·实验研究·

芪地糖肾方抑制肾小管上皮细胞 Col－Ⅵ和 TGF－β1 合成改善糖尿病肾病肾纤维化的机制研究

郑毅成[1]，柳红芳[1]，姜旻[2]，史扬[1]，郭宇鑫[1]，郭燕[1]，董昭熙[1]，高雪[3*]

（1. 北京中医药大学第一临床医学院，北京 100700；2. 北京中医药大学第三附属医院，北京 100029；3. 北京中医药大学中医学院，北京 100029）

摘要　目的：探讨芪地糖肾方（QDTS）治疗糖尿病肾病（DN）肾小管间质纤维化（TIF）的作用机制。方法：将 24 只 db/db 小鼠随机分为 db/db 组、db/db＋卡格列净（CA）组、db/db＋QDTS 组，每组 8 只。同时，将 8 只 db/m 小鼠作为对照组。db/db 小鼠分别给予双蒸水、CA（12.9 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$）和 QDTS（1.3 $g\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$）灌胃，对照组小鼠给予双蒸水，持续 14 周。观察肾脏病理变化，并计算 TIF 面积；免疫组化法检测 α－SMA 表达水平；采用高糖培养的人近曲小管上皮细胞 HK－2 作为细胞模型，Western blot 法检测 db/db 小鼠肾组织和 HK－2 细胞中 Col－Ⅵ和 TGF－β1 的表达水平。结果：在体内实验中，与 db/db 组相比，治疗后 db/db＋QDTS 组 TIF 程度和 α－SMA 沉积明显减轻（$P<0.001$），肾 Col－Ⅵ、TGF－β1 表达明显下调（$P<0.01$，$P<0.05$），而 db/db＋CA 组 α－SMA 和 TGF－β1 表达水平无显著变化（$P>0.05$）；在体外实验中，QDTS 含药血清可以改善高糖对 HK－2 细胞增殖的抑制作用，逆转高糖对 HK－2 细胞 Col－Ⅵ和 TGF－β1 表达的促进作用（$P<0.05$，$P>0.05$）。结论：Col－Ⅵ和 TGF－β1 表达上调促进 TIF 进展，QDTS 可通过下调 Col－Ⅵ和 TGF－β1 表达，减少细胞外基质的积累，减轻 TIF。

关键词　糖尿病肾病；肾小管间质纤维化；Col－Ⅵ；TGF－β1；芪地糖肾方

中图分类号：R285.5　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1002－2392（2025）12－0012－06

DOI：10.19664/j.cnki.1002－2392.250246

糖尿病肾病（Diabetic nephropathy，DN）是糖尿病最常见和最严重的微血管并发症之一，肾小管间质纤维化（Tubulointerstitial fibrosis，TIF）是推动 DN 进展的主要因素[1]。除常规降糖、降压、降脂等治疗外，血管紧张素转换酶抑制剂和血管紧张素受体抑制剂是 DN 治疗的唯一选择，但是目前对于糖尿病 TIF 的治疗仍然缺乏有效药物[2]。近年来钠－葡萄糖协同转运蛋白 2（SGLT－2）抑制剂因具有降糖作用之外的肾脏益处[2]，被推荐用于 DN 患者的治疗。在实验研究中，SGLT－2 抑制剂被证实可以改善缺血/再灌注损伤、单侧输尿管结扎或环孢素引起的肾脏纤维化[3-4]，然而目前关于 SGLT－2 对糖尿病 TIF 的作用及机制的研究相对较少[5]。此外 SGLT－2 抑制剂可能会增加 DN 患者糖尿病酮症酸中毒、泌尿道感染或严重胃肠道事件的风险[6]。

虽然白蛋白尿被认为是 DN 的特征性表现，但患者的肾纤维化程度与白蛋白尿水平可能不平行，甚至许多非白蛋白尿 DN 患者可能存在更严重的 TIF[7]。在疾病状态下，肾脏细胞通过转化为肌成纤维细胞，过度分泌各型胶原蛋白（Collagen，Col），从而发挥促纤维化作用，导致细胞外基质（Extracellular matrix，ECM）的积累并引起 TIF[8]。然而近年来的研究发现，在 DN 肾脏中胶原蛋白Ⅰ型（Col－Ⅰ）和Ⅳ型（Col－Ⅳ）常呈阴性或弱表达，且与 DN 进展无明显相关性[9-10]。而胶原蛋白Ⅵ型（Col－Ⅵ）的过度分泌被证实与多种原因引起的肾纤维化相关。

Col－Ⅵ是由成纤维细胞产生的重要的结构胶原

收稿日期：2024－09－12　　**修回日期**：2025－04－30

基金项目：国家自然科学基金项目（82004275）；中央高校基本科研业务费专项资金（2022－JYB－XJSJJ－007）

作者简介：郑毅成（1994－），男，博士研究生，从事中医药防治肾病相关研究。

*通信作者：高雪（1989－），女，博士，助理研究员，从事中医药防治肾病内分泌疾病研究。

蛋白,其底物是肌成纤维细胞分化的有效诱导剂[11]。Sparding 等[12]在临床研究中发现,Col - Ⅵ水平可以反映 IgA 肾病和 ANCA 相关性血管炎患者肾脏纤维化的程度,并认为 Col - Ⅵ可作为间质纤维化和肾小管萎缩的非侵入性生物标志物。但是 Col - Ⅵ在 DN 引起的 TIF 中作用尚不明确。TGF - β1 是纤维化的关键介质,在 DN 进展中高糖可以激活 TGF - β1 信号通路,进而刺激肾小管上皮细胞(Tubular epithelial cell, TEC)产生 ECM 蛋白[5]。Col - Ⅵ的表达可能与TGF - β1 具有一定的关系。Razzaque 等[13]研究发现,在高血压引起的肾小管间质损伤中 Col - Ⅵ和 TGF - β1 的表达平行增加,并推测 TGF - β1 可能通过刺激 Col - Ⅵ合成来促进肾小管间质损伤。

芪地糖肾方(QDTS)是治疗 DN 的专利方,包含生黄芪、熟地黄、酒山萸肉、炒芡实、酒大黄、炙水蛭、白花蛇舌草,已被证明具有减少蛋白尿、保护肾小管和抗肾纤维化等作用[14-15]。但 QDTS 对 TIF 的保护作用机制有待进一步阐明。因此本研究通过动物及细胞实验观察了 QDTS 对 db/db 小鼠肾脏及高糖刺激的 HK - 2 细胞中 Col - Ⅵ和 TGF - β1 表达的影响,以期揭示 QDTS 改善 TIF 的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性 8 周龄 SPF 级自发性 2 型糖尿病 db/db 小鼠 24 只,体质量(35 ± 3)g ,雄性 8 周龄 SPF 级 db/m 健康小鼠 8 只,体质量(24 ± 1)g,均由常州卡文斯实验动物有限公司提供,证书编号:SCXK(苏)2021 - 0013。实验动物饲养于北京中医药大学,证书编号:SYXK(京)2020 - 0033。小鼠适应性喂养 4 周,自由进食饮水,喂以普通饲料。饲养环境温度均为 22 ~ 24 ℃,湿度 50% ~ 70% ,12 h 明暗交替照明。本研究方案经北京中医药大学动物福利与伦理委员会审查(证书编号:BUCM - 4 - 2021062404 - 2116)。

1.2 细胞培养

人近曲小管上皮细胞(HK - 2)购自中国医学科学院(中国上海)。HK - 2 在 DMEM/ F - 12 培养基(Gibco,货号:11966 - 025/11765 - 054)中培养,并补充 10% 胎牛血清(翱擎,货号:09900)和 1% 青霉素 - 链霉素双抗(Gibco,货号:15140 - 148),温度为 37 ℃,含 5% CO_2。

1.3 QDTS 制备

QDTS 由熟地黄 10 g,生黄芪 20 g,炒芡实 10 g,酒山萸肉 9 g,炙水蛭 2 g,酒大黄 1 g,白花蛇舌草 6 g 组成,本方专利由国家知识产权局颁发(专利号:ZL201711097315.2)。QDTS 颗粒剂购自北京康仁堂药业有限公司(中国北京),溶于双蒸水制成混悬液。

QDTS 含药血清的提取如下。SD 大鼠每日给予 QDTS 混悬液(10.36 g/kg)灌胃(1 mL/100 g),连续 7 d。最后一次给药后 1 h,用 0.3% 戊巴比妥按 1 mL/100 g 腹腔注射麻醉大鼠,腹主动脉取血,并在 4 ℃以 4 000 r/min离心 15min。离心后取上清通过 0.22 μm 过滤器过滤,在 56 ℃灭活 30 min,保存于 - 80 ℃冰箱。

1.4 主要试剂与仪器

卡格列净片(janssen,批号:LAL7W00);4% 多聚甲醛(servicebio, G1101);HE 染液(Servicebio, G1005);Masson 染液(Servicebio,G1006);免疫组化试剂盒(servicebio, G1215);α - SMA 抗体(Abcam, ab32575);蛋白酶抑制剂(Applygen,P1265);RIPA 裂解液(Applygen, C1053);BCA 蛋白定量试剂盒(Epizyme,ZJ102);TGF - β1(Abcam,ab179695);Col - Ⅵ(Abcam, ab199720);GAPDH(proteintech,60004 - 1 - Ig);β - actin(proteintech,60009 - 1 - Ig);兔二抗(proteintech, SA00001 - 2);鼠二抗(proteintech, SA00001 - 1);化学发光试剂盒(biosharp,BL520B);CCK - 8 检测试剂盒(LABLEAD,CK001)。

酶标仪(BioTek ELx800,美国);脱水机(武汉俊杰 JT - 12S,中国);包埋机(Leica EG1160,德国);切片机(Leica RM2126,德国);烤片机(常州国华 DB - B2,中国);烤箱(上海邦西 101 - 1BS,中国);光学显微镜(Nikon LV100POL/50IPOL,日本);化学发光图像分析仪(Tanon - 4600,中国);蛋白电泳仪(龙方 LF - 2000,中国)。

1.5 分组及干预

将 12 周龄 db/db 小鼠随机分为 3 组,分别为 db/db 组、db/db + CA 组和 db/db + QDTS 组,每组 8 只,并接受 QDTS 或卡格列净(Canagliflozin,CA)治疗。同时,将 8 只 db/m 小鼠作为对照组。QDTS 和 CA 溶解于双蒸水中,小鼠每日灌胃 1 次,连续 14 周,灌胃量 0.1 mL/10 g。按单位体质量的剂量进行换算,则每日给药等效剂量为成年人(70 kg)的 9 倍,给药剂量分别为 1.3 $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ 和 12.9 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$。对照组小鼠则给予蒸馏水灌胃。最后一次干预后次日,通过颈椎脱位处死小鼠,提取小鼠肾脏分别储存于 4% 多聚甲醛和液氮中,以进行后续实验。

细胞分为低糖组、高糖组、低糖 + 空白血清组、高糖 + 空白血清组、高糖 + QDTS 含药血清组。采用低

糖(5.6 mmol/L)、高糖(35.0 mmol/L)、空白血清(7.5%)和 QDTS 含药血清(7.5%)干预细胞 48 h,收集 HK-2 细胞沉淀并用于后续实验。

1.6　观察指标及方法

1.6.1　肾脏病理学染色分析

用4%多聚甲醛固定肾组织,然后依次脱水、透明化并包埋在石蜡中,制备组织病理切片。进行 HE、Masson 和免疫组化(α-SMA)染色,观察肾组织形态和胶原沉积。使用 Image J 软件计算 TIF 区域的面积和 α-SMA 抗体表达的平均光密度值(AOD),并进行统计分析。

1.6.2　细胞增殖检测

采用 QDTS 含药血清(5%、7.5%)干预高糖(35.0 mmol/L)刺激的 HK-2 细胞,采用相同浓度的空白血清作为对照,并采用 CCK-8 法检测细胞增殖情况。

1.6.3　蛋白质免疫印迹分析

蛋白提取过程在冰上进行,将收集的 HK-2 和肾组织置于含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液中。细胞用刮刀刮取,肾组织用无菌剪刀剪成碎片,然后分别通过超声间歇性破碎 2 min。随后在 4 ℃ 12 000 r/min 离心 15 min 提取细胞和组织上清,并用 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度。将等量的提取蛋白质在10%聚丙烯酰胺凝胶上分离并转移到硝酸纤维素膜上。室温下用 5% 脱脂牛奶封闭 70 min,将膜与相应的一抗 TGF-β1(1∶1 000)、Col-Ⅵ(1∶1 000)、GAPDH(1∶10 000)、β-actin(1∶10 000)在 4 ℃ 下过夜。洗涤膜并与辣根过氧化物酶偶联的二抗(1∶10 000)在室温下孵育 50 min。最后,通过化学发光试剂盒检测蛋白质条带,并使用 Image J 软件对灰度值进行分析。

1.7　统计分析

数据均以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 IBM SPSS Statistics 25 软件进行方差分析。若各组方差齐性,则采用 Tukey 事后检验进行组间比较;若方差不齐,则采用 Games-Howell 事后检验进行组间比较。$P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　QDTS 可以改善肾小管间质纤维化

HE 和 Masson 染色显示,与 db/m 组相比,db/db 组小鼠肾小管扩张,肾小管上皮空泡化和肾小管间质纤维化显著,这些病理变化可通过 QDTS 或 CA 治疗减轻。与 db/m 组相比,db/db 组小鼠 TIF 程度显著升高($P<0.001$);与 db/db 组相比,db/db + CA 组和 db/db + QDTS 组 TIF 程度显著降低($P<0.001$);且与 db/db + CA 组比较,db/db + QDTS 组 TIF 程度明显降低($P<0.05$),见图 1、表 1。

免疫组化结果显示,与 db/m 组相比,db/db 组肾小管间质区 α-SMA 表达水平显著升高($P<0.001$);与 db/db 组和 db/db + CA 组比较,db/db + QDTS 组 α-SMA 表达水平显著降低($P<0.001$)。见图 1、表 1。

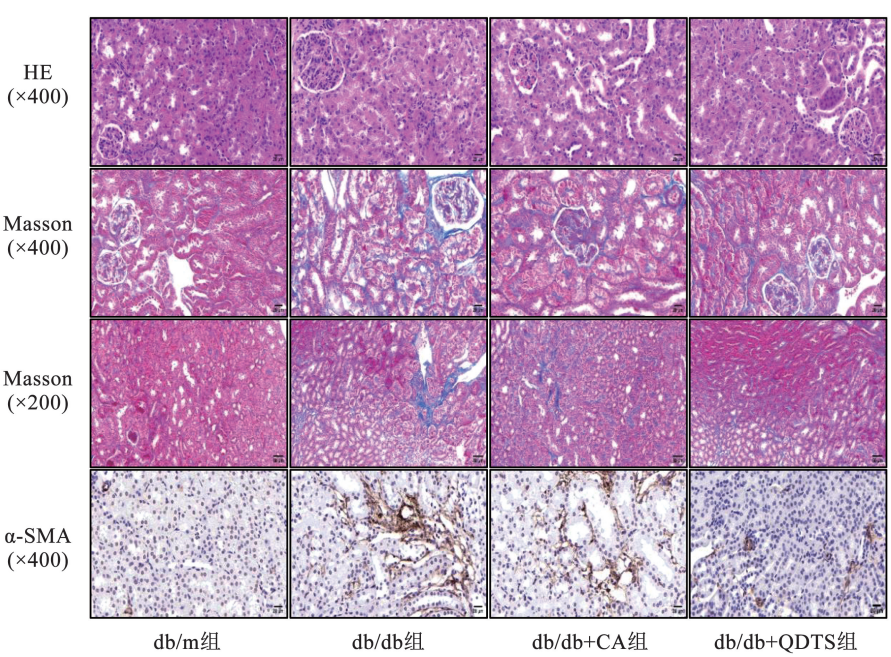


图 1　各组小鼠肾组织病理染色变化情况

表 1 各组小鼠肾组织纤维化面积及 α－SMA 表达水平($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

组别	纤维化面积/%	AOD(α－SMA)
db/m 组	6.154 ±0.882	0.116 ±0.008
db/db 组	19.328 ±1.499***	0.175 ±0.006***
db/db＋CA 组	16.416 ±1.046***###	0.179 ±0.009***
db/db＋QDTS 组	14.177 ±1.132***###▲	0.150 ±0.003***###▲▲▲

注：与 db/m 组相比，*** $P<0.001$；与 db/db 组相比，### $P<0.001$；与 db/db＋CA 组相比，▲ $P<0.05$，▲▲▲ $P<0.001$。

2.2 QDTS 可以抑制 db/db 小鼠肾脏 Col－Ⅵ及 TGF－β1 的表达

Western blot 结果显示，与 db/m 组比较，db/db 组 Col－Ⅵ及 TGF－β1 蛋白表达水平显著升高（$P<0.01$，$P<0.05$）；与 db/db 组比较，db/db＋CA 组 Col－Ⅵ表达显著降低（$P<0.01$），而 TGF－β1 表达无明显变化（$P>0.05$）；与 db/db 组比较，db/db＋QDTS 组 Col－Ⅵ和 TGF－β1 表达均显著降低（$P<0.01$，$P<0.05$）。见表 2、图 2。

表 2 各组小鼠肾组织 Col－Ⅵ及 TGF－β1 表达水平($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	Col－Ⅵ	TGF－β1
db/m 组	1.000 ±0.202	1.000 ±0.169
db/db 组	3.395 ±0.500**	1.884 ±0.133*
db/db＋CA 组	1.501 ±0.578##	1.497 ±0.385
db/db＋QDTS 组	1.442 ±0.803##	0.913 ±0.302#

注：与 db/m 组比较，* $P<0.05$，** $P<0.01$；db/db 组相比，# $P<0.05$，## $P<0.01$。

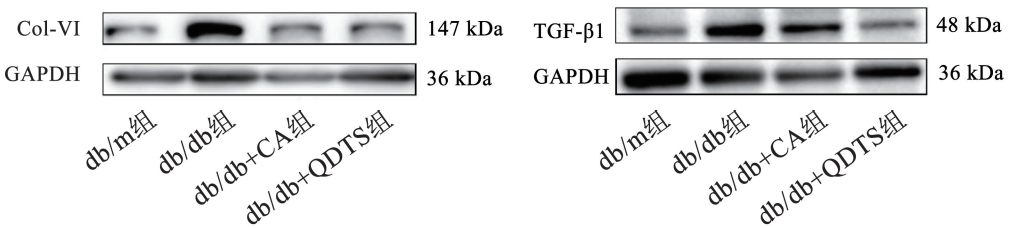


图 2 各组小鼠肾组织 Col－Ⅵ及 TGF－β1 蛋白条带表达情况

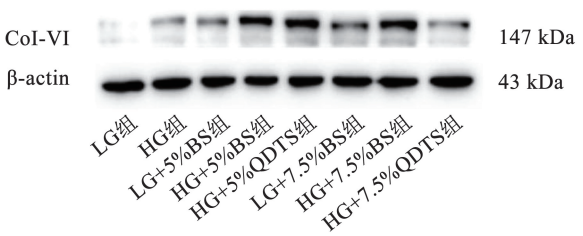
2.3 QDTS 含药血清可以抑制高糖刺激的 HK－2 细胞增殖和 Col－Ⅵ蛋白表达

CCK－8 结果显示，7.5% QDTS 可以改善高糖对 HK－2 细胞增殖的抑制作用。Western blot 结果显示，高糖刺激显著上调了 HK－2 细胞 Col－Ⅵ蛋白表达水平（$P<0.05$，$P<0.01$），而 7.5% QDTS 下调了 Col－Ⅵ的表达水平（$P<0.05$）。故后续实验采用 7.5% QDTS 含药血清进行干预，见表 3、图 3。

表 3 QDTS 含药血清对 HK－2 细胞增殖及 Col－Ⅵ蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	相对细胞活力	Col－Ⅵ
LG 组	1.000 ±0.039	1.000 ±0.733
HG 组	–	2.403 ±1.235
LG＋5% BS 组	0.855 ±0.052	2.086 ±0.762
HG＋5% BS 组	0.816 ±0.100*	3.906 ±0.735**
HG＋5% QDTS 组	0.796 ±0.034**	4.097 ±1.069**
LG＋7.5% BS 组	0.943 ±0.088	2.018 ±0.442
HG＋7.5% BS 组	0.840 ±0.037*	3.257 ±0.515*
HG＋7.5% QDTS 组	0.918 ±0.085	1.976 ±0.532&

注：LG. 5.6 mmol/L 葡萄糖；HG. 35 mmol/L 葡萄糖；BS. 空白血清；QDTS. QDTS 含药血清；与 LG 组相比，* $P<0.05$，** $P<0.01$；与 HG＋7.5% BS 组相比，& $P<0.05$。



注：LG. 5.6 mmol/L 葡萄糖；HG. 35 mmol/L 葡萄糖；BS. 空白血清；QDTS. QDTS 含药血清。

图 3 各组 HK－2 中 Col－Ⅵ蛋白条带表达情况

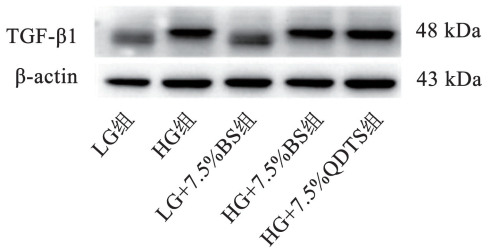
2.4 QDTS 含药血清可以抑制高糖刺激的 HK－2 细胞 TGF－β1 蛋白表达

Western blot 结果显示，高糖刺激显著上调了 HK－2 细胞 TGF－β1 蛋白表达水平（$P<0.05$），而 QDTS 逆转了高糖对 TGF－β1 蛋白的促进作用（$P>0.05$）。见表 4、图 4。

表 4 QDTS 含药血清对 HK－2 中 TGF－β1 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	TGF－β1
LG 组	1.000 ±0.198
HG 组	1.259 ±0.153
LG＋7.5% BS 组	0.951 ±0.093
HG＋7.5% BS 组	1.346 ±0.109#
HG＋7.5% QDTS 组	1.176 ±0.072

注：LG. 5.6 mmol/L 葡萄糖；HG. 35 mmol/L 葡萄糖；BS. 空白血清；QDTS. QDTS 含药血清；与 LG＋7.5% BS 组相比，# $P<0.05$。



注：LG. 5.6 mmol/L 葡萄糖；HG. 35 mmol/L 葡萄糖；BS. 空白血清；QDTS. QDTS 含药血清。

图 4 高糖刺激的 HK－2 细胞 TGF－β1 蛋白表达情况

3 讨论

中医认为，气阴(精)不足及肾络不畅是 DN 的发病基础。QDTS 中熟地黄填补肾精；生黄芪补气，炙水蛭活血，酒大黄降浊，白花蛇舌草清热，四药合用以通达肾络；酒山萸肉、炒芡实固摄精气，全方可填补精气、通达肾络。本研究中 QDTS 明显改善了 TIF，更重要的是，QDTS 减少 Col－Ⅵ沉积，下调 TGF－β1 表达，从而延缓了 DN 引起的 TIF 的进展。

Col－Ⅵ属于间质基质蛋白，主要存在间质基质和基底膜之间的界面，可在 ECM 形成中产生特征性串珠微丝网络，并与多种 ECM 蛋白形成联系[16]。在衰老肾脏和慢性肾脏病中，Col－Ⅵ常与疾病发展呈正相关[17－18]。目前对于 Col－Ⅵ的研究多集中在肾小球，有研究[19]发现，在糖尿病肾小球中 Col－Ⅵ明显增加且与 α－SMA 阳性肌成纤维细胞密切相关。在正常状态下 Col－Ⅵ多表达于基底膜和系膜基质，而 DN 发生时 Col－Ⅵ在系膜区的表达明显增加[19]。Moriya 等[20]的研究认为，在 DN 肾小球病理改变的早期阶段，即晚期瘢痕形成之前，肾小球 Col－Ⅵ并没有增多，而在中晚期肾小球结节形成过程中系膜区 Col－Ⅵ蛋白显著增加。说明 Col－Ⅵ的上调在 DN 中晚期肾小球硬化过程中具有重要作用。因此有研究认为，Col－Ⅵ可以作为 DN 白蛋白尿和肾小球硬化进展的风险预测指标，并与终末期肾脏病相关[21]。

然而 Col－Ⅵ作为间质基质蛋白，其在 DN 肾小管间质中的作用鲜有报道。本研究显示，在高糖刺激的 HK－2 细胞和 db/db 小鼠肾脏中 Col－Ⅵ表达明显增多，且与肾脏 TIF 趋势一致，提示受损伤的肾小管上皮细胞同样可以过表达 Col－Ⅵ，并参与 TIF 进展。QDTS 的干预抑制了 Col－Ⅵ的表达，表明 QDTS 可能通过下调 Col－Ⅵ的表达而发挥抗 TIF 的作用。

纤维化是器官实质细胞坏死和 ECM 沉积过多，引起结缔组织增生、纤维化，甚至明显产生器官硬化的病理过程[22]。纤维化通常伴随着成纤维细胞向肌成纤维细胞转化。TGF－β 是成纤维细胞活化的中枢介质，在高糖、炎症等多种因素的刺激下，TGF－β 可将静息状态的成纤维细胞直接活化为可以产生胶原蛋白的收缩性肌成纤维细胞[23]。同时，TGF－β 可以通过刺激包括 SMAD 在内的下游信号通路促进慢性肾脏病中 ECM 蛋白的积累[22]。本研究的体内外模型中均出现了 TGF－β1 表达的上调，同时 db/db 小鼠中肾小管间质区肌成纤维细胞标志蛋白 α－SMA 表达增加，表明 DN 模型出现 TIF。QDTS 干预后，可逆转高糖对 TGF－β1 表达和成纤维细胞活化的促进作用。以上结果表明 QDTS 可以通过下调 TGF－β1 的表达，抑制成纤维细胞向肌成纤维细胞转化，减轻 TIF。

研究表明，Col－Ⅵ的沉积与 TGF－β 存在相关性。Rønnow 等[24]的研究发现，TGF－β1 的刺激可以显著诱导肺成纤维细胞 Col－Ⅵ(PRO－C6)和 α－SMA 的合成，而 TGF－β 受体激酶抑制剂 ALK5i 能够显著降低 TGF－β1 诱导的 PRO－C6 和 α－SMA 过表达；Pedersen 等[25]的研究发现，胰腺癌患者血浆激肽释放酶激活的 TGF－β 与血清 PRO－C6 水平呈正相关，并且与肿瘤纤维化存在关联。虽然目前尚未见有关 Col－Ⅵ与 TGF－β1 在 DN 中的关系的报道，但二者在糖脂代谢方面可能具有一定的相关性。研究表明，在高血糖和胰岛素抵抗的背景下，脂肪组织中 Col－Ⅵ与 TGF－β1 水平升高，且二者呈正相关，并可引发脂肪纤维化和炎症[26－27]。在本研究中，Col－Ⅵ和 TGF－β1 的表达在 db/db 小鼠肾脏和高糖刺激的 HK－2 细胞中均显著上调，并且二者水平与 TIF 程度一致，提示二者共同参与了 DN 引起的 ECM 积累和 TIF 进展，而 QDTS 可抑制该过程。

综上，DN 肾脏中，肾小管上皮细胞 Col－Ⅵ和 TGF－β1 表达上调，并且二者水平与 TIF 程度一致。QDTS 可通过下调 Col－Ⅵ和 TGF－β1 表达，减少 ECM 的积累，减轻 TIF。TGF－β1 可能对 Col－Ⅵ具有调控作用，具体机制仍需进一步探索。

参考文献：

[1] MOHANDES S, DOKE T, HU H L, et al. Molecular pathways that drive diabetic kidney disease[J]. J Clin Invest, 2023, 133(4): e165654.

[2] HU Q C, CHEN Y, DENG X Y, et al. Diabetic nephropathy: focusing on pathological signals, clinical treatment, and dietary regulation[J]. Biomed Pharmacother, 2023, 159: 114252.

[3] ZHANG Y F, NAKANO D, GUAN Y, et al. A sodium－glucose cotransporter 2 inhibitor attenuates renal capillary injury and fibrosis by a vascular endothelial growth factor－dependent pathway after renal injury in mice[J]. Kidney Int, 2018, 94(3): 524－535.

[4] CASTOLDI G, CARLETTI R, IPPOLITO S, et al. Sodium－glucose cotransporter 2 inhibition prevents renal fibrosis in cyclosporine nephropathy[J]. Acta Diabetol, 2021, 58(8): 1059－1070.

[5] WANG L, WANG H L, LIU T T, et al. TGF－beta as a master regulator of diabetic nephropathy[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(15): 7881.

[6] LI S Y, VANDVIK P O, LYTVYN L, et al. SGLT－2 inhibitors or GLP－1 receptor agonists for adults with type 2 diabetes: a clinical practice guideline[J]. BMJ, 2021, 373: n1091.

[7] CHANG J S, YAN J Y, LI X L, et al. Update on the mechanisms of tubular cell injury in diabetic kidney disease[J]. Front Med (Lau-

sanne), 2021, 8: 661076.
[8] ZHANG Y Q, JIN D, KANG X M, et al. Signaling pathways involved in diabetic renal fibrosis[J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 696542.
[9] ADEVA-ANDANY M M, CARNEIRO-FREIRE N. Biochemical composition of the glomerular extracellular matrix in patients with diabetic kidney disease[J]. World J Diabetes, 2022, 13(7): 498-520.
[10] MISE K, UENO T, HOSHINO J, et al. Nodular lesions in diabetic nephropathy: collagen staining and renal prognosis[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2017, 127: 187-197.
[11] NAUGLE J E, OLSON E R, ZHANG X J, et al. Type VI collagen induces cardiac myofibroblast differentiation: implications for postinfarction remodeling[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006, 290(1): H323-H330.
[12] SPARDING N, GENOVESE F, RASMUSSEN D G K, et al. Endotrophin, a collagen type VI-derived matrikine, reflects the degree of renal fibrosis in patients with IgA nephropathy and in patients with ANCA-associated vasculitis[J]. Nephrol Dial Transplant, 2022, 37(6): 1099-1108.
[13] RAZZAQUE M S, HARADA T, TAGUCHI T. Significance of increased accumulation of type VI collagen and transforming growth factor beta 1 in tubulointerstitial damage in hypertensive nephrosclerosis: an immunohistochemical study[J]. J Int Med Res, 1996, 24(2): 199-208.
[14] WANG X M, ZHAO L, AJAY A K, et al. QiDiTangShen granules activate renal nutrient-sensing associated autophagy in db/db mice[J]. Front Physiol, 2019, 10: 1224.
[15] 高雪, 安至超, 何其英, 等. 填精通络方对糖尿病肾病大鼠肾小管损伤的治疗作用[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2018, 19(2): 109-112.
[16] CESCON M, GATTAZZO F, CHEN P, et al. Collagen Ⅵ at a glance[J]. Journal of cell science, 2015, 128(19): 3525-3531.
[17] RANDLES M J, LAUSECKER F, KONG Q Y, et al. Identification of an altered matrix signature in kidney aging and disease[J]. J Am Soc Nephrol, 2021, 32(7): 1713-1732.
[18] RASMUSSEN D G K, BOESBY L, NIELSEN S H, et al. Collagen turnover profiles in chronic kidney disease[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 16062.
[19] WILLIAMS L, LAYTON T, YANG N, et al. Collagen VI as a driver and disease biomarker in human fibrosis[J]. FEBS J, 2022, 289(13): 3603-3629.
[20] MORIYA T, GROPPOLI T J, KIM Y, et al. Quantitative immunoelectron microscopy of type VI collagen in glomeruli in type I diabetic patients[J]. Kidney Int, 2001, 59(1): 317-323.
[21] TOUGAARD N H, MØLLER A L, RØNN P F, et al. Endotrophin as a marker of complications in a type 2 diabetes cohort[J]. Diabetes Care, 2022, 45(11): 2746-2748.
[22] PENG D D, FU M Y, WANG M N, et al. Targeting TGF-β signal transduction for fibrosis and cancer therapy[J]. Mol Cancer, 2022, 21(1): 104.
[23] LURJE I, GAISA N T, WEISKIRCHEN R, et al. Mechanisms of organ fibrosis: Emerging concepts and implications for novel treatment strategies[J]. Mol Aspects Med, 2023, 92: 101191.
[24] RØNNOW S R, DABBAGH R Q, GENOVESE F, et al. Prolonged scar-in-a-jar: an in vitro screening tool for anti-fibrotic therapies using biomarkers of extracellular matrix synthesis[J]. Respir Res, 2020, 21(1): 108.
[25] PEDERSEN R S, NISSEN N I, JENSEN C, et al. Plasma kallikrein-activated TGF-β is prognostic for poor overall survival in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma and associates with increased fibrogenesis[J]. Biomolecules, 2022, 12(9): 1315.
[26] SPENCER M, YAO-BORENGASSER A, UNAL R, et al. Adipose tissue macrophages in insulin-resistant subjects are associated with collagen VI and fibrosis and demonstrate alternative activation[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010, 299(6): E1016-E1027.
[27] SUN K, PARK J, GUPTA O T, et al. Endotrophin triggers adipose tissue fibrosis and metabolic dysfunction[J]. Nat Commun, 2014, 5: 3485.

Mechanism of Qidi Tangshen Formula Inhibiting Col-Ⅵ and TGF-β1 Synthesis in Renal Tubular Epithelial Cells to Improve Renal Fibrosis in Diabetic Nephropathy

ZHENG Yicheng[1], LIU Hongfang[1], JIANG Min[2], SHI Yang[1], GUO Yuxin[1], GUO Yan[1], DONG Zhaoxi[1], GAO Xue[3]
(1. *First School of Clinical Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing* 100700, *China*;
2. *Third Affiliated Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing* 100029, *China*;
3. *School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing* 100029, *China*)

Abstract Objective: To investigate the mechanism of Qidi Tangshen Formula (QDTS) in treating renal tubulointerstitial fibrosis (TIF) in diabetic nephropathy (DN). Methods: Twenty-four db/db mice were randomly divided into the db/db group, the db/db + canagliflozin (CA) group, and the db/db + QDTS group, with 8 mice in each group. Additionally, 8 db/m mice were used as the control group. The db/db mice were administered double-distilled water, CA (12.9 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$), and QDTS (1.3 $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$) by gavage, respectively, while the control group received double-distilled water, for 14 weeks. Renal pathological changes were observed, and the TIF area was calculated; the expression level of α-SMA was detected by immunohistochemistry; human proximal tubular epithelial cells HK-2 cultured in high glucose were used as the cell model, and the expression levels of Col-Ⅵ and TGF-β1 in the renal tissues of db/db mice and HK-2 cells were detected by Western blot. Results: In the in vivo experiments, compared with the db/db group, the TIF degree and α-SMA deposition were significantly reduced in the db/db + QDTS group after treatment ($P < 0.001$), and the expression of renal Col-Ⅵ and TGF-β1 was significantly downregulated ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while the expression levels of α-SMA and TGF-β1 in the db/db + CA group showed no significant changes ($P > 0.05$); in the in vitro experiments, QDTS-containing serum could ameliorate the inhibitory effect of high glucose on the proliferation of HK-2 cells and reverse the promoting effect of high glucose on the expression of Col-Ⅵ and TGF-β1 in HK-2 cells ($P < 0.05$, $P > 0.05$). Conclusion: Upregulated expression of Col-Ⅵ and TGF-β1 promotes the progression of TIF, and QDTS can reduce the accumulation of extracellular matrix and alleviate TIF by downregulating the expression of Col-Ⅵ and TGF-β1.

Key words Diabetic nephropathy; Renal tubulointerstitial fibrosis; Col-Ⅵ; TGF-β1; Qidi Tangshen Formula