石淋清颗粒对大鼠草酸钙肾结石的影响及机制Δ

杨　雄[1*]，靳潇潇[2]，李卫胜[2]，郑　聪[2]，何文强[2#]（1.南阳市第二人民医院泌尿男科，河南 南阳　473000；2.河南中医药大学第一附属医院泌尿外科二区，郑州　450003）

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2024）22-2750-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2024.22.08

摘　要　目的　基于沉默信息调节因子1（SIRT1）/核因子κB（NF-κB）/核苷酸结合结构域富含亮氨酸重复序列和含热蛋白结构域受体3（NLRP3）信号通路探讨石淋清颗粒对大鼠草酸钙肾结石的影响及潜在机制。**方法**　将60只雄性SD大鼠随机分为对照组，模型组，石淋清颗粒低、中、高剂量组（6.5、13、26 g/kg，以生药量计）和石淋清颗粒高剂量+抑制剂组（石淋清颗粒26 g/kg+SIRT1抑制剂尼克酰胺5 mg/kg），每组10只。除对照组外，其余各组大鼠均自由饮用1%乙二醇溶液并灌胃2%氯化铵溶液2 mL（每天1次，连续4周），以构建草酸钙肾结石模型。造模同时，各药物组大鼠灌胃或（和）腹腔注射相应药液，对照组和模型组灌胃生理盐水并腹腔注射二甲基亚砜。检测各组大鼠体重、肾脏指数、尿液/血清生化指标[24 h尿量、尿pH、尿钙离子（Ca^{2+}）和尿草酸（Ox）含量，以及血肌酐（Scr）、血尿素氮（BUN）、血Ca^{2+}含量]、血清炎症指标[白细胞介素1β（IL-1β）、IL-18水平]，观察其肾组织病理变化、草酸钙结晶情况并进行结晶评分，检测其肾组织中SIRT1、NLRP3、NF-κB蛋白的表达情况。**结果**　与对照组相比，模型组大鼠肾组织损伤严重并可见大量草酸钙结晶；其体重、24 h尿量、尿pH及肾组织中SIRT1蛋白的表达均显著降低或下调（$P<0.05$）；结晶评分，肾脏指数，尿Ca^{2+}、Ox含量，血清中Scr、BUN、Ca^{2+}含量和IL-1β、IL-18水平，以及肾组织中NF-κB、NLRP3蛋白的表达均显著升高或上调（$P<0.05$）。与模型组相比，石淋清颗粒各剂量组大鼠肾组织病理改变有所好转，草酸钙结晶有所减少，各定量指标均显著改善（$P<0.05$）；而SIRT1抑制剂可显著逆转高剂量石淋清颗粒对上述指标的改善作用（$P<0.05$）。**结论**　石淋清颗粒可抑制大鼠草酸钙肾结石的形成，降低炎症指标水平；其机制可能与上调SIRT1蛋白表达，下调NF-κB、NLRP3蛋白表达有关。

关键词　石淋清颗粒；草酸钙肾结石；炎症反应；SIRT1/NF-κB/NLRP3信号通路

Effect of Shilinqing granules on calcium oxalate nephrolithiasis in rats and its mechanism

YANG Xiong[1], JIN Xiaoxiao[2], LI Weisheng[2], ZHENG Cong[2], HE Wenqiang[2] (1. Dept. of Urology and Andrology, Nanyang Second General Hospital, Henan Nanyang 473000, China; 2. Section Two, Dept. of Urology, the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To explore the effect of Shilinqing granules on calcium oxalate nephrolithiasis in rats and its potential mechanisms through the silence information regulator 1 (SIRT1)/nuclear factor-κB (NF-κB)/nucleotide-binding domain leucine-rich repeat and pyrin domain-containing receptor 3 (NLRP3) signaling pathway. **METHODS** Sixty male SD rats were randomly assigned to control group, model group, and low-, medium-, high-dose groups of Shilinqing granules (6.5, 13, 26 g/kg, calculated based on crude drug), and high-dose of Shilinqing granules+inhibitor group (Shilinqing granules 26 g/kg+SIRT1 inhibitor nicotinamide 5 mg/kg), with 10 rats in each group. Except for the control group, the remaining groups of rats were given 1% ethylene glycol solution to drink freely and were intubated with 2% ammonium chloride solution 2 mL (once a day, for 4 weeks) to construct a calcium oxalate nephrolithiasis model. At the same time of modeling, the administration groups were intubated or (and) intraperitoneally injected with the corresponding drug solutions, while the control and the model groups were intubated with physiological saline and intraperitoneally injected with dimethyl sulfoxide. The body weight, kidney index, urine/blood biochemical indicators [24-hour urine volume, urine pH, urinary calcium ion (Ca^{2+}) and urinary oxalic acid (Ox) content, as well as blood creatinine (Scr), blood urea nitrogen (BUN), blood Ca^{2+} content], serum inflammatory indicators [levels of interleukin-1β (IL-1β), IL-18], pathological changes in renal tissue, calcium oxalate crystallization, and crystal scoring were observed. The protein expressions of SIRT1, NLRP3, and NF-κB in renal tissue were detected. **RESULTS** Compared with the control group, the model group had severe renal tissue damage and a large number of calcium oxalate crystals, with significant decrease or downregulation in body weight, 24-hour urine volume, urine pH, and protein expression of SIRT1 in renal tissue ($P<0.05$); crystal score, kidney index, urinary contents of Ca^{2+} and Ox, serum contents of Scr, BUN and Ca^{2+}, and serum levels of IL-1β and IL-18, as well as the protein expressions of NF-κB, NLRP3 in renal tissue were significantly increased or upregulated ($P<0.05$). The pathological changes in the rats of each dose group of Shilinqing granules were improved, the calcium oxalate crystals were reduced, and all quantitative indicators were significantly improved as compared with the model group ($P<0.05$); while the SIRT1 inhibitor could

Δ **基金项目**　河南省卫生健康委国家中医药传承创新科研专项（No. 2023ZXZX1089）；河南省中医药科学研究专项课题（No. 2024ZY2045）

＊**第一作者**　医师，硕士。研究方向：泌尿外科疾病的临床诊疗与基础。E-mail：656670765@qq.com

＃**通信作者**　主任医师，教授，硕士生导师。研究方向：泌尿外科疾病的临床诊疗与基础。E-mail：Hewenqiang2021004@163.com

significantly reverse the improving effects of high-dose of Shilinqing granules on the above indicators ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Shilinqing granules can inhibit the formation of calcium oxalate nephrolithiasis in rats, reduce the levels of inflammatory indicators and its mechanism may be related to upregulating protein expression of SIRT1, and downregulating protein expressions of NF-κB and NLRP3.

KEYWORDS Shilinqing granules; calcium oxalate nephrolithiasis; inflammatory response; SIRT1/NF-κB/NLRP3 signaling pathway

肾结石作为泌尿外科常见疾病之一，其发病率有逐年上升的趋势[1]。肾结石的形成是一个复杂的过程，可能与环境、饮食及遗传等多种因素有关[2]，但具体机制尚未完全明确。研究指出，大约80%的肾结石以草酸钙为主要成分，草酸钙结晶可造成肾小管上皮细胞损伤，从而导致晶体附着及肾功能异常[3]。此外，草酸钙结晶还会通过激活核因子κB（nuclear factor-κB，NF-κB）信号通路来促使核苷酸结合结构域富含亮氨酸重复序列和含热蛋白结构域受体3（nucleotide-binding domain leucine-rich repeat and pyrin domain-containing receptor 3，NLRP3）炎症小体的形成，进而诱导树突细胞释放白细胞介素1β（interleukin-1β，IL-1β）、IL-18，最终导致肾脏炎症反应的发生[4]。沉默信息调节因子1（silence information regulator 1，SIRT1）可通过自身脱乙酰化来发挥对细胞凋亡、自噬、氧化应激、炎症反应等生理过程的调控作用，还可通过调节NF-κB信号通路来抑制炎症因子的释放，从而发挥抗炎作用[5]。

近年来，中医药在治疗肾结石方面获得了丰富经验，其中由经验方改良而得的中成药具有疗效好、副作用少、费用低等特点，具有良好的应用前景。石淋清颗粒源自河南中医药大学第一附属医院的经验方，由金钱草、海金沙、石韦、王不留行组成。方中，金钱草可通过抑制NF-κB信号通路相关蛋白的表达，减轻机体炎症反应，在治疗草酸钙肾结石方面具有积极作用[6]；海金沙可减少活性氧（reactive oxygen species，ROS）的产生，从而减轻肾功能损伤，改善肾小球滤过功能，保护肾功能[7]；石韦具有利尿作用，其作用机制与枸橼酸钾相似；王不留行具有利尿通淋之功效，可用于泌尿系结石、感染等的治疗[8]。作为该院治疗肾结石的常用药物，石淋清颗粒用于草酸钙肾结石患者的疗效较好，但其作用机制尚未阐明。基于此，本研究拟建立大鼠草酸钙肾结石模型，基于SIRT1/NF-κB/NLRP3信号通路初步探讨石淋清颗粒对大鼠草酸钙肾结石的影响及潜在机制，以期为该药的进一步开发及临床应用提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括Chemray240型全自动生化分析仪（深圳雷杜生命科学股份有限公司），Dionex ICS 6000型离子色谱仪（美国Thermo Fisher Scientific公司），Silver UVIpro型凝胶成像分析仪（英国Uvitec公司），RT-6100型酶标仪（美国BioTek公司），E100型光学显微镜（日本Nikon公司），KZ-Ⅲ-F型研磨仪、SVE-2型电泳仪（武汉赛维尔生物科技有限公司），JB-P5型包埋机（武汉俊杰电子有限公司），RM2016型病理切片机（上海徕卡仪器有限公司）等。

1.2 主要药品与试剂

金钱草、海金沙、石韦、王不留行中药配方颗粒（批号分别为CK6J004、CK6H024、CK6S032、CK6W002）均购自四川新绿色药业科技发展有限公司；SIRT1抑制剂尼克酰胺的对照品（批号SENOO14196，纯度99.71%）购自艾普拜生物科技（苏州）有限公司；Von Kossa染色试剂盒（批号G1043）、苏木精-伊红（HE）染色试剂盒（批号G1003）、兔源NK-κB单克隆抗体（批号GB11997）、兔源NLRP3单克隆抗体（批号GB114320）、兔源SIRT1单克隆抗体（批号GB11171）、IL-1β试剂盒（批号GER0002）、乙二醇（批号D2127121）均购自北京索莱宝科技有限公司；IL-18试剂盒（批号：SEA064Ra）购自武汉优尔生科技股份有限公司；氯化铵（批号C11749013）购自上海麦克林生化科技有限公司；兔源甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）单克隆抗体（批号GB15004）及辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G二抗（批号GB23303）均购自武汉赛维尔生物科技有限公司。

1.3 实验动物

SPF级雄性SD大鼠60只，体重200～220 g，由北京华阜康科技股份有限公司提供，动物生产许可证号为SCXK（京）2020-0004。所有大鼠均饲养在河南中医药大学动物实验中心屏障级实验室内，饲养条件如下：温度（20±2）℃，相对湿度50%～60%，每12 h光照/黑暗循环，通风良好。所有大鼠均适应性饲养1周后正式开始实验。本实验过程严格遵循动物实验3R原则，实验方案已通过河南中医药大学实验动物伦理委员会审批（批准编号DWLL202201009）。

2 方法

2.1 药液的制备

取金钱草、海金沙、石韦、王不留行中药配方颗粒共65 g（各药质量比为6∶3∶2∶2），加水1 000 mL，回流提取2 h×2次，过滤，合并2次提取液并减压浓缩。临用前，用生理盐水将上述浓缩液稀释，得0.65、1.3、2.6 g/mL（以生药量计）的药液，备用。

2.2 分组、造模与给药

将大鼠随机分为对照组，模型组，石淋清颗粒低、中、高剂量组及石淋清颗粒高剂量+抑制剂组，每组10只。参考文献[9]的造模方法，除对照组大鼠自由饮水外，其余各组大鼠均饮用1%乙二醇溶液（替代水），并灌胃2%氯化铵溶液2 mL（每天1次，连续4周），以构建草酸钙肾结石模型。造模同时，除对照组和模型组大鼠灌

胃生理盐水+腹腔注射二甲基亚砜（体积及频次分别等同于灌胃或腹腔注射药液的体积及频次）外，石淋清颗粒低、中、高剂量组大鼠分别灌胃6.5、13、26 g/kg（以生药量计；低剂量为临床等效剂量，据《中药药理研究方法学》按体表面积折算而得，中、高剂量分别为低剂量的2、4倍），每天1次，连续4周+腹腔注射二甲基亚砜（体积等同于腹腔注射SIRT1抑制剂的体积），每2天1次，连续4周；石淋清颗粒高剂量+抑制剂组大鼠在同法灌胃石淋清颗粒26 g/kg的基础上，腹腔注射SIRT1抑制剂尼克酰胺5 mg/kg（以二甲基亚砜为溶剂，剂量根据预实验结果设置），每2天1次，连续4周。

2.3 大鼠体重及肾脏指数测定

末次给药后，称定各组大鼠体重，采尿采血后将大鼠放在冰块上，充分暴露并摘取其左右肾脏，称定肾脏质量，并计算肾脏指数：肾脏指数（mg/g）＝肾质量（mg）/体重（g）。

2.4 大鼠尿液、血清生化指标测定

末次给药前1 d，所有大鼠禁食、不禁水，用代谢笼收集其24 h尿液，测定其24 h尿量及尿液pH值后，取部分尿液样品，采用全自动生化分析仪测定其尿液中钙离子（Ca^{2+}）含量。另取部分尿液样品，采用铬酸钾氧化甲基红催化光度法以离子色谱仪检测其尿液中草酸（oxalic acid，Ox）含量。

末次给药后，以戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠，于腹主动脉采血，静置2～3 h后，取部分以3 000 r/min离心10 min；取上层血清样品适量，使用全自动生化分析仪检测其血肌酐（serum creatinine，Scr）、血尿素氮（blood urea nitrogen，BUN）、血Ca^{2+}含量。

2.5 大鼠血清中炎症指标检测

采用ELISA法检测。取“2.4”项下各组大鼠血清样品适量，参照相应试剂盒说明书方法，以酶标仪于450 nm波长下检测其血清炎症指标（IL-1β、IL-18）水平。

2.6 大鼠肾组织病理变化观察

采用HE染色法观察。取血后，取“2.3”项下各组大鼠部分肾组织，用4%多聚甲醛固定24 h后，采用石蜡包埋法制作组织蜡块，并切片（厚度约5 μm），然后进行HE染色，在显微镜下观察大鼠肾组织的病理变化。

2.7 大鼠肾组织草酸钙结晶情况观察

采用Von Kossa染色法观察。取“2.6”项下各组大鼠的肾组织切片，经Von Kossa染色后，在显微镜下观察各组大鼠的草酸钙结晶（呈深棕色）情况并进行结晶评分。具体评分标准如下：无任何结晶存在，记0分；有散在结晶存在，记1分；结晶广泛不堆积或呈局限性存在，记2分；结晶成堆但不连结，记3分；结晶成堆且互相连结，记4分；结晶广泛成堆且连结成片，记5分[10]。

2.8 大鼠肾组织中SIRT1、NLRP3、NF-κB蛋白表达检测

采用Western blot法检测。取“2.6”项下各组大鼠的肾组织适量，加入裂解液、蛋白酶抑制剂、磷酸抑制剂，于冰上裂解30 min；以15 000 r/min离心30 min，收集上清液，以BCA试剂盒检测蛋白浓度后，加入上样缓冲液适量，经变性后进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离，转膜后以5%脱脂牛奶在常温下封闭30 min；加入SIRT1、NLRP3、NF-κB、GAPDH一抗（稀释比例分别为1∶1 000、1∶500、1∶2 000、1∶2 000），于4 ℃下孵育过夜；以TBST缓冲液洗膜后，加入相应二抗（稀释比例为1∶5 000），于室温下孵育30 min；以TBST缓冲液洗膜后，采用ECL法显色，再于凝胶图像分析仪下成像。采用Image J图像分析软件进行定量分析，以目的蛋白与内参蛋白（GAPDH）的灰度值比值表示目的蛋白的相对表达量。

2.9 统计学方法

采用SPSS 26.0软件对数据进行统计分析。符合正态分布的计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组间的比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用SNK-q检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 各组大鼠体重及肾脏指数比较

与对照组相比，模型组大鼠的体重显著降低，肾脏指数显著升高（$P<0.05$）；与模型组相比，石淋清颗粒各剂量组大鼠体重均显著升高，肾脏指数均显著降低（$P<0.05$）；与石淋清颗粒高剂量组相比，石淋清颗粒高剂量+抑制剂组大鼠的体重显著降低，肾脏指数显著升高（$P<0.05$）。结果见表1。

表1 各组大鼠体重及肾脏指数比较（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	体重/g	肾脏指数/(mg/g)
对照组	311.03±20.11	9.30±0.45
模型组	210.50±13.17[a]	15.18±0.62[a]
石淋清颗粒低剂量组	241.65±8.30[b]	13.71±0.28[b]
石淋清颗粒中剂量组	260.59±18.83[b]	12.25±0.41[b]
石淋清颗粒高剂量组	279.18±13.88[b]	11.35±0.52[b]
石淋清颗粒高剂量+抑制剂组	253.95±37.61[c]	14.64±0.67[c]

a：与对照组相比，$P<0.05$；b：与模型组相比，$P<0.05$；c：与石淋清颗粒高剂量组相比，$P<0.05$。

3.2 各组大鼠尿液、血清生化指标比较

与对照组相比，模型组大鼠24 h尿量和尿pH均显著降低，尿Ca^{2+}和尿Ox含量均显著升高（$P<0.05$）；与模型组相比，石淋清颗粒各剂量组大鼠24 h尿量和尿pH均显著升高，尿Ca^{2+}和尿Ox含量均显著降低（$P<0.05$）；与石淋清颗粒高剂量组相比，石淋清颗粒高剂量+抑制剂组大鼠24 h尿量和尿pH均显著降低，尿Ca^{2+}和尿Ox含量均显著升高（$P<0.05$）。结果见表2。

与对照组相比，模型组大鼠血清中BUN、Scr、Ca^{2+}含量均显著升高（$P<0.05$）；与模型组相比，石淋清颗粒各剂量组大鼠血清中BUN、Scr、Ca^{2+}含量均显著降低（$P<0.05$）；与石淋清颗粒高剂量组相比，石淋清颗粒高剂量+抑制剂组大鼠血清中BUN、Scr、Ca^{2+}含量均显著升高（$P<0.05$）。结果见表3。

表2　各组大鼠尿液生化指标比较（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	24 h尿量/mL	尿pH	尿Ca^{2+}/(mmol/L)	尿Ox/(mmol/L)
对照组	24.90±3.31	7.33±0.15	0.29±0.06	2.15±0.50
模型组	16.80±3.19[a]	5.51±0.37[a]	0.77±0.11[a]	7.25±0.45[a]
石淋清颗粒低剂量组	30.10±3.54[b]	6.06±0.45[b]	0.63±0.11[b]	6.38±0.76[b]
石淋清颗粒中剂量组	33.00±3.06[b]	6.25±0.30[b]	0.57±0.08[b]	5.78±0.52[b]
石淋清颗粒高剂量组	39.30±3.33[b]	6.99±0.23[b]	0.44±0.08[b]	4.64±0.45[b]
石淋清颗粒高剂量+抑制剂组	18.60±3.10[c]	5.94±0.15[c]	0.72±0.10[c]	7.02±0.36[c]

a：与对照组相比，$P<0.05$；b：与模型组相比，$P<0.05$；c：与石淋清颗粒高剂量组相比，$P<0.05$。

表3　各组大鼠血清生化指标比较（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	BUN/(mmol/L)	Scr/(μmol/L)	Ca^{2+}/(mmol/L)
对照组	4.96±0.18	28.25±2.48	2.10±0.05
模型组	11.43±1.24[a]	60.62±8.44[a]	6.48±0.20[a]
石淋清颗粒低剂量组	9.70±1.02[b]	50.34±8.00[b]	5.14±0.08[b]
石淋清颗粒中剂量组	8.91±0.68[b]	49.58±7.25[b]	4.09±0.16[b]
石淋清颗粒高剂量组	7.09±0.74[b]	41.35±7.05[b]	3.13±0.08[b]
石淋清颗粒高剂量+抑制剂组	10.69±0.89[c]	58.22±5.29[c]	6.08±0.22[c]

a：与对照组相比，$P<0.05$；b：与模型组相比，$P<0.05$；c：与石淋清颗粒高剂量组相比，$P<0.05$。

3.3　各组大鼠血清炎症指标比较

与对照组相比，模型组大鼠血清中IL-1β、IL-18水平均显著升高（$P<0.05$）；与模型组相比，石淋清颗粒各剂量组大鼠血清中IL-1β、IL-18水平均显著降低（$P<0.05$）；与石淋清颗粒高剂量组相比，石淋清颗粒高剂量+抑制剂组大鼠血清中IL-1β、IL-18水平均显著升高（$P<0.05$）。结果见表4。

表4　各组大鼠血清炎症指标比较（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	IL-1β/(pg/mL)	IL-18/(pg/mL)
对照组	25.93±1.76	58.18±1.46
模型组	47.43±2.09[a]	127.57±3.76[a]
石淋清颗粒低剂量组	41.41±0.82[b]	102.58±3.76[b]
石淋清颗粒中剂量组	36.67±1.41[b]	86.85±1.32[b]
石淋清颗粒高剂量组	31.68±0.78[b]	66.57±2.97[b]
石淋清颗粒高剂量+抑制剂组	46.30±0.49[c]	126.19±0.84[c]

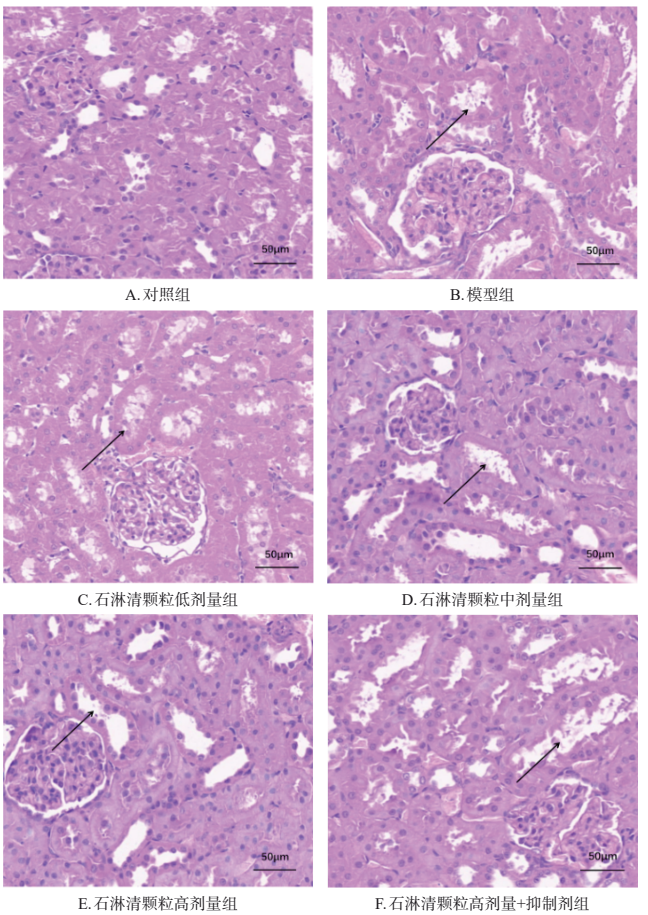
a：与对照组相比，$P<0.05$；b：与模型组相比，$P<0.05$；c：与石淋清颗粒高剂量组相比，$P<0.05$。

3.4　各组大鼠肾组织病理特征比较

对照组大鼠肾组织内肾小管和肾小球排列整齐，未见结构异常，肾小球和肾小管内未见结晶沉积；与对照组相比，模型组大鼠肾组织内肾小管和肾小球排列紊乱，肾小管扩张明显，肾小管和肾小球内有大量结晶沉积；与模型组相比，石淋清颗粒各剂量组大鼠肾组织内部分肾小管和肾小球排列紊乱，肾小管部分扩张，肾小球和肾小管内有若干结晶沉积，其中石淋清颗粒高剂量组大鼠肾组织内肾小管和肾小球排列紊乱不明显，结晶沉积较少；与石淋清颗粒高剂量组相比，石淋清颗粒高剂量+抑制剂组大鼠肾组织内肾小管和肾小球排列紊乱，肾小管扩张明显，肾小管和肾小球内的结晶沉积更多。结果见图1。

3.5　各组大鼠肾组织草酸钙结晶情况及结晶评分比较

对照组大鼠肾组织结构完整，组织中未出现深棕色结晶沉淀，结晶评分为0分；与对照组相比，模型组大鼠肾组织结构紊乱，肾组织中有深棕色结晶沉淀，其结晶评分[(3.30±1.41)分]显著升高（$P<0.05$）；与模型组相比，石淋清颗粒各剂量组大鼠肾组织部分结构紊乱，肾组织中有少量深棕色结晶沉淀，其中石淋清颗粒高剂量组大鼠肾组织中的深棕色结晶沉淀最少，低、中、高剂量组的结晶评分[(2.10±0.99)、(1.60±0.97)、(1.10±0.97)分]均显著降低（$P<0.05$）；与石淋清颗粒高剂量组相比，石淋清颗粒高剂量+抑制剂组大鼠肾组织结构紊乱，肾组织中有深棕色结晶沉淀，其结晶评分[(2.50±1.08)分]显著升高（$P<0.05$）。结果见图2。



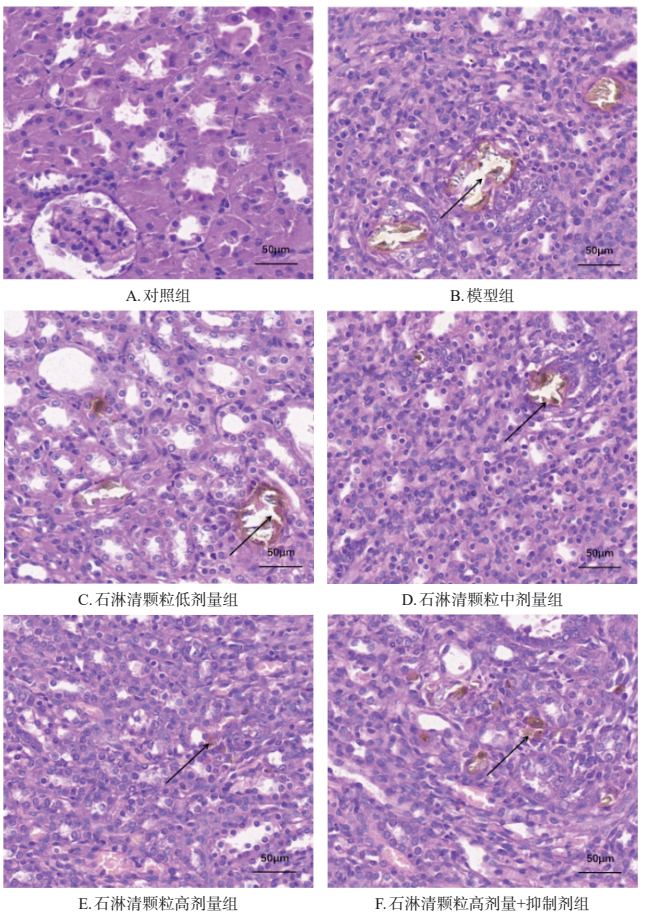
A. 对照组　B. 模型组　C. 石淋清颗粒低剂量组　D. 石淋清颗粒中剂量组　E. 石淋清颗粒高剂量组　F. 石淋清颗粒高剂量+抑制剂组

箭头：结晶。

图1　各组大鼠肾组织病理特征的显微图（HE染色）

3.6　各组大鼠肾组织中SIRT1、NF-κB和NLRP3蛋白表达比较

与对照组相比，模型组大鼠肾组织中SIRT1蛋白表达显著下调，NF-κB、NLRP3蛋白表达均显著上调（$P<0.05$）；与模型组相比，石淋清颗粒各剂量组大鼠肾组织中SIRT1蛋白表达均显著上调，NF-κB、NLRP3蛋白表达均显著下调（$P<0.05$）；与石淋清颗粒高剂量组相比，石淋清颗粒高剂量+抑制剂组大鼠肾组织中SIRT1蛋白表达显著下调，NF-κB、NLRP3蛋白表达均显著上调（$P<0.05$）。结果见图3、表5。



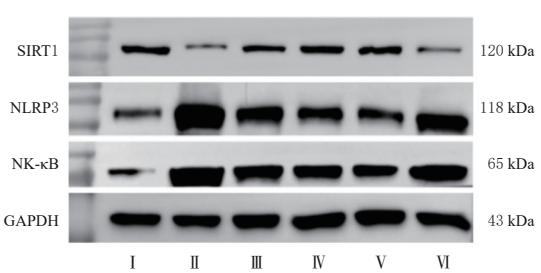
A. 对照组　B. 模型组

C. 石淋清颗粒低剂量组　D. 石淋清颗粒中剂量组

E. 石淋清颗粒高剂量组　F. 石淋清颗粒高剂量+抑制剂组

箭头：结晶。

图2　各组大鼠肾组织草酸钙结晶情况的显微图（Von Kossa染色）



Ⅰ：对照组；Ⅱ：模型组；Ⅲ：石淋清颗粒低剂量组；Ⅳ：石淋清颗粒中剂量组；Ⅴ：石淋清颗粒高剂量组；Ⅵ：石淋清颗粒高剂量+抑制剂组。

图3　各组大鼠肾组织中SIRT1、NF-κB、NLRP3蛋白表达的电泳图

表5　各组大鼠肾组织中SIRT1、NF-κB、NLRP3蛋白相对表达量比较（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	SIRT1	NF-κB	NLRP3
对照组	0.58±0.01	0.34±0.01	0.52±0.02
模型组	0.22±0.01[a]	1.57±0.02[a]	1.60±0.02[a]
石淋清颗粒低剂量组	0.41±0.15[b]	1.14±0.02[b]	1.12±0.01[b]
石淋清颗粒中剂量组	0.45±0.02[b]	0.95±0.01[b]	0.88±0.01[b]
石淋清颗粒高剂量组	0.47±0.15[b]	0.75±0.01[b]	0.72±0.02[b]
石淋清颗粒高剂量+抑制剂组	0.28±0.02[c]	1.54±0.01[c]	1.57±0.01[c]

a：与对照组相比，$P<0.05$；b：与模型组相比，$P<0.05$；c：与石淋清颗粒高剂量组相比，$P<0.05$。

4　讨论

肾结石为泌尿外科常见疾病，可引起尿道损伤、感染及泌尿系梗阻，如治疗不及时可影响患者肾功能，增加泌尿系肿瘤的发生风险[11]。此外，肾结石在药物或手术治疗后的5年内复发率较高，10年内复发率更高[12]。目前，临床治疗肾结石以微创手术为主，但手术治疗有较高的复发率及并发症发生风险，故探究药物在肾结石治疗领域中的应用对有效改善患者生活质量、降低其治疗成本具有重要意义。本研究采用1%乙二醇溶液和2%氯化铵溶液构建大鼠草酸钙肾结石模型，其中乙二醇可造成肾小管上皮细胞损伤，使机体处于高尿酸状态并最终诱导肾结石形成；而氯化铵则可通过降低尿液pH而促进结晶形成，同时可增加体内Ca^{2+}含量而加速草酸钙结晶的析出[13-14]。本研究结果显示，与对照组相比，模型组大鼠24 h尿量显著减少，尿pH显著降低，尿Ca^{2+}、尿Ox含量和血BUN、Scr、Ca^{2+}含量均显著升高；肾小球及肾小管排列紊乱，肾小管扩张明显，肾组织中深棕色的草酸钙结晶分布广泛、结晶评分显著升高。这提示大鼠肾功能受到损伤，草酸钙肾结石模型构建成功。经石淋清颗粒干预后，大鼠上述指标及病理状态均得以明显改善，结晶评分显著降低，表明该药可有效抑制草酸钙肾结石的形成。

炎症反应是疾病发生、发展的关键机制之一，而NLRP3在炎症反应的调控中具有关键作用[15]。研究表明，NLRP3炎症小体在各类炎症致肾损伤的发生发展过程中发挥重要作用：经启动及激活信号刺激后，NLRP3炎症小体的内源性代谢产物可激活Toll样受体4（Toll-like receptor 4，TLR4），并可通过NF-κB信号通路来上调NLRP3蛋白和炎症细胞因子的表达[16-17]；此外，激动剂（如草酸钙结晶、尿酸结晶及多肽物质等）与TLR4结合后，可通过多种途径激活NLRP3启动，从而促进胱天蛋白酶1活化，最终导致IL-1β和IL-18等炎症因子的分泌及细胞焦亡的发生[18]。SIRT1作为烟酰胺腺嘌呤二核苷酸依赖性脱酰基酶家族成员，参与了机体内众多生理功能的调节，包括细胞衰老、基因转录及氧化应激等。研究报道，SIRT1与多种疾病的发生发展密切相关，如Hong等[19]研究发现，抑制SIRT1的表达可促进晶体的黏附，加重细胞损伤，提示SIRT1可能与草酸钙肾结石形成有关；田河等[20]探究了白藜芦醇能否通过上调SIRT1的表达来抑制草酸钙肾结石的形成，结果表明，白藜芦醇对人肾上皮细胞具有抗氧化作用，其机制可能是SIRT1激活后抑制了ROS的产生，从而抑制了草酸钙肾结石的形成。本研究结果显示，石淋清颗粒可促进模型大鼠肾组织中SIRT1蛋白的表达，抑制NF-κB、NLRP3蛋白的表达，降低IL-1β、IL-18水平，减少肾组织中草酸钙结晶的沉积，具有一定的肾保护作用；在加入SIRT1抑制剂后，与石淋清颗粒高剂量组相比，石淋清颗粒高剂量+抑制剂组大鼠肾组织中SIRT1蛋白的相对表达量显著降低，而NF-κB、NLRP3蛋白的相对表达量和IL-

Iβ、IL-18水平均显著升高，可见该抑制剂逆转了石淋清颗粒激活SIRT1蛋白所带来的有利作用。以上研究结果表明，石淋清颗粒可通过调控SIRT1/NF-κB/NLRP3信号通路来发挥抗炎作用，从而减轻模型大鼠的肾损伤，抑制草酸钙肾结石的形成。

综上所述，石淋清颗粒可抑制大鼠草酸钙肾结石的形成，降低炎症指标水平；其机制可能与上调SIRT 1蛋白表达，下调NF-κB、NLRP3蛋白表达有关。

参考文献

[1] JALAL S M，ALSULTAN A A，ALOTAIBI H H，et al. Effect of *Phaseolus vulgaris* on urinary biochemical parameters among patients with kidney stones in Saudi Arabia [J]. Nutrients，2020，12(11)：3346.

[2] MALINE G E，GOLDFARB D S. Climate change and kidney stones[J]. Curr Opin Nephrol Hypertens，2024，33(1)：89-96.

[3] THONGBOONKERD V. Proteomics of crystal-cell interactions：a model for kidney stone research[J]. Cells，2019，8(9)：1076.

[4] ZHAO C Y，ZHAO W. NLRP3 inflammasome：a key player in antiviral responses[J]. Front Immunol，2020，11：211.

[5] SUN H J，XIONG S P，CAO X，et al. Polysulfide-mediated sulfhydration of SIRT1 prevents diabetic nephropathy by suppressing phosphorylation and acetylation of p65 NF-κB and STAT3[J]. Redox Biol，2021，38：101813.

[6] 陈曙辉，任毅轩，曹继刚. 基于网络药理学探析金钱草作为石淋要药治疗肾结石的作用机制研究[J]. 中国中西医结合肾病杂志，2021，22(4)：340-344，377.
CHEN S H，REN Y X，CAO J G. Study on the mechanism of *Lysimachia christinae* as a essential medicine for treating kidney calculus based on network pharmacology[J]. Chin J Integr Tradit West Nephrol，2021，22(4)：340-344，377.

[7] 岑庚钰，蒙小丽，梁远芳，等. 海金沙化学成分和药理作用研究概况[J]. 中国民族民间医药，2018，27(14)：48-50.
CEN G Y，MENG X L，LIANG Y F，et al. Study on the chemical composition and pharmacological activity of the *Lygodium japonicum*[J]. Chin J Ethnomed Ethnopharmacy，2018，27(14)：48-50.

[8] 毛鑫，姚荣妹，鲍岩岩，等. 王不留行多糖通过抑制NLRP3炎性小体通路改善尿路感染所致膀胱损伤[J]. 中国中药杂志，2021，46(13)：3388-3393.
MAO X，YAO R M，BAO Y Y，et al. Effect of polysaccharides from seeds of *Vaccaria segetalis* in alleviating urinary tract infection induced bladder injury by inhibiting NLRP3 inflammasome[J]. China J Chin Mater Med，2021，46(13)：3388-3393.

[9] 韩晗. 基于p38 MAPK信号通路探讨排石冲剂干预草酸钙结石形成的机制[D]. 武汉：湖北中医药大学，2019.
HAN H. Discussion on the mechanism of Paishi granule's intervention on calcium oxalate stone formation based on p38 MAPK signal pathway[D]. Wuhan：Hubei University of Chinese Medicine，2019.

[10] CHEUNGPASITPORN W，ROSSETTI S，FRIEND K，et al. Treatment effect，adherence，and safety of high fluid intake for the prevention of incident and recurrent kidney stones：a systematic review and meta-analysis[J]. J Nephrol，2016，29(2)：211-219.

[11] 王振，杨秀书，陈卫红，等. 川芎嗪通过抑制NLRP3炎性小体活化对肾结石大鼠肾脏的保护作用[J]. 中成药，2023，45(11)：3789-3792.
WANG Z，YANG X S，CHEN W H，et al. Protective effect of ligustrazine on kidney of kidney calculi rats by inhibiting activation of inflammatory corpuscles of NLRP3 [J]. Chin Tradit Pat Med，2023，45(11)：3789-3792.

[12] KHAN S R，PEARLE M S，ROBERTSON W G，et al. Kidney stones[J]. Nat Rev Dis Primers，2016，2：16008.

[13] 许悦贤，郝宗耀. 泌尿系结石动物模型的最新进展[J]. 临床泌尿外科杂志，2022，37(7)：559-563.
XU Y X，HAO Z Y. Recent advances in animal models of urinary calculi[J]. J Clin Urol，2022，37(7)：559-563.

[14] 柯井卫，朱永生，唐海，等. 棱术排石颗粒对肾草酸钙结石作用机制的研究[J]. 中国比较医学杂志，2021，31(8)：82-87.
KE J W，ZHU Y S，TANG H，et al. Study of the mechanism whereby Lengzhupaishi（rixolipite）granules prevent renal calcium oxalate stones[J]. Chin J Comp Med，2021，31(8)：82-87.

[15] 齐士勇，徐勇. NLRP3炎症小体与草酸钙肾结石形成的研究进展[J]. 医学综述，2021，27(19)：3749-3754.
QI S Y，XU Y. Research progress in relationship between NLRP3 inflammasome and formation of calcium oxalate kidney stone[J]. Med Recapitul，2021，27(19)：3749-3754.

[16] PELLEGRINI C，FORNAI M，ANTONIOLI L，et al. Phytochemicals as novel therapeutic strategies for NLRP3 inflammasome-related neurological，metabolic，and inflammatory diseases[J]. Int J Mol Sci，2019，20(12)：2876.

[17] SWANSON K V，DENG M，TING J P Y. The NLRP3 inflammasome：molecular activation and regulation to therapeutics[J]. Nat Rev Immunol，2019，19(8)：477-489.

[18] CAI H，ZHANG J H，XU H，et al. ALOX5 drives the pyroptosis of $CD4^+$ T cells and tissue inflammation in rheumatoid arthritis[J]. Sci Signal，2024，17(825)：eadh1178.

[19] HONG Q，ZHANG L，DAS B，et al. Increased podocyte sirtuin-1 function attenuates diabetic kidney injury[J]. Kidney Int，2018，93(6)：1330-1343.

[20] 田河，王志龙，张智慧，等. 白藜芦醇通过靶向SIRT1激活Keap1-Nrf2-HO-1途径发挥对草酸钙肾结石形成的调控作用[J]. 中国比较医学杂志，2020，30(2)：77-83.
TIAN H，WANG Z L，ZHANG Z H，et al. Resveratrol plays a regulatory role in the formation of calcium oxalate kidney stones by targeting SIRT1 to activate the Keap1-Nrf2-HO-1 pathway[J]. Chin J Comp Med，2020，30(2)：77-83.

（收稿日期：2024-03-26　修回日期：2024-07-30）
（编辑：张元媛）