

基于 NF- κ B/CREB/RUNX2 通路探讨蒲公英水提物对肾结石大鼠肾脏的保护作用

闫本纯^{1,2}, 李宏伟^{1,2}, 郭青鑫^{1,2}, 房小淇^{1,2}, 代启杨^{1,2}, 南锡浩^{1,2}, 张智慧^{1,2}, 邸彦橙^{1,2}, 田 河^{1,2*}

1. 牡丹江医学院附属红旗医院 泌尿外科, 黑龙江 牡丹江 157000

2. 牡丹江医学院第一临床医学院, 黑龙江 牡丹江 157011

摘要: 目的 基于核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)/环磷酸腺苷应答元件结合蛋白 (cyclic adenosine monophosphate response element binding protein, CREB)/核心结合蛋白因子 2 (runt-related transcription factor-2, RUNX2) 通路探讨蒲公英水提物对肾结石大鼠肾脏的保护作用。方法 通过向饮用水中加入 2%氯化铵、1%乙二醇制备肾结石大鼠, 将造模大鼠随机分为模型组、蒲公英水提物 (低、高剂量 100、200 mg/kg) 组、排石颗粒 (100 mg/kg) 组和蒲公英水提物 (200 mg/kg) + NF- κ B 激活剂 (佛波酯, 5 mg/kg) 组, 并以正常大鼠为对照组。给予药物干预后, 检测大鼠肾功能指标 [尿素氮 (urea nitrogen, BUN)、血肌酐 (blood creatinine, Scr)]、尿生化指标 (尿蛋白、Ca²⁺)、肾脏指数、血清中炎症因子 [白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、IL-1 β]、肾组织中氧化应激指标 [丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)] 水平; 采用苏木素-伊红 (HE) 染色观察肾组织病理变化; TUNEL 染色检测肾组织细胞凋亡情况; Western blotting 检测肾组织中 NF- κ B/CREB/RUNX2 通路相关蛋白表达。结果 与对照组比较, 模型组大鼠血清中 BUN、Scr、尿蛋白、Ca²⁺、IL-6、IL-1 β 水平以及肾脏指数、肾组织 MDA 水平、细胞凋亡率、肾组织 p-NF- κ B p65/NF- κ B p65、p-CREB/CREB、RUNX2 表达均显著升高 ($P < 0.05$), 肾组织 SOD 活性显著降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 蒲公英水提物各剂量组和排石颗粒组血清中 BUN、Scr、尿蛋白、Ca²⁺、IL-6、IL-1 β 水平以及肾指数、肾组织 MDA 水平、细胞凋亡率、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65、p-CREB/CREB、RUNX2 表达显著降低 ($P < 0.05$), 肾组织 SOD 活性显著升高 ($P < 0.05$)。给予 NF- κ B 激活剂后, 蒲公英水提物对以上指标的作用均被显著逆转 ($P < 0.05$)。结论 蒲公英水提物可通过调节 NF- κ B/CREB/RUNX2 通路保护肾结石大鼠肾脏。

关键词: 蒲公英水提物; 芦丁; 总黄酮; NF- κ B/CREB/RUNX2 通路; 肾结石; 肾脏

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)14-4796-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.14.016

Protective effect of water extract of *Taraxaci Herba* on kidneys of rats with kidney stones based on NF- κ B/CREB/RUNX2 pathway

YAN Benchun^{1,2}, LI Hongwei^{1,2}, GUO Qingxin^{1,2}, FANG Xiaoqi^{1,2}, DAI Qiyang^{1,2}, NAN Xihao^{1,2}, ZHANG Zhihui^{1,2}, DI Yancheng^{1,2}, TIAN He^{1,2}

1. Department of Urinary Surgery, Hongqi Hospital Affiliated to Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157000, China

2. First Clinical Medical College, Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157011, China

Abstract: Objective To explore the protective effect of water extract of Pugongying (*Taraxaci Herba*) on kidney of rats with kidney stones based on nuclear factor- κ B (NF- κ B)/cyclic adenosine monophosphate response element binding protein (CREB)/runt-related transcription factor-2 (RUNX2) pathway. **Methods** Kidney stone rats were prepared by adding 2% ammonium chloride and 1% ethylene glycol to drinking water. The model rats were randomly divided into model group, water extract of *Taraxaci Herba* low-, high-dose (100, 200 mg/kg) groups, Paishi Granules (排石颗粒, 100 mg/kg) group and water extract of *Taraxaci Herba* (200 mg/kg) + NF- κ B-activator (phorbol ester, 5 mg/kg) group, with normal rats as the control group. After drug intervention, renal function indicators such as urea nitrogen (BUN), serum creatinine (Scr), urine biochemistry indicators such as urinary protein and Ca²⁺, renal index, inflammatory factors such as interleukin-6 (IL-6) and IL-1 β in serum and oxidative stress indicators such as

收稿日期: 2024-04-12

基金项目: 黑龙江省省属高等学校基本科研业务费科研项目 (2020-KYYWFMY-0030)

作者简介: 闫本纯 (1989—), 男, 硕士, 主治医师, 主要从事泌尿生殖系统肿瘤研究。Tel: (0453)6602102 E-mail: nms613@163.com

*通信作者: 田 河 (1980—), 男, 硕士, 副主任医师, 主要从事泌尿肿瘤与结石基础及临床研究。Tel: (0453)6602102 E-mail: xeqyvn@163.com

malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) in renal tissue were detected; Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe pathological changes in renal tissue; TUNEL staining was used to detect apoptosis in renal tissue cells; Western blotting was used to detect the expressions of NF- κ B/CREB/RUNX2 pathway related proteins in renal tissue. **Results** Compared with control group, levels of BUN, Scr, urinary protein, Ca^{2+} , IL-6, IL-1 β in serum and renal index, MDA level, cell apoptosis rate, p-NF- κ B p65/NF- κ B p65, p-CREB/CREB and RUNX2 expressions in renal tissue of rats in model group were significantly increased ($P < 0.05$), SOD activity in renal tissue was significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with model group, levels of BUN, Scr, urinary protein, Ca^{2+} , IL-6, IL-1 β in serum and renal index, MDA level, cell apoptosis rate, p-NF- κ B p65/NF- κ B p65, p-CREB/CREB and RUNX2 expressions in renal tissue of rats in water extract of *Taraxaci Herba* low-, high-dose groups and Paishi Granules group were significantly reduced ($P < 0.05$), SOD activity in renal tissue was significantly increased ($P < 0.05$). After administering NF- κ B activators, the effects of water extract of *Taraxaci Herba* on the above indicators were significantly reversed ($P < 0.05$). **Conclusion** Water extract of *Taraxaci Herba* can protect the kidney of rats with kidney stones by regulating NF- κ B/CREB/RUNX2 pathway.

Key words: water extract of *Taraxaci Herba*; rutin; total flavonoids; NF- κ B/CREB/RUNX2 pathway; kidney stones; kidney

肾结石是非常重要的泌尿系统问题，其患病率和复发率逐年增加。尽管肾结石不会危及生命，但可损害肾脏，且最终会导致慢性肾病^[1-2]。微创手术取出结石是目前肾结石主要方法，但其复发率依然较高。相比之下，药物治疗更安全、方便^[3]，因此开发能够安全、有效治疗肾结石的药物至关重要。

肾结石形成的发病机制是一个复杂的过程，尿液的初始过饱和之后是成核、晶体形成及滞留，进而引发尿路感染，改变黏膜表面的性状，可导致体内发生炎症反应、氧化应激，进而引发肾损伤，因此寻找抗炎、抗氧化的药物可有效治疗肾结石^[4]。蒲公英 *Taraxaci Herba* 具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等多种活性作用^[5]，药用价值较为广泛，是锦红汤、温阳败毒等多种中药方剂的主要组成成分，可抑制炎症进展，改善脓毒症大鼠肾功能障碍^[6]，但其在肾结石的治疗中鲜有报道。核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 通路能够被多种炎症因子刺激激活，抑制 NF- κ B 通路活化可减缓大鼠肾结石形成^[7]。NF- κ B 参与环磷酸腺苷应答元件结合蛋白 (cyclic adenosine monophosphate response element binding protein, CREB) 磷酸化，同时作为核心结合蛋白因子 2 (runt-related transcription factor-2, RUNX2) 的转录因子，在成骨细胞分化中发挥作用，而超过 70% 结石类型为草酸钙结石，其起源于肾乳头钙化斑块 Randall 斑，与肾组织细胞成骨分化有关，而 RUNX2 是骨基质蛋白沉积的关键转录调节因子，参与钙化沉积的发展^[8-9]。本研究旨在探讨蒲公英水提物对肾结石大鼠肾脏的保护作用及相关机制。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠，体质量 200~240 g，购

自长沙市海天勤公司，合格证号 SCXK (湘)-2019-0002。动物饲养在温度 22~25 $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 50%~60% 的环境中，自由进食饮水。动物实验经牡丹江医学院附属红旗医院伦理委员会批准 (批准号 202067)。

1.2 药材

蒲公英 (批号 202206018) 购自黑龙江福久堂中药饮片有限责任公司，经牡丹江医学院附属红旗医院药学部王加良副主任药师鉴定为菊科植物蒲公英 *Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz. 的干燥全草。

1.3 药品与试剂

排石颗粒 (批号 220806-2) 购自江西南昌济生制药有限责任公司；NF- κ B 激活剂佛波酯 (批号 79346-1MG) 购自美国 Sigma 公司；氯化铵 (批号 HXSJ-020160) 购自青岛捷世康生物科技有限公司；乙二醇 (批号 XY25695) 购自上海信裕生物科技有限公司；白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 试剂盒 [批号 JN-(Ea)-04037]、IL-1 β 试剂盒 [批号 BIO-(tw)-1622] 购自美国 R&D 公司；丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 试剂盒 (批号 YS04756P)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 试剂盒 (批号 Im-03914B) 购自上海雅吉公司；封闭缓冲液 (批号 P0252) 购自碧云天生物技术公司；HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗 (批号 ab205718) 购自艾博抗贸易有限公司；NF- κ B p65 抗体 (批号 ab32536)、p-NF- κ B p65 抗体 (批号 ab76302)、p-CREB 抗体 (批号 ab32096)、CREB 抗体 (批号 ab32515)、RUNX2 抗体 (批号 ab264077)、 β -actin 抗体 (批号 8226) 购自英国 Abcam 公司。

1.4 仪器

HBS-ScanX 全波长酶标仪 (南京德铁实验设备

有限公司); HM450 型切片机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); BX51 型光学显微镜(日本奥林巴斯公司); MODULARP800 型全自动生化分析仪(德国罗氏公司); X-30/30R 型台式高速离心机(美国 Beckman Coulter 公司); POWERPAC 电泳仪(美国 Bio-Bad 公司)。

2 方法

2.1 蒲公英水提物的制备

称取蒲公英干燥全草, 加入 8 倍量水煮沸, 提取 3 次, 合并提取液并滤过, 浓缩并干燥, 粉碎, 得蒲公英水提物粉末, 干膏得率 16.80%。按参考文献方法^[10], 以芦丁为对照品对蒲公英总黄酮含量进行检测, 结果显示, 蒲公英总黄酮质量分数为 5.97%。

称取蒲公英水提物粉末 2.0 g, 用生理盐水溶解并稀释至 50 mL, 振荡均匀, 制得 40 mg/mL 蒲公英水提物用于高剂量组给药。精密吸取上述溶液 10 mL, 用生理盐水稀释至 20 mL, 制得 20 mg/mL 蒲公英水提物用于低剂量组给药。

2.2 肾结石大鼠模型的制备、分组及给药

随机选取 10 只大鼠作为对照组, 其余大鼠按照文献方法^[11]制备肾结石大鼠模型。每日同一时间向大鼠饮用水中加入 2%氯化铵、1%乙二醇, 1 mL/次, 2 次/d, 该过程共 2 周, 当大鼠出现精神懈怠、毛发无光泽且发黄, 并出现爪部屈曲, 表明肾结石大鼠模型制备成功。将造模成功的 50 只大鼠随机分为模型组、蒲公英水提物(低、高剂量 100、200 mg/kg)组、排石颗粒(100 mg/kg)^[12]组和蒲公英水提物(200 mg/kg) + 激活剂(佛波酯, 5 mg/kg)^[13]组。各给药组 ig 蒲公英水提物或 ig 排石颗粒(5 mL/kg)组或 ip 佛波酯, 对照组和模型组 ig 等体积的生理盐水, 1 次/d, 连续给药 30 d。

2.3 肾功能及尿生化指标检测

实验结束后, 于次日同一时间收集大鼠 24 h 尿液, 全自动分析仪检测尿液中尿蛋白及 Ca^{2+} 含量; 腹部收集大鼠血液, 全自动分析仪检测尿素氮(urea nitrogen, BUN)、血肌酐(blood creatinine, Scr)水平。

2.4 肾脏指数测定

给药结束后, 称取大鼠体质量, 分离肾脏并称取质量, 计算肾脏指数。

肾脏指数 = 肾脏质量/体质量

2.5 血清中炎症因子水平测定

取各组大鼠血清样本, 按照试剂盒说明书检测

血清中 IL-6、IL-1 β 水平。

2.6 肾组织中氧化应激水平测定

取大鼠右肾组织, 然后加入预冷的 PBS, 将组织进行匀浆, 离心后, 收集组织上清液, 按照试剂盒说明书检测肾组织 MDA 水平和 SOD 活性。

2.7 苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色观察肾组织病理学变化

使用 10%福尔马林溶液固定肾组织, 用梯度乙醇进行脱水, 并用甲苯清洗组织。将石蜡包埋的样品用旋转式切片机切成 5 μm 切片, 切片在苏木素中染色, 并用蒸馏水中漂洗, 然后放入盐酸-乙醇水化, 并放入伊红溶液染色, 在脱水和去除二甲苯后, 用中性树胶密封组织切片, 于显微镜下观察组织病理变化。

2.8 TUNEL 染色检测肾组织细胞凋亡情况

取各组大鼠肾组织切片, 加入 50 μL TUNEL 检测溶液, 室温下避光孵育, 在 PBS 中漂洗 3 次后, 用 DAPI 溶液对细胞进行核染色。最后使用显微镜观察细胞凋亡变化, 其中凋亡细胞为棕褐色。

2.9 Western blotting 检测肾组织 NF- κB /CREB/RUNX2 通路相关蛋白表达

取各组大鼠肾组织, 加入 RIPA 裂解液提取蛋白, 采用 BCA 试剂盒定量后, 蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 封闭后, 分别加入 NF- κB p65、p-NF- κB p65、p-CREB、CREB、RUNX2、 β -actin 抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 加入二抗, 室温孵育, 洗膜后, 使用增强化学发光试剂显影, 用成像系统进行扫描和分析。

2.10 统计学分析

采用 SPSS 27.0 软件分析实验数据, 单因素方差分析用于多组间比较, 以 $\text{snk-}q$ 检验进一步两两比较, 所有资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 蒲公英水提物对肾结石大鼠肾功能的影响

如表 1 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠血清中 BUN、Scr 水平显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 蒲公英水提物各剂量组和排石颗粒组大鼠血清中 BUN、Scr 水平均显著降低 ($P < 0.05$); 与蒲公英水提物高剂量组比较, 蒲公英水提物 + 佛波酯组 BUN、Scr 水平显著升高 ($P < 0.05$)。

3.2 蒲公英水提物对肾结石大鼠尿生化指标的影响

如表 2 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠尿蛋白、 Ca^{2+} 水平显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较,

表 1 蒲公英水提取物对肾结石大鼠肾功能的影响
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of water extract of *Taraxaci Herba* on renal function in rats with kidney stones ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	BUN/ (mmol·L ⁻¹)	Scr/ (μmol·L ⁻¹)
对照	—	8.95 ± 0.92	6.24 ± 0.67
模型	—	28.15 ± 2.86*	26.85 ± 2.72*
蒲公英水提取物	100	19.24 ± 1.98 [#]	18.04 ± 1.85 [#]
	200	10.52 ± 1.10 ^{#S}	9.08 ± 0.93 ^{#S}
排石颗粒	100	10.85 ± 1.12 ^{#S}	9.11 ± 0.94 ^{#S}
蒲公英水提取物 + 佛波酯	200 + 5	18.96 ± 1.92 ^{&}	17.88 ± 1.82 ^{&}

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与蒲公英水提取物低剂量组比较: ^S $P < 0.05$; 与蒲公英水提取物高剂量组比较: [&] $P < 0.05$, 下表同。

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; ^S $P < 0.05$ vs water extract of *Taraxaci Herba* low-dose group; [&] $P < 0.05$ vs water extract of *Taraxaci Herba* high-dose group, same as below tables.

表 2 蒲公英水提取物对肾结石大鼠尿生化指标的影响
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of water extract of *Taraxaci Herba* on urinary biochemical indicators in rats with kidney stones ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	尿蛋白/mg	Ca ²⁺ / (μmol·L ⁻¹)
对照	—	9.42 ± 0.99	7.31 ± 0.76
模型	—	21.05 ± 2.12*	30.24 ± 3.15*
蒲公英水提取物	100	14.06 ± 1.45 [#]	19.46 ± 1.99 [#]
	200	9.76 ± 0.98 ^{#S}	9.45 ± 0.99 ^{#S}
排石颗粒	100	9.88 ± 0.99 ^{#S}	10.02 ± 1.08 ^{#S}
蒲公英水提取物 + 佛波酯	200 + 5	13.99 ± 1.41 ^{&}	18.76 ± 1.91 ^{&}

蒲公英水提取物各剂量组和排石颗粒组尿蛋白、Ca²⁺水平显著降低 ($P < 0.05$); 与蒲公英水提取物高剂量组比较, 蒲公英水提取物 + 佛波酯组尿蛋白、Ca²⁺水平显著升高 ($P < 0.05$)。

3.3 蒲公英水提取物对肾结石大鼠肾脏指数的影响

如表 3 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠肾脏指数显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 蒲公英水提取物各剂量组和排石颗粒组肾脏指数显著降低 ($P < 0.05$); 与蒲公英水提取物高剂量组比较, 蒲公英水提取物 + 佛波酯组肾脏指数显著升高 ($P < 0.05$)。

3.4 蒲公英水提取物对肾结石大鼠血清中炎症因子水平的影响

如表 4 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠血清中 IL-6、IL-1β 水平显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 蒲公英水提取物各剂量组和排石颗粒组 IL-6、

表 3 蒲公英水提取物对肾结石大鼠肾脏指数的影响
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of water extract of *Taraxaci Herba* on kidney index in rats with kidney stones ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	肾指数/(mg·g ⁻¹)
对照	—	8.02 ± 0.81
模型	—	18.11 ± 1.83*
蒲公英水提取物	100	14.11 ± 1.43 [#]
	200	8.96 ± 0.91 ^{#S}
排石颗粒	100	9.01 ± 0.92 ^{#S}
蒲公英水提取物 + 佛波酯	200 + 5	14.02 ± 1.41 ^{&}

表 4 蒲公英水提取物对肾结石大鼠血清中 IL-6、IL-1β 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of water extract of *Taraxaci Herba* on levels of IL-6, IL-1β in serum of rats with kidney stones ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	IL-6/ (pg·mg ⁻¹)	IL-1β/ (pg·mg ⁻¹)
对照	—	18.34 ± 1.87	3.06 ± 0.32
模型	—	48.16 ± 4.85*	11.06 ± 1.14*
蒲公英水提取物	100	37.16 ± 3.73 [#]	7.25 ± 0.74 [#]
	200	20.06 ± 2.08 ^{#S}	4.11 ± 0.43 ^{#S}
排石颗粒	100	21.16 ± 2.16 ^{#S}	4.27 ± 0.45 ^{#S}
蒲公英水提取物 + 佛波酯	200 + 5	37.03 ± 3.72 ^{&}	7.13 ± 0.73 ^{&}

IL-1β 水平显著降低 ($P < 0.05$); 与蒲公英水提取物高剂量组比较, 蒲公英水提取物 + 佛波酯组 IL-6、IL-1β 水平显著升高 ($P < 0.05$)。

3.5 蒲公英水提取物对肾结石大鼠肾组织氧化应激水平的影响

如表 5 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠肾组织 MDA 水平显著升高 ($P < 0.05$), SOD 活性显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 蒲公英水提取物各剂量组和排石颗粒组 MDA 水平显著降低 ($P < 0.05$),

表 5 蒲公英水提取物对肾结石大鼠肾组织 MDA 水平和 SOD 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effect of water extract of *Taraxaci Herba* on MDA level and SOD activity in renal tissue of rats with kidney stones ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	MDA/ (nmol·mg ⁻¹)	SOD/ (U·mg ⁻¹)
对照	—	0.44 ± 0.05	72.06 ± 7.23
模型	—	1.35 ± 0.14*	31.02 ± 3.12*
蒲公英水提取物	100	0.82 ± 0.09 [#]	40.02 ± 4.06 [#]
	200	0.53 ± 0.06 ^{#S}	69.43 ± 6.99 ^{#S}
排石颗粒	100	0.57 ± 0.06 ^{#S}	70.01 ± 7.03 ^{#S}
蒲公英水提取物 + 佛波酯	200 + 5	0.88 ± 0.09 ^{&}	39.47 ± 3.98 ^{&}

SOD 水平显著升高 ($P<0.05$); 与蒲公英水提取物高剂量组比较, 蒲公英水提取物+佛波酯组 MDA 水平显著升高 ($P<0.05$), SOD 水平显著降低 ($P<0.05$)。

3.6 蒲公英水提取物对肾结石大鼠肾组织病理变化的影响

如图 1 所示, 对照组大鼠肾组织结构完整, 病理损伤不明显; 模型组肾组织有炎性浸润, 肾小管扩张或变形; 给予蒲公英水提取物及排石颗粒干预后, 肾组织病理损伤被改善; 但联合激活剂后, 肾损伤

较蒲公英水提取物单一治疗加重。

3.7 蒲公英水提取物对肾结石大鼠肾组织细胞凋亡的影响

如图 2 和表 6 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠肾组织细胞凋亡率显著升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 蒲公英水提取物各剂量组和排石颗粒组细胞凋亡率显著降低 ($P<0.05$); 与蒲公英水提取物高剂量组比较, 蒲公英水提取物+佛波酯组肾组织细胞凋亡率显著升高 ($P<0.05$)。

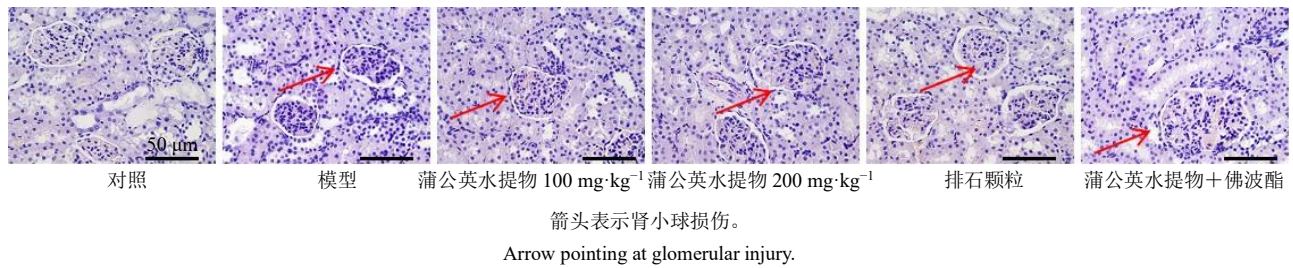


图 1 蒲公英水提取物对肾结石大鼠肾组织病理变化的影响 (HE, ×200)

Fig. 1 Effect of water extract of *Taraxaci Herba* on pathological changes in renal tissue of rats with kidney stones (HE, ×200)

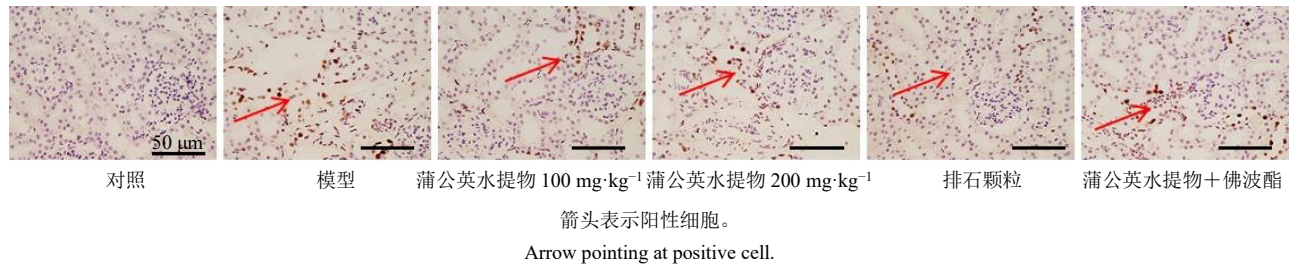


图 2 蒲公英水提取物对肾结石大鼠肾组织细胞凋亡的影响 (TUNEL, ×200)

Fig. 2 Effect of water extract of *Taraxaci Herba* on apoptosis in renal tissue cells in rats with kidney stones (TUNEL, ×200)

表 6 蒲公英水提取物对肾结石大鼠肾组织细胞凋亡的影响

($\bar{x} \pm s, n=10$)

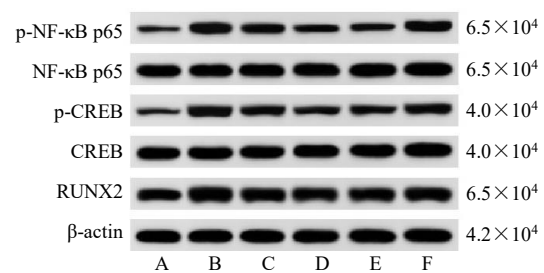
Table 6 Effect of water extract of *Taraxaci Herba* on apoptosis of renal tissue cells in rats with kidney stones

($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	凋亡率/%
对照	—	5.88±0.62
模型	—	21.07±2.15*
蒲公英水提取物	100	15.64±1.58 [#]
	200	9.73±0.99 [#]
排石颗粒	100	9.68±0.98 [#]
蒲公英水提取物+佛波酯	200+5	15.22±1.57 ^{&}

3.8 蒲公英水提取物对肾结石大鼠肾组织 NF-κB/CREB/RUNX2 通路相关蛋白表达的影响

如图 3 和表 7 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠肾组织 p-NF-κB p65/NF-κB p65、p-CREB/CREB、RUNX2 表达显著升高 ($P<0.05$); 与模型组比较,



A-对照组; B-模型组; C-蒲公英水提取物低剂量组; D-蒲公英水提取物高剂量组; E-排石颗粒组; F-蒲公英水提取物+佛波酯组。

A-control group; B-model group; C-water extract of *Taraxaci Herba* low-dose group; D-water extract of *Taraxaci Herba* high-dose group; E-Paishi Granules group; F- water extract of *Taraxaci Herba* + phorbol ester group.

图 3 蒲公英水提取物对肾结石大鼠肾组织 NF-κB/CREB/RUNX2 通路相关蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of water extract of *Taraxaci Herba* on expressions of NF-κB/CREB/RUNX2 pathway related proteins in renal tissue of rats with kidney stones

表 7 蒲公英水提取物对肾结石大鼠肾组织 NF-κB/CREB/RUNX2 通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 7 Effect of water extract of *Taraxaci Herba* on expressions of NF-κB/CREB/RUNX2 pathway related proteins in renal tissue of rats with kidney stones ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	p-NF-κB p65/NF-κB p65	p-CREB/CREB	RUNX2/β-actin
对照	—	0.21 ± 0.03	0.18 ± 0.02	0.61 ± 0.07
模型	—	0.83 ± 0.09*	0.76 ± 0.08*	1.56 ± 0.17*
蒲公英水提取物	100	0.55 ± 0.07 [#]	0.49 ± 0.05 [#]	1.16 ± 0.13 [#]
	200	0.26 ± 0.03 ^{#S}	0.22 ± 0.03 ^{#S}	0.77 ± 0.08 ^{#S}
排石颗粒	100	0.24 ± 0.03 ^{#S}	0.26 ± 0.03 ^{#S}	0.72 ± 0.08 ^{#S}
蒲公英水提取物+佛波酯	200+5	0.53 ± 0.07 ^{&}	0.43 ± 0.05 ^{&}	1.12 ± 0.13 ^{&}

蒲公英水提取物各剂量组和排石颗粒组 p-NF-κB p65/NF-κB p65、p-CREB/CREB、RUNX2 表达显著降低 ($P < 0.05$)；与蒲公英水提取物高剂量组比较，蒲公英水提取物+佛波酯组 p-NF-κB p65/NF-κB p65、p-CREB/CREB、RUNX2 表达显著升高 ($P < 0.05$)。

4 讨论

肾结石是一种常见的泌尿系统疾病，通常因结晶物质过饱和而出现，会导致高血压、慢性肾病和终末期肾病，长期以来对人类健康产生严重影响，尽管其治疗取得了显著进步，但在许多发达国家其患病率尤其是复发率，仍在逐年上升^[14-15]。因此研究肾结石的内在机制和治疗方法迫在眉睫。

研究表明肾结石大鼠中氧化应激水平增加，破坏体内氧化还原平衡，而 MDA 可以反映体内细胞过氧化的程度，SOD 可反映抗氧化应激的能力^[16]。氧化应激可激活炎症反应，炎症会促进肾细胞损伤、组织损伤，聚集更多炎症细胞从而进一步加剧炎症过程，加速成石过程，因此抑制促炎细胞因子（如 IL-1β、IL-6）和氧化应激介质的释放可以显著缓解肾结石损伤和细胞凋亡^[17-19]。在肾结石发展过程中，堵塞的肾小管及尿路可导致尿液中代谢废物如 Ca²⁺ 以及肾功能的常用生化指标如 BUN、SCr 异常增加，表明肾功能遭到损害^[20]。本研究通过乙二醇及氯化铵建立大鼠肾结石，乙醇脱氢酶在肝脏中代谢后，形成毒性副产物，并以草酸钙的形式在肾脏中聚集，损伤大鼠肾功能^[21]。结果显示肾结石大鼠 BUN、Scr、Ca²⁺ 水平以及肾指数明显增加，尿蛋白异常，MDA、IL-6、IL-1β 水平显著提高，SOD 活性显著降低，肾组织受损，进一步表明肾结石大鼠构建成功。蒲公英作为传统的抗炎、抗氧化中药，具有利胆保肝、清热解毒、散结祛瘀等功效，其提取物可显著降低炎症水平，减轻关节炎大鼠炎症水平^[22]，因此推测蒲公英水提取物可能降低肾结石大鼠氧化应激、炎症反应。结果显示，经蒲公英水提取物治疗后，

上述指标得到逆转，肾功能得到改善，炎症反应及氧化应激被抑制，肾组织损伤得到改善，剂量越高，作用效果较佳，并接近于阳性药，表明蒲公英水提取物在一定范围内，剂量越高，药效越显著，但其机制仍不清楚。

NF-κB 是一种重要的核转录因子，调节细胞存活、增殖、分化和凋亡起重要作用，被认为是经典的炎症反应途径^[23]。已有研究表明草酸盐激活内质网应激/活性氧/NF-κB 信号通路诱导肾小管上皮细胞损伤，为肾结石提供治疗机制^[24]。CREB 是一种转录因子，与环磷酸腺苷反应元件结合并调节多种基因的表达，与氧化应激引发的细胞损伤有关，可能成为肾结石疾病治疗的潜在靶点^[25]。兰德尔斑块是肾结石发展的前兆，研究显示高钙尿症患者兰德尔斑块组织中 Runx2、骨钙素（osteocalcin, OCN）和骨桥蛋白（osteopontin, OPN）蛋白水平较高，可能参与肾结石发病机制^[26]。徐旭红等^[27]研究表明大蒜素可以延缓肾结石形成，可能与抑制 NF-κB 信号通路及 OPN 有关。本研究发现肾结石肾组织中 p-NF-κB p65/NF-κB p65、p-CREB/CREB、RUNX2 表达显著增加，大鼠肾组织受损严重，表明激活 NF-κB/CREB/RUNX2 通路可能对肾结石的产生有关。但经蒲公英水提取物治疗后，肾组织中 p-NF-κB p65/NF-κB p65、p-CREB/CREB、RUNX2 表达下调，大鼠病理损伤得到缓解，推测蒲公英水提取物对肾结石的抗炎及抗氧化作用可能与抑制 NF-κB/CREB/RUNX2 通路有关。本研究以 NF-κB 激活剂进行验证，发现给予激活剂后，上调了 p-NF-κB p65/NF-κB p65、p-CREB/CREB、RUNX2 表达，大鼠肾组织明显受损，逆转了蒲公英水提取物对肾结石大鼠的保护作用，表明蒲公英水提取物可能为治疗肾结石的药物。

综上，蒲公英水提取物可通过调节 NF-κB/CREB/RUNX2 通路保护肾结石大鼠肾脏，减轻氧化应激

及炎症反应,改善大鼠肾功能,为肾结石的治疗提供新方法,但疾病及药物涉及通路较为复杂,后续还将针对其上下游进行探索。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Huang Z Y, Wang G, Yang B W, *et al.* Mechanism of ketotifen fumarate inhibiting renal calcium oxalate stone formation in SD rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 151: 113147.
- [2] Lordumrongkiat N, Chotechuang N, Prasanth M I, *et al.* HydroZitLa inhibits calcium oxalate stone formation in nephrolithic rats and promotes longevity in nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 5102.
- [3] Huang J J, Yao X P, Zhang P, *et al.* Curcumin alleviated oxidation stress injury by mediating osteopontin in nephrolithiasis rats [J]. *Acta Cir Bras*, 2023, 38: e380223.
- [4] 邓茂放, 陈彤, 王会镇, 等. 乌梅提取物对肾结石模型大鼠肾功能的保护作用及机制研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(15): 1872-1874.
- [5] 刘晓燕, 龙凤, 赵玉, 等. 蒲公英中有效成分抗肿瘤作用机制的研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(10): 3391-3400.
- [6] 谢晶, 许惠仙, 郭冬冬. 蒲公英根叶提取物通过调控炎症反应和氧化应激改善脓毒症大鼠急性肾损伤 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2020, 21(10): 901-904.
- [7] 徐旭红, 孙建明, 张伦中, 等. 大蒜素通过抑制 OPN 表达和 NF- κ B 通路活化对大鼠肾结石形成的作用研究 [J]. 生物技术进展, 2022, 12(2): 305-312.
- [8] Li S J, Cheng W L, Kao Y H, *et al.* Melatonin inhibits NF- κ B/CREB/Runx2 signaling and alleviates aortic valve calcification [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2022, 9: 885293.
- [9] 雷波, 邱明星, 刘健男. MiR-23b-3p 调控肾间质成纤维细胞成骨样分化参与 Randall 斑形成的机制研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(12): 2064-2072.
- [10] 贾娟, 王婷婷, 侯亚芳. 超声提取法和微波提取法对蒲公英总黄酮提取效果影响的研究 [J]. 安徽农业科学, 2022, 50(15): 146-151.
- [11] 刘敬峰, 张峰, 曲志梅. 汉黄芩素对肾结石大鼠生化指标、肾组织病理及 TGF- β 1 的研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2022, 49(12): 149-153.
- [12] 王瑞, 安熠, 韩晗, 等. 基于 PI3K/Akt/mTOR 通路探讨排石冲剂对草酸钙肾结石大鼠的作用机制 [J]. 湖北中医药大学学报, 2022, 24(1): 13-17.
- [13] 郭念湘, 牛俊豪, 张中沛, 等. 红景天苷对大鼠肾移植后缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 现代泌尿外科杂志, 2022, 27(2): 156-160.
- [14] Dong C T, Song C, He Z Q, *et al.* Protective efficacy of schizandrin B on ameliorating nephrolithiasis via regulating GSK3 β /Nrf2 signaling-mediated ferroptosis *in vivo* and *in vitro* [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 117: 110042.
- [15] Cui Z L, Li Y W, Liu G R, *et al.* MiR-103a-3p silencing ameliorates calcium oxalate deposition in rat kidney by activating the UMOD/TRPV5 axis [J]. *Dis Markers*, 2022, 2022: 2602717.
- [16] 郑新, 于斌, 李育欣, 等. 枳椇皮提取物对泌尿结石大鼠肾功能及 c-jun 氨基末端激酶信号通路的调节作用及其机制 [J]. 解剖学杂志, 2022, 45(5): 412-416.
- [17] Han M, Zhang D H, Ji J W, *et al.* Downregulating miR-184 relieves calcium oxalate crystal-mediated renal cell damage via activating the Rap1 signaling pathway [J]. *Aging*, 2023, 15(24): 14749-14763.
- [18] Dong F, Jiang S, Tang C, *et al.* Trimethylamine N-oxide promotes hyperoxaluria-induced calcium oxalate deposition and kidney injury by activating autophagy [J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 179: 288-300.
- [19] Tian L, Liu Y, Xu X F, *et al.* *Lactiplantibacillus plantarum* J-15 reduced calcium oxalate kidney stones by regulating intestinal microbiota, metabolism, and inflammation in rats [J]. *FASEB J*, 2022, 36(6): e22340.
- [20] 邸彦橙, 王志龙, 张智慧, 等. 白藜芦醇通过调控 Keap1-Nrf2/HO-1 信号通路抑制大鼠肾草酸钙结石的形成 [J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(1): 70-74.
- [21] Gumru S, Ozgur G, Ertas B, *et al.* Ethanolic extract of *cotinus coggygria* leaves attenuates crystalluria and kidney damage in ethylene glycol-induced urolithiasis in rats [J]. *North Clin Istanb*, 2023, 10(6): 734-744.
- [22] 杨超, 闫庆梓, 唐洁, 等. 蒲公英挥发油成分分析及其抗炎抗肿瘤活性研究 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(7): 3106-3111.
- [23] Capece D, Verzella D, Flati I, *et al.* NF- κ B: Blending metabolism, immunity, and inflammation [J]. *Trends Immunol*, 2022, 43(9): 757-775.
- [24] Ming S X, Tian J, Ma K, *et al.* Oxalate-induced apoptosis through ERS-ROS-NF- κ B signalling pathway in renal tubular epithelial cell [J]. *Mol Med*, 2022, 28(1): 88.
- [25] Yu L, Gan X G, Bai Y F, *et al.* CREB1 protects against the renal injury in a rat model of kidney stone disease and calcium oxalate monohydrate crystals-induced injury in NRK-52E cells [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2021, 413: 115394.
- [26] Cui Y, Zeng F, Zhu Z W, *et al.* Suppression of osteogenic-like differentiation in human renal interstitial fibroblasts by miRNA-410-3p through MSX2 [J]. *Transl Androl Urol*, 2020, 9(5): 2082-2093.
- [27] 徐旭红, 孙建明, 张伦中, 等. 大蒜素通过抑制 OPN 表达和 NF- κ B 通路活化对大鼠肾结石形成的作用研究 [J]. 生物技术进展, 2022, 12(2): 305-312.

[责任编辑 李亚楠]