实验发现,WDR6可能通过促进肾脏脂质异常沉积加速DKD疾病进展。

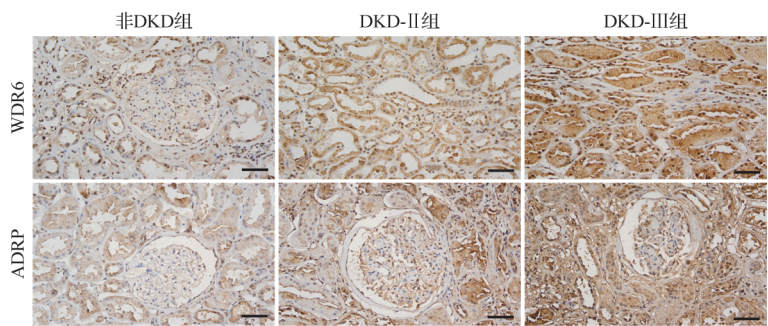
糖尿病患者血脂异常是肾脏疾病进展和心血管相关死亡的可逆危险因素^[10]。持续高血糖状态驱动脂肪酸合成增多和胆固醇累积,导致血清游离脂肪酸和胆固醇水平升高。这些脂质成分在包括肾脏、胰腺、心脏、肝脏和血管壁等非脂肪组织中异常积聚,引发脂毒性。既往研究表明,脂质代谢紊乱(如高脂血症和



非DKD组部分肾小球可见局灶节段性硬化(黑色圆圈所示);DKD-II组肾小球系膜区轻度节段增殖,系膜基质节段性扩大(黑色箭头所指),肾小球查见局灶节段性硬化(黑色圆圈所示);DKD-III组患者肾小球系膜区弥漫性增殖,系膜基质弥漫扩大(黑色箭头所指),肾小管萎缩(红色箭头所指),肾间质灶性水肿、纤维化(红色圆圈所示),K-W结节形成(蓝色圆圈所示),细动脉节段增厚(黑色圆圈所示)。HE染色图片标尺=200 μm ,PAS染色和Masson染色图片标尺=100 μm 。DKD:糖尿病肾病;HE染色:苏木精-伊红染色;PAS染色:过碘酸希夫染色。

图1 各组肾组织HE、PAS、Masson染色结果

Figure 1 HE, PAS, and Masson staining results of renal tissue in each group



免疫组织化学阳性表达区域呈现棕色,非DKD组肾组织染色程度较弱,WDR6和ADRP表达相对较少;DKD-II组和DKD-III组肾组织染色程度较非DKD组增强,WDR6和ADRP表达较非DKD组增加,其中DKD-III组增加更为显著.标尺=50 μm. DKD:糖尿病肾病;WDR6:WD40重复结构域蛋白6;ADRP:脂肪分化相关蛋白.

图2 各组肾组织免疫组织化学染色图

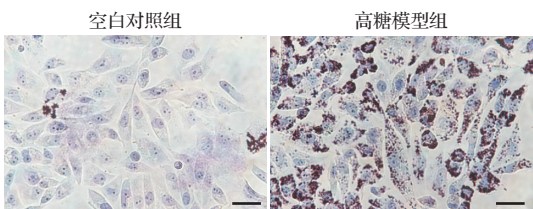
Figure 2 Immunohistochemical staining of renal tissue in each group

表3 各组肾组织中WDR6和ADRP表达水平比较

Table 3 Comparison of WDR6 and ADRP expression levels in renal tissue among groups

($\bar{x}\pm s$)			
组别	n	WDR6	ADRP
非DKD组	38	18.15±2.25	19.33±2.01
DKD-II组	24	28.26±2.32**	27.51±1.98**
DKD-III组	35	29.27±2.27**	35.03±2.53***
F值	—	258.73	462.13
P值	—	P<0.01	P<0.01

—:无相关数据.与非DKD组比较,**P<0.01;与DKD-II组比较,***P<0.01. DKD:糖尿病肾病;WDR6:WD40重复结构域蛋白6;ADRP:脂肪分化相关蛋白.



与空白对照组比较,高糖模型组脂质沉积更为显著.标尺=50 μm.

图3 高糖刺激48 h后HK-2细胞中脂质沉积情况(油红O染色)

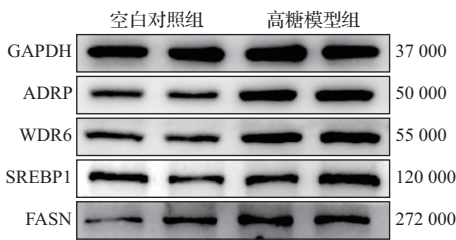
Figure 3 Lipid accumulation in HK-2 cells after high glucose stimulation for 48 h (oil red O staining)

肾异位脂质沉积)在DKD发生和发展中起重要作用^[11-12]。肾组织内过量堆积的脂质及其衍生物可激活包括氧化应激、炎症反应、纤维化和细胞凋亡在内的多条信号通路,最终导致肾实质细胞损伤和功能丧失^[13-14]。

由于临床上DKD-I型和IV型患者较少进行肾活检,本文资料纳入更具代表性的DKD-II型和

III型患者。通过对比非DKD与DKD患者的临床数据发现,DKD患者在血红蛋白、尿蛋白、血清蛋白及肾功能指标(血肌酐、尿素、eGFR)方面均呈现显著异常。从疾病进程来看,DKD早期以蛋白尿为主要表现,eGFR尚未显著下降;随着病情进展,血肌酐和尿素水平升高,eGFR急剧降低,肾功能迅速减退,继续进展可出现肾功能衰竭。在脂质代谢方面,DKD患者同样呈现显著紊乱,其总胆固醇、低密度脂蛋白胆

固醇及α-脂蛋白水平均显著高于非DKD患者,且DKD-III患者总胆固醇水平高于DKD-II患者。尽管非DKD组与DKD组在甘油三酯、高密度脂蛋白胆固醇等指标上差异无统计学意义(可能受患者个体生活方式、饮食习惯、体育锻炼及病程长短等影响),但总体而言,两组在脂质代谢相关分子上存在明显差异。以上结果证明,DKD患者存在系统性脂质代谢紊乱,且其程度与肾脏损伤程度呈正相关,为脂毒性加速DKD进展提供了临床证据。临床数据揭示,DKD早期患者已出现显著脂质代谢紊乱,但肾脏功能仍处于代偿期,及时干预脂毒性微环境可能可以通过抑制肾小管脂质沉积来阻断疾病向终末期进展,从而改善患者长期预后^[15]。组织病理学结果进一步印证了上述观点。DKD患者肾组织存在不同程度损伤,具体表现为肾小球系膜区增生、系膜基质扩张、肾小管萎缩以及肾小



GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶;ADRP:脂肪分化相关蛋白;WDR6:WD40重复结构域蛋白6;SREBP1:固醇调节元件结合蛋白1;FASN:脂肪酸合成酶.

图4 高糖刺激48 h后HK-2细胞中WDR6和脂质代谢相关蛋白质表达电泳图

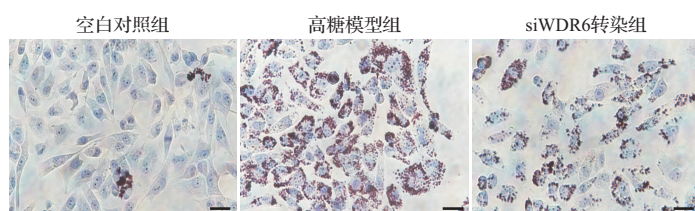
Figure 4 Electrophoresis of WDR6 and lipid metabolism-related protein expression in HK-2 cells after high glucose stimulation for 48 h

表4 高糖刺激48 h后HK-2细胞中WDR6及脂质代谢相关蛋白质及其mRNA表达水平比较**Table 4** WDR6 and lipid metabolism-related protein and mRNA expression levels in HK-2 cells after high glucose stimulation for 48 h
($\bar{x} \pm s, n=6$)

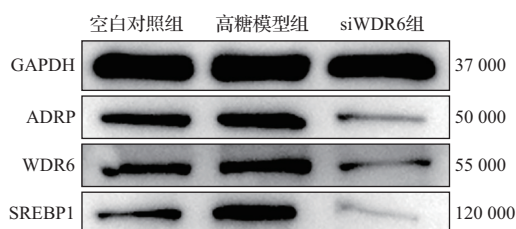
组别	WDR6		ADRP	
	蛋白质	mRNA	蛋白质	mRNA
空白对照组	1.00±0.22	1.00±0.03	1.00±0.35	1.00±0.05
高糖模型组	1.61±0.12**	1.19±0.04**	2.01±0.20**	1.21±0.05**

组别	SREBP1		FASN	
	蛋白质	mRNA	蛋白质	mRNA
空白对照组	1.00±0.16	1.00±0.03	1.00±0.43	1.00±0.04
高糖模型组	1.59±0.17**	1.26±0.10**	2.55±0.34**	1.20±0.03**

与空白对照组比较,** $P<0.01$ 。WDR6:WD40重复结构域蛋白6;ADRP:脂肪分化相关蛋白;SREBP1:固醇调节元件结合蛋白1;FASN:脂肪酸合成酶;mRNA:信使RNA。



与高糖模型组比较,siWDR6转染组HK-2细胞脂质沉积显著减少,标尺=50 μm 。siWDR6:靶向WDR6的小干扰RNA。

图5 siWDR6转染后高糖刺激48 h的HK-2细胞中脂质沉积情况(油红O染色)**Figure 5** Lipid accumulation in HK-2 cells stimulated with high glucose for 48 h after siWDR6 transfection (oil red O staining)

GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶;WDR6:WD40重复结构域蛋白6;ADRP:脂肪分化相关蛋白;SREBP1:固醇调节元件结合蛋白1;siWDR6:靶向WDR6的小干扰RNA。

图6 siWDR6转染后高糖刺激48 h的HK-2细胞中WDR6及脂质代谢相关蛋白质表达电泳图**Figure 6** Electrophoresis of WDR6 and lipid metabolism-associated proteins expression in HK-2 cells stimulated with high glucose for 48 h after siWDR6 transfection

管上皮细胞肿胀伴空泡变性,符合DKD典型病变特征^[16]。上述临床与病理结果相互印证,共同揭示了DKD状态下肾脏存在脂质代谢失衡。

WDR6与肿瘤的发生发展密切相关,研究显示其可能通过调节肿瘤免疫微环境促进肝细胞癌

发生发展^[17]。另有研究发现,WDR6在胰岛素抵抗过程中促进肝脏新生脂肪合成。WDR6在高脂饮食诱导的胰岛素抵抗期间表达上调,随后通过与PPP1CB相互作用,促进PPP1CB去磷酸化,进而增强脂肪酸合成酶转录,促进肝脏新生脂肪生成^[7]。本文资料通过免疫组织化学分析比较各组患者肾组织发现,DKD患者肾小管上皮细胞中WDR6表达显著上调,脂质代谢关键标志物ADRP表达在DKD患者肾小管中也呈现显著上调,且WDR6与ADRP表达水平均随DKD病理分型加重而呈现递增趋势。ADRP是包裹脂滴表面、调控脂滴形成和稳定的关键蛋白质,其表达水平与脂质积累程度有关^[18],可作为脂质沉积的特异性标志物^[19]。本文资料提示,WDR6可能通过上调ADRP表达促进肾小管上皮细胞内脂滴形成和积聚,从而形成“脂质蓄积-肾小管损伤-功能障碍”恶性循环。为深入验证WDR6对肾小管脂质代谢的作用,本文资料利用HK-2细胞构建体外模型。在高糖刺激下,HK-2细胞

胞内脂质沉积显著增加,且WDR6及脂质代谢相关蛋白质表达明显增加。使用siRNA特异性沉默WDR6表达后,高糖诱导的细胞脂质沉积显著减少。蛋白质印迹法和定量逆转录PCR检测结果也显示,在高糖刺激下,细胞中深度参与脂质代谢过程的脂肪细胞分化及脂滴形成相关蛋白ADRP、SREBP1^[20]和FASN^[21]表达均显著上调,而沉默WDR6基因后,ADRP、SREBP1和FASN在高糖刺激下的异常高表达均受到明显抑制,进一步证实WDR6可能通过信号通路调控ADRP、SREBP1、FASN等脂质代谢相关分子,从而影响肾脏脂质代谢,促进糖尿病肾病进展。体外实验结果与临床观察高度一致,证实了WDR6在肾脏脂质代谢调控中的重要地位,其介导了高糖环境下肾脏脂质合成和沉积的关键过程。

本文资料通过多维度证据链表明,WDR6促进肾脏脂质沉积,进而加重DKD进展。这一发现不仅拓展了WDR家族在代谢疾病中的功能认

表 5 siWDR6 转染后高糖刺激 48 h 的 HK-2 细胞中 WDR6 及脂质代谢相关蛋白质及 mRNA 表达水平比较

Table 5 Comparison of WDR6 and lipid metabolism-associated proteins and mRNA expression in HK-2 cells stimulated with high glucose for 48 h after siWDR6 transfection
($\bar{x}\pm s, n=6$)

组 别	WDR6		ADRP	
	蛋白质	mRNA	蛋白质	mRNA
空白对照组	1.00±0.05	1.00±0.00	1.00±0.16	1.00±0.00
高糖模型组	1.46±0.12*	1.30±0.12**	1.59±0.09**	1.37±0.02**
siWDR6 组	0.72±0.18##	0.67±0.05##	0.94±0.35##	0.47±0.02##

组 别	SREBP1		FASN mRNA
	蛋白质	mRNA	
空白对照组	1.00±0.24	1.00±0.00	1.00±0.00
高糖模型组	1.58±0.08**	1.45±0.05**	1.20±0.04**
siWDR6 组	0.88±0.22##	0.88±0.09##	0.78±0.09##

与空白对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与高糖模型组比较, ## $P<0.01$.
siWDR6: 靶向 WDR6 的小干扰 RNA; WDR6: WD40 重复结构域蛋白 6;
mRNA: 信使 RNA; ADRP: 脂肪分化相关蛋白; SREBP1: 固醇调节元件结合蛋白 1; FASN: 脂肪酸合成酶.

知,也为 DKD 治疗提供了潜在靶点,针对 WDR6 的小分子抑制剂或基因沉默策略可能成为干预 DKD 的新策略。但是,WDR6 的具体作用机制及其通路尚未明确,后续将进行动物实验探索,为 DKD 治疗提供更精确靶点。

本文附加文件见电子版。



志谢 本研究得到山东第二医科大学附属医院科研发展基金(2025FYM053)资助

Acknowledgements This study was supported by Shandong Second Medical University Affiliated Hospital Scientific Research Development Fund (2025FYM053)

作者贡献 辛培青、孙丽娜、牛少娜、孙雪和孙雪参与论文选题和设计或参与资料获取、分析或解释,起草研究论文或修改重要智力性内容。所有作者均已阅读并认可最终稿件,并对数据的完整性和安全性负责。具体见电子版

Author Contributions XIN Peiqing, SUN Lina, NIU Shaona, SUN Xue and SUN Xue participated in brewing and designing experiments, or acquisition, analysis, or interpretation of data for the work; drafting the work, or revising it critically for important intellectual content. All authors have read and approved the final manuscript, and take responsibility for the integrity and security of the data. See the electronic

version for details

数据可用性 本研究的相关数据可根据合理请求从通信作者(E-mail: linasun0539@outlook.com)处获得

Data Availability All relevant data supporting the findings of this study can be accessed upon reasonable request from the corresponding author at linasun0539@outlook.com

医学伦理 本研究通过临沂市人民医院伦理委员会审查(202409-H-030)并符合 1964 年《赫尔辛基宣言》及之后的修订版或类似的伦理标准。本研究豁免患者知情同意

Ethical Approval All procedures performed in this study involving human participants were in accordance with the ethical standards of Linyi People’s Hospital (202409-H-030), and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. The exemption from informed consent for this study was approved

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

Conflict of Interests The authors declare that there is no conflict of interests

©The author(s) 2026. This is an open access article under the CC BY-NC-ND 4.0 license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

参考文献(References)

[1] PENG Q Y, AN Y, JIANG Z Z, et al. The role of immune cells in DKD: mechanisms and targeted therapies[J]. **J Inflamm Res**, 2024, 17: 2103-2118.

[2] SCILLETTA S, DI MARCO M, MIANO N, et al. Update on diabetic kidney disease (DKD): focus on non-albuminuric DKD and cardiovascular risk[J]. **Biomolecules**, 2023, 13(5): 752.

[3] ZHOU X, XU C, DONG J, et al. Role of renal tubular programmed cell death in diabetic kidney disease[J/OL]. **Diabetes Metab Res Rev**, 2023, 39(2): e3596.

[4] JAIN B P, PANDEY S. WD40 repeat proteins: signalling scaffold with diverse functions[J]. **Protein J**, 2018, 37(5): 391-406.

[5] KIM Y, KIM S H. WD40-repeat proteins in ciliopathies and congenital disorders of endocrine system[J]. **Endocrinol Metab**, 2020, 35(3): 494-506.

[6] LV M. WD repeat domain 6 as a novelty prognostic biomarker correlates with immune infiltration in lung cancer: a preliminary study[J/OL]. **Immun Inflamm**

- Dis, 2022, 10(9): e681.
- [7] YAO Z, GONG Y, CHEN W, et al. Upregulation of WDR6 drives hepatic *de novo* lipogenesis in insulin resistance in mice[J]. **Nat Metab**, 2023, 5(10): 1706-1725.
- [8] TERVAERT T W C, MOOYAART A L, AMANN K, et al. Pathologic classification of diabetic nephropathy [J]. **J Am Soc Nephrol**, 2010, 21(4): 556-563.
- [9] CHEN X, ZHU S, HUANG C, et al. Bioinformatic analyses reveal lysosomal-associated protein transmembrane 5 as a potential therapeutic target in lipotoxicity-induced injury in diabetic kidney disease[J]. **Ren Fail**, 2024, 46(2): 2359638.
- [10] RICCIARDI C A, GNUDI L. Kidney disease in diabetes: from mechanisms to clinical presentation and treatment strategies[J]. **Metabolism**, 2021, 124: 154890.
- [11] OPAZO-RÍOS L, MAS S, MARÍN-ROYO G, et al. Lipotoxicity and diabetic nephropathy: novel mechanistic insights and therapeutic opportunities[J]. **Int J Mol Sci**, 2020, 21(7): 2632.
- [12] HAN Y Z, DU B X, ZHU X Y, et al. Lipid metabolism disorder in diabetic kidney disease[J]. **Front Endocrinol**, 2024, 15: 1336402.
- [13] TUTTLE K R, AGARWAL R, ALPERS C E, et al. Molecular mechanisms and therapeutic targets for diabetic kidney disease[J]. **Kidney Int**, 2022, 102(2): 248-260.
- [14] YANG M, GENG C A, LIU X, et al. Lipid disorders in NAFLD and chronic kidney disease[J]. **Biomedicines**, 2021, 9(10): 1405.
- [15] CHAE S Y, KIM Y, PARK C W. Oxidative stress induced by lipotoxicity and renal hypoxia in diabetic kidney disease and possible therapeutic interventions: targeting the lipid metabolism and hypoxia[J]. **Antioxidants**, 2023, 12(12): 2083.
- [16] THOMAS M C, BROWNLEE M, SUSZTAK K, et al. Diabetic kidney disease[J]. **Nat Rev Dis Primers**, 2015, 1: 15018.
- [17] ZHANG H, CHEN G, FENG X, et al. Targeting WDR motif reprograms immune microenvironment and inhibits hepatocellular carcinoma progression[J/OL]. **EMBO Mol Med**, 2023, 15(5): e15924.
- [18] LIU S, DA J, YU J, et al. Renal tubule ectopic lipid deposition in diabetic kidney disease rat model and *in vitro* mechanism of leptin intervention[J]. **J Physiol Biochem**, 2022, 78(2): 389-399.
- [19] LI F Z, FANG S. Adipophilin: roles in physiology and pathology[J]. **J Clin Pathol**, 2023, 76(2): 98-102.
- [20] NAKAGAWA H. Lipogenesis and MASLD: re-thinking the role of SREBPs[J]. **Arch Toxicol**, 2025, 99(6): 2299-2312.
- [21] ZHANG Q, XIAO X, LI M, et al. Bailing capsule (*Cordyceps sinensis*) ameliorates renal triglyceride accumulation through the PPAR α pathway in diabetic rats [J]. **Front Pharmacol**, 2022, 13: 915592.

[本文编辑 余方 刘丽娜]

· 学术动态 ·

杨仕贵教授团队解析甲型 H7 禽流感病毒全球传播驱动因素和宿主介导的全球传播机制

2026年5月6日,浙江大学公共卫生学院杨仕贵教授团队在《自然·通讯》(*Nature Communications*)发表题为“Disentangling the drivers and host-mediated global spread of H7 influenza A virus”的研究论文(DOI:10.1038/s41467-026-72718-9),系统揭示了甲型H7禽流感病毒的全球活动特征及其宿主介导机制和生态-社会驱动因素,为禽流感跨物种传播风险预测及基于同一健康(One Health)理念的精准防控提供了重要依据。

研究人员采用系统发育动力学模型和空间传播模型,结合全球甲型H7禽流感病毒的基因序列和流行病学数据,系统解析了病毒的进化动态、空间传播路径及宿主特异性作用。全球H7亚型禽流感暴发疫情主要出现三个高峰,分别是在2013—2014年、2016—2017年和2023年。甲型H7禽流感病毒可分为欧亚谱系和美洲谱系,两者约在20世纪40年代开始分化,并在不同区域持续演化。欧亚谱系扩散更快,扩散速度约为661公里/年,接近美洲谱系354公里/年的两倍。雁形目包括鸭、鹅、天鹅等水禽更像是甲型H7禽流感病毒远距离传播的“搬运者”,其介导的病毒扩散速度高达587公里/年,因此,雁形目是推动病毒跨区域、跨洲传播的重要力量。然而,鸡形目如鸡、火鸡、鹌鹑等是甲型H7禽流感病毒传播中的“区域放大器”。鸡形目整体传播速度仅为294公里/年,其中养殖鸡形目为216公里/年,野生鸡形目甚至慢至47公里/年。与病毒传播相关的重要因素中,地理距离与病毒传播呈负相关,即距离越远传播难度越大;温度与传播亦呈负相关,较温暖环境可能降低病毒传播风险。

瞿蓉蓉博士研究生为论文第一作者,研究受到国家自然科学基金等资助。