

有柄石韦中坝巴酸的通淋作用研究

隋 怡, 滕明刚, 柴慧芳, 於 祥, 龙 毅, 罗国勇, 杨武德*

贵州中医药大学, 贵州 贵阳 550025

摘 要: 目的 研究黔产有柄石韦 *Pyrrosia petiolosa* 中坝巴酸的通淋作用。方法 犬肾小管上皮细胞 (MDCK) 给予 100 $\mu\text{mol/L}$ 坝巴酸孵育 24 h, MTT 法检测坝巴酸对 MDCK 细胞活力以及脂多糖诱导的 MDCK 炎症模型细胞活力的影响。雄性昆明种小鼠随机分为正常组、模型组及坝巴酸低、高剂量 (10、20 mg/kg) 组和肾石通 (4.5 g/kg) 组, 除正常组外, 其余各组每日 ig 1% 乙二醇和 1% NH_4Cl 连续造模 30 d, 造模同时 ig 药物, 末次给药后取小鼠尿液和肾脏, 采用苏木素-伊红 (HE) 染色法检测肾组织病理变化; 采用钙离子检测试剂盒检测尿钙、肾钙含量。利用 Auto Dock 软件对坝巴酸和过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator activated receptor γ , PPARG)、WNK 赖氨酸缺乏蛋白激酶 1 (WNK lysine deficient protein kinase 1, WNK1)、钙感应受体 (calcium sensing receptor, CASR)、细胞色素 P450 家族 24 亚家族 A 成员 1 (cytochrome P450 family 24 subfamily A member 1, CYP24A1) 蛋白进行分子对接并分析对接结果。结果 体外实验结果显示, 与正常组相比, 100 $\mu\text{mol/L}$ 坝巴酸对 MDCK 细胞活力无明显影响; 在 30 mg/mL 脂多糖诱导的炎症细胞模型中, 坝巴酸可以显著提高 MDCK 细胞活力 ($P < 0.05$)。体内实验结果显示, 各给药组小鼠肾组织炎性细胞浸润得到改善, 肾组织损伤评分显著降低 ($P < 0.05$); 坝巴酸低剂量组和肾石通组小鼠肾钙含量较模型组显著降低 ($P < 0.05$), 尿钙含量显著升高 ($P < 0.05$)。分子对接结果显示, PPARG、WNK1、CASR、CYP24A1 蛋白与坝巴酸的分子对接能均小于 -21 kJ/mol, 对接效果均较好。结论 黔产有柄石韦中坝巴酸具有较好的抗炎、抑制肾钙蓄积的作用, 其通淋活性机制与 PPARG、WNK1、CASR、CYP24A1 蛋白的结合活性有关。

关键词: 通淋; 黔产有柄石韦; 坝巴酸; 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ ; WNK 赖氨酸缺乏蛋白激酶 1; 钙感应受体; 细胞色素 P450 家族 24 亚家族 A 成员 1

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)03-0767-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.03.016

Leaching effect of babaric acid in *Pyrrosia petiolosa*

SUI Yi, TENG Ming-gang, CHAI Hui-fang, YU Xiang, LONG Yi, LUO Guo-yong, YANG Wu-de

Guizhou University of Traditional Medical, Guiyang 550025, China

Abstract: Objective To study the leaching effect of babaric acid in *Pyrrosia petiolosa* in Guizhou. **Methods** Canine renal tubular epithelial cells MDCK were incubated with 100 $\mu\text{mol/L}$ babaric acid for 24 h. MTT method was used to detect the effects of babaric acid on viability of MDCK cells and cell viability of MDCK inflammation model induced by lipopolysaccharide. Male Kunming mice were randomly divided into normal group, model group, low-, high-dose (10, 20 mg/kg) babaric acid groups and Shenshitong (4.5 g/kg) group. Mice except normal group were daily ig 1% ethylene glycol and 1% NH_4Cl for 30 d to continue to model, at the same time mice were ig drugs, after the last administration, urine and kidney of mice were taken, hematoxylin-eosin (HE) staining method was used to detect the pathological changes of kidney tissue; Calcium ion detection kit was used to detect urinary calcium and renal calcium contents. Babaric acid and peroxisome proliferator activated receptor γ (PPARG), WNK lysine deficient protein kinase 1 (WNK1), calcium sensing receptor (CASR) and cytochrome P450 family 24 subfamily A member 1 (CYP24A1) protein were molecularly docked by Auto Dock software and docking results were analyzed. **Results** The results of *in vitro* experiments showed that compared with normal group, 100 $\mu\text{mol/L}$ babaric acid had no significant effect on MDCK cell viability; In 30 mg/mL lipopolysaccharide-induced inflammatory cell model, babaric acid significantly increased MDCK cell viability ($P < 0.05$). The results

收稿日期: 2021-09-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82160773); 贵州省教育厅特色领域项目 (黔教合 KY 字[2021]068)

作者简介: 隋 怡, 硕士, 助理实验师, 研究方向为中药药理和中药毒理学研究。E-mail: 836017075@qq.com

*通信作者: 杨武德, 教授, 研究方向为中药化学成分及质量评价。E-mail: ywd_680708@sina.com

of *in vivo* experiments showed that inflammatory cell infiltration in kidney tissue of mice in each administration group was improved, and kidney tissue damage score was significantly reduced ($P < 0.05$); Calcium content of kidneys in low-dose babaric acid group and Shenshitong group was significantly decreased than that of model group ($P < 0.05$), and urinary calcium content was significantly increased ($P < 0.05$). The results of molecular docking showed that molecular docking energy of PPARG, WNK1, CASR, CYP24A1 protein and babaric acid were all less than -21 kJ/mol, and docking effect was good. **Conclusion** Babaric acid in *P. petiolosa* in Guizhou has good anti-inflammatory and inhibiting effects on renal calcium accumulation. The mechanism of its leaching activity is related to the binding activity of PPARG, WNK1, CASR and CYP24A1 proteins.

Key words: leaching effect; *Pyrrosia petiolosa* (Christ) Ching in Guizhou; babaric acid; peroxisome proliferator activated receptor γ ; WNK lysine deficient protein kinase 1; calcium sensing receptor; cytochrome P450 family 24 subfamily A member 1

石韦为水龙骨科植物庐山石韦 *Pyrrosia sheareri* (Bak.) Ching、石韦 *P. lingua* (Thunb.) Farwell 或有柄石韦 *P. petiolosa* (Christ) Ching 的干燥叶, 具有利尿通淋、清肺止咳、凉血止血的功效^[1], 主要成分为绿原酸、里白烯、 β -谷甾醇等^[2]。本课题组前期从黔产有柄石韦提取的 21 种化合物中筛选出了一批利尿活性较好的化合物, 其中坝巴酸的利尿活性较优, 且在细胞和动物实验上得到了验证^[3]。

中医中的淋证包含热淋和石淋等, 是中医常见病症。《诸病源候论》谓: “热淋者三焦有热, 气搏于肾, 流入于胞而成淋也, 其状小便赤涩。” 现代医学认为热淋为尿路系统感染, 包括急性慢性肾盂肾炎、膀胱炎、尿道炎等。而石淋则为现代医学中的肾结石范畴, 在治疗上以控制感染、碎石排石为主^[4]。本研究围绕中医对于淋证的理解, 从抗炎和肾钙排泄 2 个方面, 探究黔产有柄石韦的活性成分坝巴酸的通淋活性及机制, 为黔产有柄石韦的开发提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞

犬肾小管上皮细胞 (MDCK) 购自中国科学院上海细胞库。

1.2 动物

清洁级雄性昆明种小鼠, 7~8 周龄, 体质量 18~22 g, 购自重庆腾鑫有限公司, 动物许可证号 SCXK (辽) 2015-0001。小鼠饲养环境通风良好, 温度 22~25 °C, 相对湿度 50%~60%, 自由进食饮水。动物实验遵循贵州中医药大学有关实验动物管理和使用的规定, 均符合 3R 原则。

1.3 药品与试剂

黔产有柄石韦由龙里县湾滩河镇弯寨石头村李红提供, 由贵州中医药大学药教研室周汉华教授鉴定水龙骨科植物有柄石韦 *P. petiolosa* (Christ) Ching 的干燥叶; 肾石通颗粒 (批号 20160625, 国

药准字 Z43020338) 购自华润三九制药有限公司; 坝巴酸 (HPLC $\geq 98\%$, 批号 2018132) 购自四川省维克奇生物科技有限公司; 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS, 批号 063M4039V)、苏木素-伊红 (HE) 染色试剂盒 (批号 190815) 购自北京索莱宝科技有限公司; 钙离子检测试剂盒 (批号 20191123) 购自南京建成生物工程研究所有限公司; 胎牛血清 (批号 20196452) 购自杭州四季青生物工程材料有限公司; DMEM 高糖培养基 (批号 20181562) 购自美国 Gibco 公司; PBS (批号 20191152) 购自以色列 BI 公司。

1.4 仪器与软件

双人超净工作台 (苏州净化设备有限公司); CO₂ 培养箱 (日本三洋公司); TD4M 型低速离心机 (长沙平凡仪器仪表有限公司); 自动酶标读仪 (美国 Bio-Tek 公司); EG1150 型石蜡包埋机、RM2235 型切片机 (德国 Leica 公司); 倒置相差显微镜、DS-Ri2 型显微镜成像系统 (日本 Nikon 公司); AutoDockTools 1.5.6 软件。

2 方法

2.1 药物的制备

本课题组前期从黔产有柄石韦中提取了 21 个化合物, 经鉴定化合物 5 为坝巴酸^[2]。将坝巴酸用双蒸水低温研磨配制成母液, 将母液分别以 DMEM 高糖培养基和双蒸水稀释成 100 $\mu\text{mol/L}$ 、0.5 mg/mL 的溶液, 各用于细胞实验和动物实验, 于 4 °C 冰箱保存, 备用。

2.2 坝巴酸对 MDCK 细胞活力的影响

MDCK 细胞用含 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素的 DMEM 高糖培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养, 取对数生长期的细胞用于毒性和细胞保护实验。将 MDCK 细胞以 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 均匀接种于 96 孔板中, 设置对照组 (正常培养基培养)、给药组 (给予 100 $\mu\text{mol/L}$ 坝巴酸), 每组设 5 个复孔。

各组孵育 24 h, 采用 MTT 法检测各组 490 nm 处的吸光度 (A) 值。

2.3 坝巴酸对 LPS 诱导的 MDCK 细胞活力的影响

取处于对数生长期的 MDCK 细胞, 以 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 均匀接种于 96 孔板, 培养过夜。设置对照组、模型组和坝巴酸 ($100 \mu\text{mol/L}$) 组。给药组加入坝巴酸预处理 24 h 后, 模型组和各给药分别加入 LPS (30 、 50 mg/mL), 对照组加入不含药物的培养基, 培养 24 h, MTT 法检测各组 490 nm 处的 A 值。

2.4 坝巴酸对肾结石小鼠肾组织病理及肾钙、尿钙含量的影响

35 只昆明种小鼠随机分为对照组、模型组及坝巴酸低、高剂量 (10 、 20 mg/kg) 组和肾石通 (4.5 g/kg) 组, 每组 7 只。除对照组外, 其余各组每日 ig 含 1% 乙二醇和 1% NH_4Cl 的双蒸水进行造模, 以肾脏草酸钙蓄积为造模成功标志。自造模第 1 天起, 各给药组 ig 相应药物 ($20 \mu\text{L/g}$), 对照组和模型组 ig 等体积 0.9% 氯化钠溶液, 每日上午给药、下午造模, 1 次/d, 连续 30 d。给药结束后, 取各组小鼠尿液, 小鼠脱颈椎处死, 取肾脏, 按照钙离子检测试剂盒说明书检测小鼠肾组织及尿液中钙离子浓度。采用 HE 染色法检测小鼠肾组织病理损伤, 每张切片在皮质区随机观察 5 个无重叠视野 ($\times 200$), 每个视野选取 50 个肾小管, 按照 Paller 等^[5]的标准进行评分: 正常肾小管为 0 分; 肾小管明显扩张、细胞扁平为 1 分; 间质水肿为 1 分; 刷状缘消失为 2 分; 细胞质空泡为 2 分; 肾小管细胞坏死为 2 分; 形成管型或碎片为 2 分; 有炎症细胞浸润为 2 分。每个肾小管肾病理评分总计为 10 分, 每个视野最大评分为 500 分。

2.5 坝巴酸通淋活性的分子对接验证

利用 Auto Dock 软件和 Vina 程序进行坝巴酸和过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator activated receptor γ , PPARG)、WNK 赖氨酸缺乏蛋白激酶 1 (WNK lysine deficient protein kinase 1, WNK1)、钙感应受体 (calcium sensing receptor, CASR)、细胞色素 P450 家族 24 亚家族 A 成员 1 (cytochrome P450 family 24 subfamily A member 1, CYP24A1) 蛋白的分子对接, 获得各蛋白分子对接结合能和对接图像, 并分析对接结果。

2.6 统计学分析

实验结果均服从正态分布, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 20.0 统计软件进行单因素方差分析。

3 结果

3.1 坝巴酸对 MDCK 细胞活力的影响

对照组 A 值为 1.132 ± 0.021 , 坝巴酸 ($100 \mu\text{mol/L}$) 组 A 值为 1.116 ± 0.027 , 两者无明显差异, 表明 $100 \mu\text{mol/L}$ 坝巴酸对 MDCK 细胞没有毒性作用, 此浓度可用于进一步实验。

3.2 坝巴酸对 LPS 诱导的 MDCK 细胞活力的影响

研究不同质量浓度 LPS (30 、 50 mg/mL) 诱导的 MDCK 炎症模型下, $100 \mu\text{mol/L}$ 坝巴酸对 MDCK 细胞的保护作用, 结果见表 1。与对照组相比, 模型组细胞活力均显著降低 ($P < 0.05$); 在 LPS (30 mg/mL) 诱导的 MDCK 细胞炎症模型中, 坝巴酸显著提高 MDCK 细胞 A 值 ($P < 0.05$), 表明坝巴酸对 LPS (30 mg/mL) 诱导的 MDCK 细胞损伤模型具有保护作用。

表 1 坝巴酸对 LPS 诱导的 MDCK 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 1 Effect of babacic acid on MDCK cell viability induced by LPS ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	浓度/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	A 值	
		$30 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS	$50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS
对照	—	0.444 ± 0.061	0.444 ± 0.053
模型	—	$0.224 \pm 0.065^{\#}$	$0.255 \pm 0.021^{\#}$
坝巴酸	100	$0.301 \pm 0.041^*$	0.271 ± 0.055

与对照组比较: $*P < 0.05$; 与模型组比较: $^{\#}P < 0.05$, 下表同

$^*P < 0.05$ vs control group; $^{\#}P < 0.05$ vs model group, same as below tables

3.3 坝巴酸对肾结石小鼠肾组织病理变化的影响

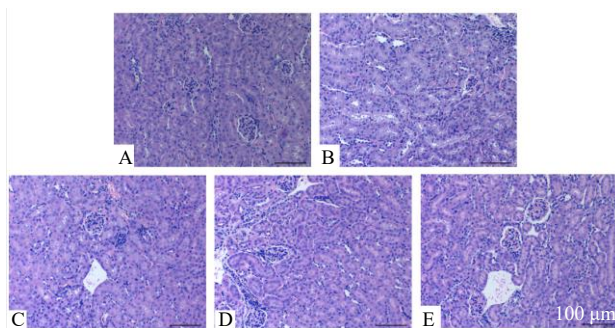
如图 1 和表 2 所示, 与对照组相比, 模型组小鼠肾脏结构紊乱, 管腔扩张变大, 肾组织有空泡, 肾小管边缘损伤, 肾间质有大量炎症细胞浸润, 肾组织损伤评分显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 坝巴酸组和肾石通组小鼠肾组织炎症细胞浸润得到改善, 肾组织边缘较完整, 肾组织损伤评分显著降低 ($P < 0.05$), 表明坝巴酸对肾组织具有保护作用。

3.4 坝巴酸对肾结石小鼠肾钙含量的影响

如表 3 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肾钙含量显著升高 ($P < 0.05$), 表明造模成功; 与模型组比较, 坝巴酸低剂量组和肾石通组小鼠肾钙含量显著降低 ($P < 0.05$), 表明坝巴酸 (10 mg/kg) 具有较好的降低肾钙蓄积作用。

3.5 坝巴酸对肾结石小鼠尿钙含量的影响

如表 4 所示, 与模型组比较, 坝巴酸低剂量组和肾石通组小鼠尿钙含量显著升高 ($P < 0.05$), 表



A-对照组 B-模型组 C-坝巴酸低剂量组 D-坝巴酸高剂量组
E-肾石通组
A-control group B-model group C-low-dose babac acid group
D-high-dose babac acid group E-Shenshitong group

图 1 坝巴酸对肾结石小鼠肾组织病理变化的影响

Fig. 1 Effect of babac acid on pathological changes of kidney tissue in mice with kidney stones

表 2 各组小鼠肾组织损伤评分 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 2 Kidney damage score of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	肾组织损伤评分
对照	—	4.60 ± 1.46
模型	—	129.57 ± 15.68 [#]
坝巴酸	10	53.29 ± 9.24 [*]
	20	43.63 ± 10.52 [*]
肾石通	4500	26.21 ± 8.84 [*]

表 3 坝巴酸高低剂量对肾结石小鼠肾钙含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 3 Effect of babac acid on renal calcium content in mice with kidney stones ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	肾钙含量/(mmol·mg ⁻¹)
对照	—	0.006 ± 0.002
模型	—	0.012 ± 0.002 [#]
坝巴酸	10	0.004 ± 0.001 [*]
	20	0.010 ± 0.004
肾石通	4500	0.005 ± 0.002 [*]

表 4 坝巴酸对肾结石小鼠尿钙含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 4 Effect of babac acid on urinary calcium content in mice with kidney stones ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	尿钙含量/(mmol·L ⁻¹)
对照	—	1.56 ± 0.25
模型	—	1.62 ± 0.23
坝巴酸	10	2.34 ± 0.11 [*]
	20	1.72 ± 0.22
肾石通	4500	2.55 ± 0.15 [*]

明坝巴酸 (10 mg/kg) 具有较好的促进尿钙排出活性, 坝巴酸促进尿钙排出与肾钙含量降低的结果相一致。

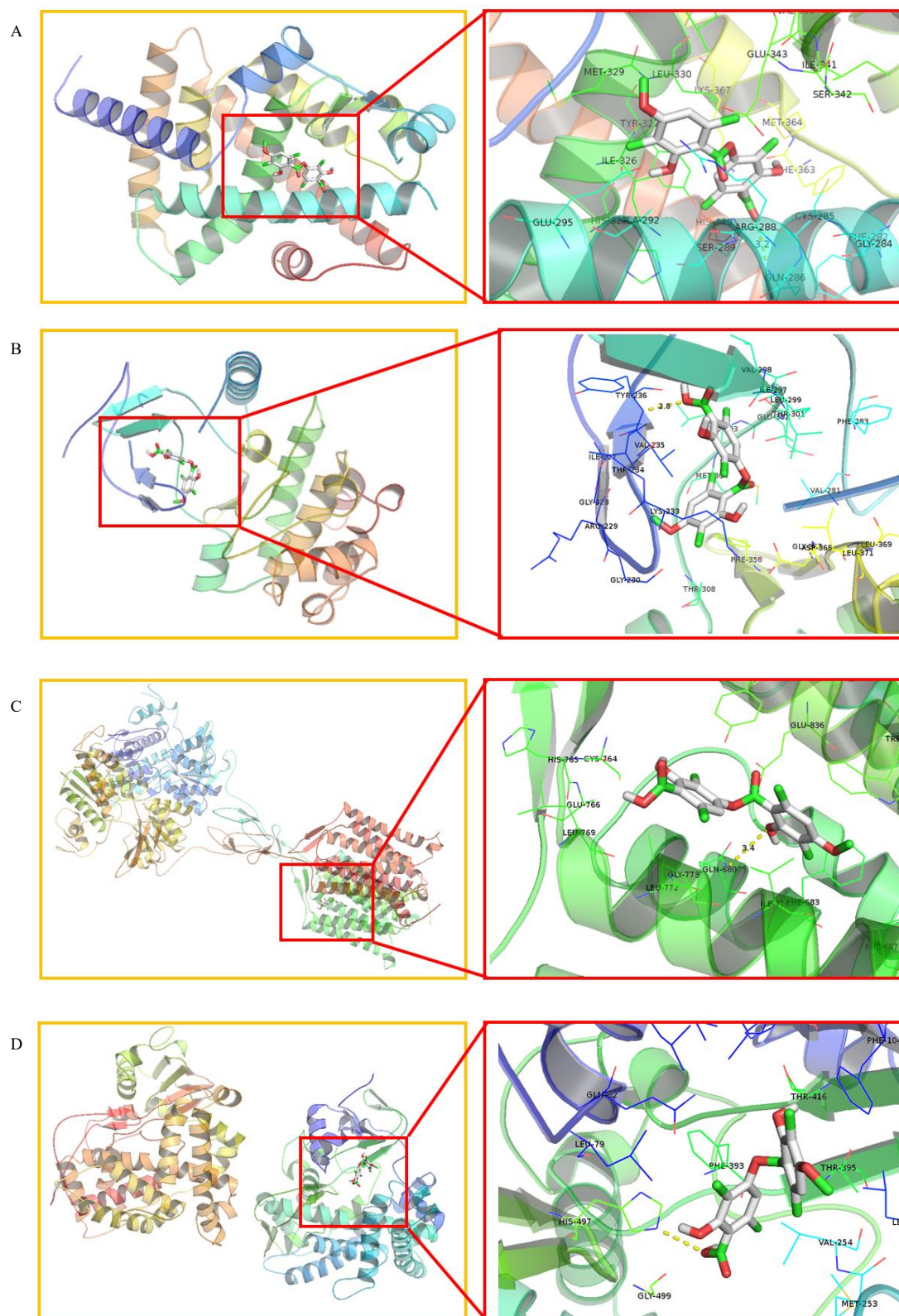
3.6 坝巴酸通淋活性的分子对接验证

将坝巴酸分别与 PPARG、WNK1、CASR、CYP24A1 蛋白进行分子对接, 选取晶体结构的 PDB ID 分别为 6TSG、5DRB、7DD7、3K9Y。化合物与大分子蛋白能否结合主要通过结合能来评价。利用 Auto Dock 软件和 Vina 语言分别进行对接, 得到坝巴酸与以上蛋白的结合能, 分别为 -31、-33、-32、-29 kJ/mol。结合能负值越大代表对接效果越好, 4 种蛋白的结合能均小于 -21 kJ/mol, 表明对接效果较好。其中, 对接效果最优的为坝巴酸与 WNK1 蛋白, 这与本课题组前期研究观测到的坝巴酸具有良好的利尿效果相一致。同时在通淋的靶点 CASR、CYP24A1 也有较好的对接效果。4 种蛋白的分子对接情况见图 2。

4 讨论

现代研究认为, 凡尿频、尿急、排尿障碍或涩痛、淋漓不断的证候统称“淋证”, 分为“石淋”“气淋”“膏淋”“劳淋”“血淋”“热淋”6 种类型。其中以“热淋”“石淋”最为常见, 为中医常见病证。黔产有柄石韦, 味甘、苦, 性微寒, 有利尿通淋、凉血止血的功效。在本课题组前期研究中^[3], 从黔产有柄石韦提取了 21 种单体化合物, 其中坝巴酸在细胞和动物水平上均具有良好的利尿活性。本研究在前期研究的基础上, 联系中医通淋理论, 进一步研究黔产有柄石韦中坝巴酸的通淋活性及作用机制。

在坝巴酸对 LPS 诱导的 MDCK 细胞炎症模型保护作用实验中发现, 100 μmol/L 坝巴酸对 MDCK 细胞活力没有显著影响, 但造模前预给药孵育 24 h 具有显著提高 MDCK 炎症模型细胞活力的作用, 表明坝巴酸对肾小管细胞炎症模型具有保护作用, 可以显著提高炎症细胞活力。动物实验 HE 染色结果进一步表明, 坝巴酸对 1% 乙二醇和 1% NH₄Cl 诱导的肾结石模型小鼠肾组织具有显著保护作用, 肾组织炎性细胞浸润得到较好的改善。研究表明, 巨噬细胞在机体炎症过程发挥重要的作用^[6]。机体组织中的巨噬细胞以 2 种形式出现, 分为促炎型的 M1 型巨噬细胞和抗炎型的 M2 型巨噬细胞^[7]。PPARG 为巨噬细胞由 M1 型转化为 M2 型的关键因子, 因此激活 PPARG 可发挥一定的抗炎作用^[8]。本研究分



棍棒模型为坝巴酸三维结构，螺旋体为蛋白三位结构，每组字符代表 1 个氨基酸

Stick model is three-dimensional structure of babaric acid, spirochetes are three-position structure of protein, and each group of characters represents one amino acid

图 2 坝巴酸与 PPARG (A)、WNK1 (B)、CASR (C)、CYP24A1 (D) 蛋白的分子对接图

Fig. 2 Docking results of babaric acid and PPARG (A), WNK1 (B), CASR (C) and CYP24A1 (D) proteins

子对接结果显示, 坝巴酸与 PPARG 的对接效果较优, 分子对接能为 -31 kJ/mol , 且分子对接图显示对接存在较强的氢键作用。坝巴酸对肾小管炎症的保护作用机制可能与其与 PPARG 有较好的对接活性有关。即坝巴酸通过结合并激活 PPARG, 使得炎症肾小管组织中巨噬细胞转化为具有抗炎作用的 M2 型, 从而发挥抗炎作用, 减轻结石或炎症导致的肾小管损伤。

在 1% 乙二醇和 1% NH_4Cl 诱导的肾结石模型小鼠实验中, 坝巴酸低剂量组小鼠肾钙含量较模型组显著降低, 尿钙含量较模型组显著升高, 与肾石通组水平相当, 表明坝巴酸具有较好的降低肾钙蓄积、促进尿钙排出的活性, 且剂量存在最适范围, 坝巴酸促进尿钙排出与肾钙含量降低的结果相一致。WNK1 通过控制钠离子和氯离子的转运发挥利尿作用, 为利尿药治疗的新兴靶蛋白^[9]。CASR 为表达于肾脏的钙离子感受器^[10], 当血钙浓度升高时, 其可以抑制甲状旁腺激素的释放, 从而减少肾钙的重吸收, 加速肾钙排出, 使血钙浓度降低恢复正常水平^[11-13]。CYP24A1 蛋白可以使得活性维生素 D_3 (vitamin D , VD_3) 侧链羟基化而降解失活^[14], 而活性 VD_3 可促进钙的吸收^[15], 因此 CYP24A1 蛋白的激活可以抑制钙的吸收, 使血钙浓度降低。本研究分子对接结果显示, 坝巴酸与 WNK1、CASR、CYP24A1 蛋白对接效果较优, 且分子对接图均显示存在较强的氢键作用, 表明坝巴酸的利尿活性与 WNK1 蛋白的激活有关。坝巴酸促进肾钙排出可能与其和 CASR 蛋白结合, 发挥调解血钙浓度活性有关; 降低肾钙蓄积与 CYP24A1 蛋白结合, 促进活性 VD_3 降解、抑制钙吸收活性有关。

本研究在前期基础上, 基于中医通淋理论, 从抗炎和肾钙排泄 2 个方面, 从细胞和动物水平, 考察了黔产有柄石韦中坝巴酸的通淋活性, 为进一步研究坝巴酸的通淋活性和机制奠定基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 王亚茹, 杨武德. 黔产有柄石韦对大鼠利尿作用的初步研究 [J]. 时珍国医国药, 2017, 28(11): 2583-2585.
- [2] 陈飞, 罗国勇, 杨武德. 黔产有柄石韦利尿通淋有效部位化学成分研究 [J]. 中药材, 2019, 42(12): 2822-2826.
- [3] 隋怡, 滕明刚, 罗国勇, 等. 基于 NaCl 重吸收抑制作用的石韦利尿活性成分筛选 [J]. 中草药, 2021, 52(4): 1026-1030.
- [4] 王亚茹, 杨武德. 黔产石韦排石作用活性部位的研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(16): 3291-3300.
- [5] Paller M S, Hoidal J R, Ferris T F. Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat [J]. *J Clin Invest*, 1984, 74(4): 1156-1164.
- [6] Xu H, Barnes G T, Yang Q, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance [J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(12): 1821-1830.
- [7] Botta M, Audano M, Sahebkar A, et al. PPAR agonists and metabolic syndrome: An established role? [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(4): 1197.
- [8] Odegaard J I, Ricardo-Gonzalez R R, Goforth M H, et al. Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance [J]. *Nature*, 2007, 447(7148): 1116-1120.
- [9] Cheng C J, Rodan A, Huang C L. Emerging targets of diuretic therapy [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2017, 102(3): 420-435.
- [10] Davey A E, Leach K, Valant C, et al. Positive and negative allosteric modulators promote biased signaling at the calcium-sensing receptor [J]. *Endocrinology*, 2012, 153(3): 1232-1241.
- [11] Pearce S H, Bai M, Quinn S J, et al. Functional characterization of calcium-sensing receptor mutations expressed in human embryonic kidney cells [J]. *J Clin Invest*, 1996, 98(8): 1860-1866.
- [12] Mastromatteo E, Lamacchia O, Campo M R, et al. A novel mutation in calcium-sensing receptor gene associated to hypercalcemia and hypercalciuria [J]. *BMC Endocr Disord*, 2014, 14: 81.
- [13] Kim E S, Kim S Y, Lee J Y, et al. Identification and functional analysis of a novel CaSR mutation in a family with familial hypocalciuric hypercalcemia [J]. *J Bone Miner Metab*, 2016, 34(6): 662-667.
- [14] Sakaki T, Sawada N, Komai K, et al. Dual metabolic pathway of 25-hydroxyvitamin D_3 catalyzed by human CYP24 [J]. *Eur J Biochem*, 2000, 267(20): 6158-6165.
- [15] Sakaki T, Kagawa N, Yamamoto K, et al. Metabolism of vitamin D_3 by cytochromes P450 [J]. *Front Biosci*, 2005, 10: 119-134.

[责任编辑 李亚楠]