

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.11.005

## 萝卜硫素通过 Nrf2 信号通路对大鼠草酸钙肾结石形成的作用和机制研究\*

刘若天 木拉提·马合木提<sup>△</sup> 部乐 杨奇 陈策

拜合提亚尔·艾合买提江 麦吾拉江·买合木提

(新疆医科大学第二附属医院泌尿外科 新疆 乌鲁木齐 830000)

**摘要 目的:**探究萝卜硫素通过 Nrf2 信号通路对大鼠草酸钙肾结石形成的作用和机制。**方法:**选取 7~8 周龄 Wistar 健康雄性大鼠 30 只,随机分为空白对照组、模型组和药物干预组。空白对照组给予正常饮用水,标准饲料;模型组给予 1%乙二醇饮用水+2%氯化铵 2 mL/d 灌胃,标准饲料;药物干预组给予 1%乙二醇饮用水+2%氯化铵 2 mL/d 灌胃+0.2 mg 萝卜硫素腹腔注射,标准饲料。灌胃给药均连续 28 天。于第 29 天收分别集各组大鼠 24 h 尿液及肾脏标本,使用全自动生化分析仪检测尿液中  $K^+$ 、 $Na^+$ 、 $Cl^-$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $P^{5+}$ 、 $Fe^{2+}$  含量,使用 ELISA 法测定尿液中丙二醛(malondialdehyde,MDA)与草酸水平,使用 HE 染色分析大鼠肾脏标本病理损伤情况,Von Kossa 染色比较各组大鼠钙盐沉积情况,免疫组化法测定谷胱甘肽(glutathione,GSH)、核因子 E<sub>2</sub> 相关因子 2(nuclear factor erythroid-2 related factor 2,Nrf2)、8-羟基脱氧鸟苷(8-hydroxy-2 deoxyguanosine,8-OHDG)蛋白表达水平。**结果:**模型组大鼠尿液  $P^{5+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、草酸、MDA 含量显著高于空白对照组,HE 染色示模型组肾小管较空白对照组变性严重,Von Kossa 染色结果显示模型组钙盐沉积较空白对照组明显增多,模型组 GSH、Nrf2 免疫组化评分显著低于空白对照组,8-OHDG 显著高于空白对照组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );药物干预组大鼠尿液  $P^{5+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、草酸、MDA 含量显著低于模型组,HE 染色、Von Kossa 染色显示肾小管较模型组损伤减轻,钙盐沉积较模型组减轻,免疫组化显示 GSH、Nrf2 蛋白表达显著高于模型组,8-OHDG 显著低于空白对照组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论:**萝卜硫素对大鼠肾小管具有抗氧化损伤作用,可降低草酸钙晶体的释放,抑制草酸钙结石的形成,该作用可能是通过激活 Nrf2 蛋白及其下游信号通路实现的。

**关键词:**草酸钙结石;萝卜硫素;Nrf2;氧化应激损伤

**中图分类号:**R-33;R693.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2022)11-2028-06

## Effect and Mechanism of Sulforaphane on Calcium Oxalate Nephrolithiasis in Rats Through Nrf2 Signaling Pathway\*

LIU Ruo-tian, MULATI·Mahemut<sup>△</sup>, GAO Le, YANG Qi, CHEN Ce, BAIHETIYAER·Aihemaitijiang, MAIWULAJIANG·Maihemuti  
(The Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830000, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the effect of sulforaphane on the formation of calcium oxalate nephrolithiasis in rats through the nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) signaling pathway and its mechanism. **Methods:** Thirty healthy male Wistar rats aged 7-8 weeks were selected and randomly divided into blank control group, model group and drug intervention group. The blank control group was given normal drinking water and standard feed. The model group was given drinking water containing 1% ethylene glycol + gavage with 2 mL/d 2% ammonium chloride and standard feed. The drug intervention group was given drinking water containing 1% ethylene glycol + gavage with 2 mL/d 2% ammonium chloride + intraperitoneal injection with 0.2 mg sulforaphane and standard feed. Gavage was treated for 28 d. On the 29th d, 24 h urine and kidney specimens of rats in each group were collected, respectively. The contents of  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $P^{5+}$  and  $Fe^{2+}$  in urine were detected by a full-automatic biochemical analyzer. The levels of malondialdehyde(MDA) and oxalic acid in urine were determined using ELISA. The pathological injury of rat kidney specimens was analyzed with HE staining. The calcium deposition of rats in each group was compared using Von Kossa staining. The protein expressions of glutathione (GSH), Nrf2 and 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHDG) were measured by immunohistochemistry. **Results:** The contents of  $P^{5+}$ ,  $Ca^{2+}$ , oxalic acid and MDA in the urine of the model group were significantly higher than those in the blank control group. HE staining showed severer degeneration of the renal tubules in the model group compared with the blank control group. Von Kossa staining revealed that calcium salt deposition in the model group increased significantly than that in the blank control group. The immunohistochemical scores of GSH and Nrf2 in the model group were significantly lower than those in the blank control group, while 8-OHDG was significantly higher than that in the blank control group ( $P<0.05$ ). In the drug intervention group, the contents of urine  $P^{5+}$ ,  $Ca^{2+}$ , oxalic acid and MDA were signifi-

\* 基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2017D01C254)

作者简介:刘若天(1995-),男,硕士研究生,主要研究方向:泌尿系结石,E-mail:liuruotian@foxmail.com

<sup>△</sup> 通讯作者:木拉提·马合木提(1959-),男,博士生导师,教授,主要研究方向:泌尿系结石,E-mail:mekit@126.com

(收稿日期:2021-11-21 接受日期:2021-12-17)

cantly lower than those in the model group. HE staining and Von Kossa staining presented that the injury of the renal tubules and calcium salt deposition in the drug intervention group were milder than those in the model group. Immunohistochemistry demonstrated that the protein expressions of GSH and Nrf2 were significantly higher than those in the model group, while 8-OHdG was significantly lower than that in the blank control group ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** Sulforaphane has a protective effect on oxidant damage to rat renal tubules, as well as can reduce the release of calcium oxalate crystals and inhibit the formation of calcium oxalate stones, which may be achieved by activating Nrf2 protein and its downstream signaling pathway.

**Key words:** Calcium oxalate stone; Sulforaphane; Nrf2; Oxidative stress injury

**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; R693.4 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2022)11-2028-06

## 前言

全球范围内,泌尿系统疾病中尿路结石是最常见疾病<sup>[1]</sup>。在我国泌尿系结石总发病率为 1%-5%,并且近年来发病率有上升趋势。肾结石中大约有 90%为含钙结石,其中草酸钙结石占含钙结石的约 60%<sup>[2]</sup>。目前研究认为,草酸钙结石是由高浓度草酸钙晶体诱导肾小管上皮细胞的氧化损伤所导致草酸钙晶体的聚集与黏附成石<sup>[3]</sup>。

在目前发现的抗氧化损伤转录因子中,核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid-2 related factor 2, Nrf2)具有重要地位,其介导的抗氧化损伤信号通路是目前各学科的研究热点<sup>[4]</sup>。已有研究表明,肾结石形成过程中 Nrf2 及其介导的下游氧化应激信号通路发挥了重要作用<sup>[5]</sup>。Nrf2 有望成为防治泌尿系结石的新靶点。萝卜硫素(sulforaphane, SFN)是由黑芥子酶(myrosinase enzyme)水解硫代葡萄糖苷(glucosinolates, Glu)所生成的一种异硫氰酸盐,是常见抗氧化剂<sup>[6]</sup>。已有研究证实 SFN 对肾脏损伤有一定的保护作用,但其是否能发挥抗肾小管上皮氧化损伤作用和抑制草酸钙肾结石的形成还有待研究。因此,本次实验观察了 SFN 在大鼠草酸钙肾结石模型中发挥的作用,并探讨其对抑制草酸钙肾结石形成的可能机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物、材料与试剂

使用 7~8 周龄 Wistar 健康雄性大鼠 30 只,体重 180~220 g,饲养于新疆医科大学动物实验中心,实验动物生产许可证号:SCXK(新)2018-0002。

萝卜硫素(货号 R019055-10 mg,罗恩试剂)、丙二醛(MDA)ELISA 试剂盒(货号 A003-1-2,南京建成)、草酸 ELISA 试剂盒(货号:BC4365,索莱宝)、钙盐染色试剂盒(货号:G3282,索莱宝)、苏木素染液(CTS-1097)、磷酸盐缓冲液(PBS, PBS-0060/0061)、DAB 显色试剂盒(DAB-1031)购于福州迈新生物技术有限公司,伊红染液(ZLI-9613)、免疫组化染色试剂盒(SP9000)购于北京中杉金桥生物技术有限公司、Rabbit Anti-8-OHdG/DNA/RNA Damage antibody (bs-1278R) Rabbit Anti-Nrf2 antibody (bs-1074R)购于博奥森、重组 Anti-Catalase 抗体(ab76110) Anti-Glutathione 抗体(ab19534)重组 Anti-Heme Oxygenase 1 抗体(ab189491)购于 abcam 公司。

### 1.2 主要仪器

全自动尿液生化分析仪(arkray, AE-4020)、恒温箱(上海精宏实验设备有限公司, DNP-9272)、恒温鼓风干燥箱(DHG)、显

微镜(Nikon, E200)、超级免疫组化油笔(福州迈新生物技术有限公司, PEN-0002)、免疫组化染色孵育盒(福州迈新生物技术有限公司, BOX-1001)、酶标仪(Bio-Rad, xMarkTM)、微量移液器(单道移液器、多道移液器, 大龙医疗设备有限公司)、电热恒温水槽(DK-80, 上海精宏试验设备有限公司)、微量振荡器(MM-2, 金坛市医疗仪器厂)、涡旋混合器(GI-88B, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。

### 1.3 方法

**1.3.1 实验分组及大鼠草酸钙肾结石模型构建** 将 30 只大鼠随机分成三组:模型组(Model, 10 只)、药物干预组(Drug, 10 只)、空白对照组(Control, 10 只)。进行适应性饲养一周后开始建立大鼠草酸钙肾结石模型:空白对照组使用正常饮用水,标准饲料;模型组使用 1%乙二醇饮用水+2%氯化铵 2 mL/d 灌胃<sup>[7]</sup>,标准饲料;药物干预组使用 1%乙二醇饮用水+2%氯化铵 2 mL/d 灌胃+0.2 mg 萝卜硫素腹腔注射<sup>[8]</sup>,标准饲料。共饲养 28 天。

**1.3.2 尿液标本的收集和肾脏组织的处理** 第 29 天收分别集各组大鼠 24 h 尿液,之后乙醚麻醉断颈处死全部大鼠,使用甲醛进行左侧肾脏内固定,24 h 后按常规方法制作石蜡包埋切片,依次进行洗涤、脱水、透明、浸蜡,最后将大鼠左侧肾脏石蜡包埋后使用全自动切片机连续切片,切片厚度 5  $\mu$ m,切片每组制作 10 张。保存用于后续 HE 染色、Von Kossa 染色与免疫组化分析。

**1.3.3 生化分析仪及 ELISA 法测量大鼠尿液生化指标** 尿液收集后送往新疆医科大学第二附属医院检验科,使用全自动尿液生化分析仪分析大鼠尿液  $K^+$ 、 $Na^+$ 、 $Cl^-$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $P^{5+}$ 、 $Fe^{2+}$  水平。MDA、草酸水平使用 ELISA 试剂盒检测,将尿液标本按照说明书操作配好后用涡旋混匀器混匀,试管口扎紧后刺一小孔,95℃水浴 40 min,取出后使用流水冷却,离心机设定 3500 转/分,离心 10 分钟。每个样取上清 300  $\mu$ L,使用酶标仪于 532 nm 处测量各样本吸光度值。

**1.3.4 HE 染色观测大鼠肾脏损伤情况** 石蜡包埋切片置于 65℃恒温箱中烘烤 1.5-2 h 后用二甲苯浸泡 10 min,更换二甲苯后再浸泡 10 min,无水酒精 I、II 各 5 min,95%、90%、80%、70%酒精、蒸馏水各 5 min 水化,苏木精复染 3 min,盐酸酒精分化数秒(1-2 s),后置蒸馏水、70%、80%、90%、95%酒精中各 3 min,无水乙醇 I、II 各 5 min 脱水,使用伊红复染,二甲苯 I、II 各 5 min 透明后使用中性树胶封片,于 100 倍、400 倍镜下观察结果。

**1.3.5 Von Kossa 染色比较各组大鼠钙盐沉积情况** 将组织切片置于 65℃恒温箱中烘烤 1.5~2 小时后将组织切片用二甲苯

浸泡 10 min, 更换新鲜的二甲苯后再浸泡 10 分钟进行脱蜡处理后水化, 将切片置入 Von Kossa 银溶液强光照射 15-60 min, 使用蒸馏水洗后入海波溶液处理 2 min, 最后使用苏木素复染细胞核 5 分钟左右, 常规脱水透明, 封片, 置入显微镜于 100 倍、400 倍下观察。

**1.3.6 免疫组化法测量各组 GSH、Nrf2、8-OHdG 含量** 将大鼠肾脏组织切片置于 65℃ 恒温箱中烘烤 1.5-2 h, 将组织切片用二甲苯浸泡 10 min, 更换二甲苯后再浸泡 10 min, 无水酒精 I、II 各 5 min, 95%、90%、80%、70% 酒精、蒸馏水各 5 min 水化, 0.01 M 枸橼酸缓冲液 (pH 6.0) 高压锅煮沸后, 将切片置于修复液, 加热至排气, 断火, 使片子在缓冲液中浸泡 10 min, 然后打开盖子室温冷却修复抗原, 新鲜配制的 3%  $H_2O_2$  去离子水浸泡 10 min, 以灭活内源性过氧化物酶活性后将不锈钢提篮浸泡于 PBS 中洗 3 次, 每次 5 min 洗涤, 取适当比例稀释的一抗, 每张片子上滴加已 I 抗 50  $\mu$ L, 4℃ 过夜 (第二天需室温复温 20 min) 进行一抗孵育, 滴加辣根过氧化物酶标记的 II 抗 50  $\mu$ L, 室温静置 20 min 进行二抗孵育, 完成后将不锈钢提篮浸泡于 PBS 中洗 3 次, 每次 3 min。滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素工作液 50  $\mu$ L, 室温孵育 20 min。将不锈钢提篮浸泡于

PBS 中洗 3 次, 每次 5 min, 使用 DAB 显色 3-10 min, 在显微镜下掌握染色程度, 终止染色后复染、脱水、使用二甲苯 I、II 各 5 min 透明后中性树胶封片, 37℃ 烤片过夜。在 200 倍镜下观察结果并下对组织切片分别按染色强度 (0~3 分为阴性着色、淡黄色、浅褐色、深褐色)、阳性范围进行评分 (0~4 分为 0、1~25%、26~50%、51~75%、76~100%), 最终两评分分数相乘, 比较评分。

#### 1.4 统计学方法

尿生化指标等计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组比较采用单因素方差分析 (ANOVA 检验), 组间两两比较采用 q 检验所有分析。使用 SPSS 软件 (25.0 版本) 进行统计学分析,  $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠尿液生化指标结果

模型组大鼠尿液中  $P^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、MDA 和草酸水平均高于空白对照组, 药物干预组大鼠尿液中草酸、 $Ca^{2+}$  和 MDA 水平均低于模型组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。其余指标未见明显差异 ( $P > 0.05$ ) 见图 1。

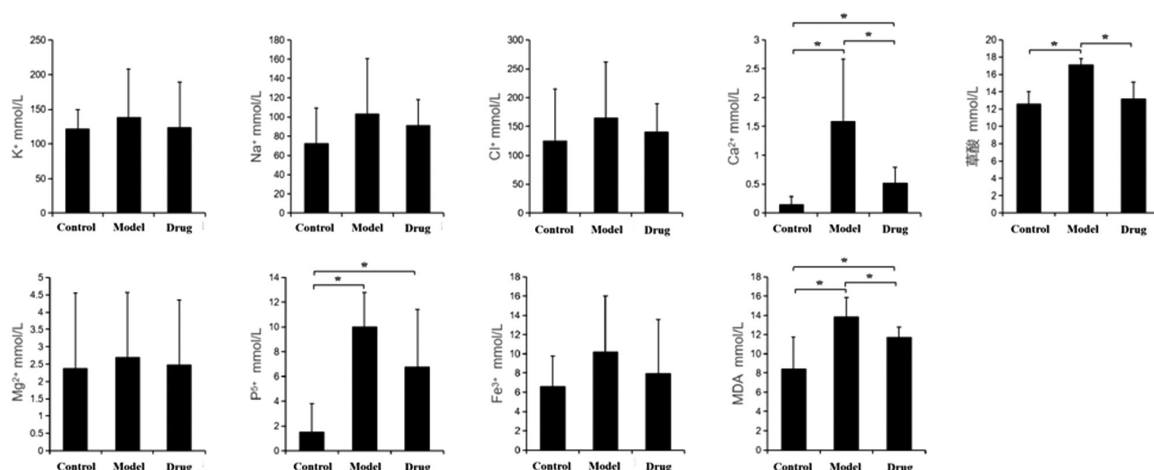


图 1 各组大鼠尿液生化指标水平

Fig. 1 Urine biochemical indexes of rats in each group

Note: Data were expressed as  $\bar{x} \pm SD$ , ompared with group Ctrl, \* $P < 0.05$ .

### 2.2 各组大鼠肾脏病理损伤 HE 染色结果

HE 染色示空白对照组肾小球、肾小管结构基本正常; 模型组部分肾小管空泡变性严重, 扩张明显, 部分肾小管管腔内见较多结晶样物聚集 (红色箭头所示), 部分管腔内见蛋白样管型 (黑色箭头所示), 间质较多炎细胞浸润, 并见较多出血灶; 药物干预组较模型组肾小管空泡变性减轻, 管腔内结晶样物较少, 未见蛋白样管型, 肾小管扩张程度未见明显改变。见图 2。

### 2.3 各组大鼠肾脏 Von Kossa 染色结果

镜下观察, Von Kossa 染色后空白组大鼠肾小管中未见明显黑褐色晶体状草酸钙沉积, 模型组大鼠肾小管中可见数量较多, 体积较大的黑褐色草酸钙晶体沉积 (红色箭头所示), 药物干预组大鼠肾脏草酸钙晶体沉积量较模型组减少。见图 3。

### 2.4 各组大鼠免疫组化结果及 IHC 评分结果

镜下观察, 空白对照组肾小管 GSH、Nrf2 蛋白阳性表达较强, GSH 主要表达于细胞胞浆、Nrf2 主要见于细胞胞浆与胞核

表达。模型组肾小管 GSH、Nrf2 蛋白阳性表达较弱, 8-OHdG 蛋白在细胞胞核中阳性表达较强; 与模型组比较, 药物干预组肾小管 Nrf2、GSH 蛋白阳性表达增强。8-OHdG 蛋白阳性表达减弱。

IHC 评分示模型组 Nrf2、GSH 表达水平低于空白对照组, 8-OHdG 表达水平高于空白对照组; 药物干预组 Nrf2、GSH 表达水平高于模型组, 8-OHdG 表达水平低于模型组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图 4、表 1、图 5。

## 3 讨论

当下, 泌尿系结石是泌尿外科最常见的疾病病种, 高尿酸症与高草酸尿症均为肾结石患者的常见代谢紊乱<sup>[9]</sup>, 高浓度的草酸代谢可进一步诱发肾小管上皮氧化损伤, 进而进一步促进草酸钙晶体的聚集与黏附<sup>[10]</sup>。本次研究通过乙二醇与氯化铵构建大鼠草酸钙肾结石模型, 结果显示模型组大鼠较空白对照组

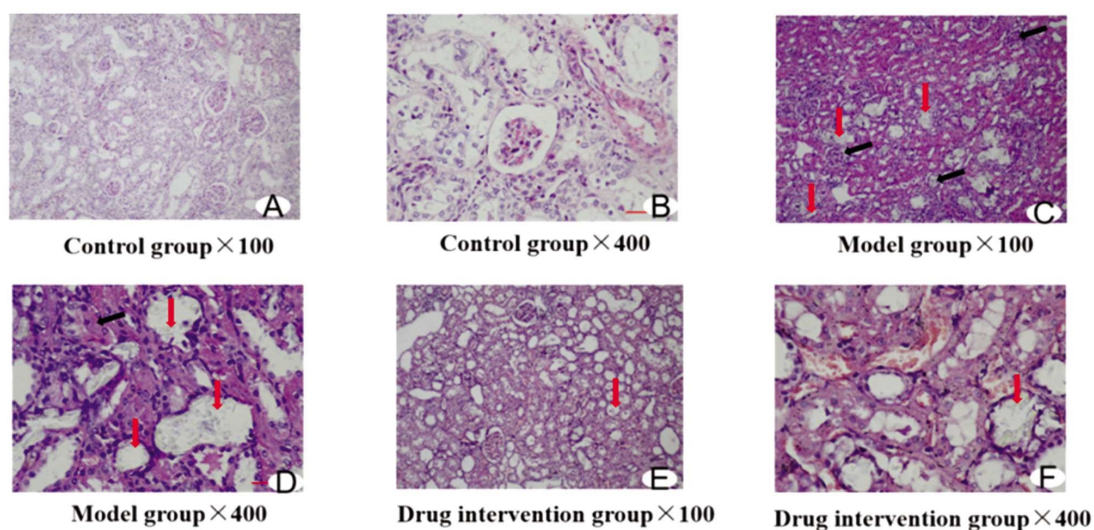


图2 各组大鼠肾脏组织 HE 染色

Fig.2 HE staining of kidney tissue in each group

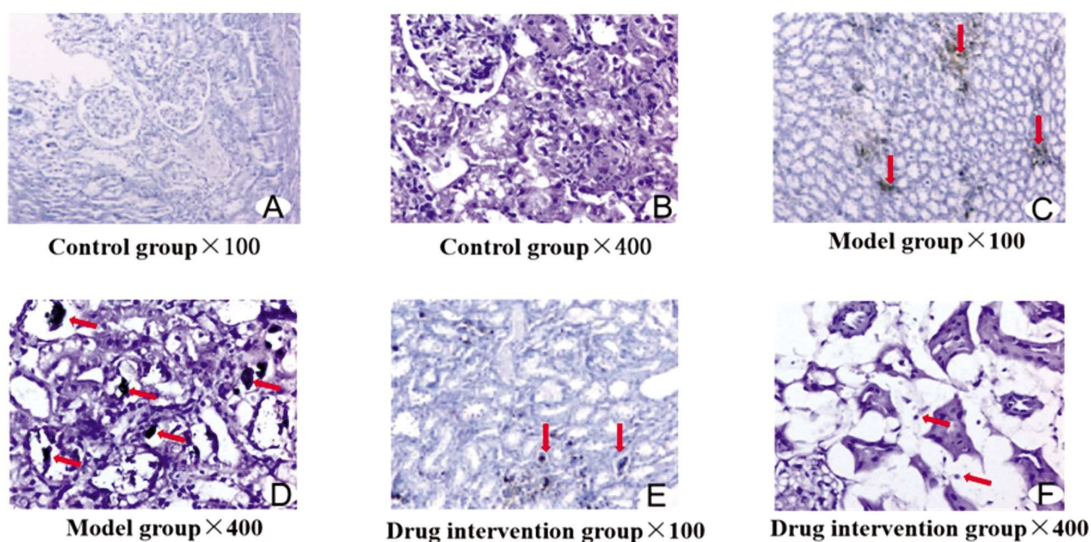


图3 各组大鼠肾脏组织 Von Kossa 染色结果

Fig.3 Von Kossa staining of kidney tissue in each group

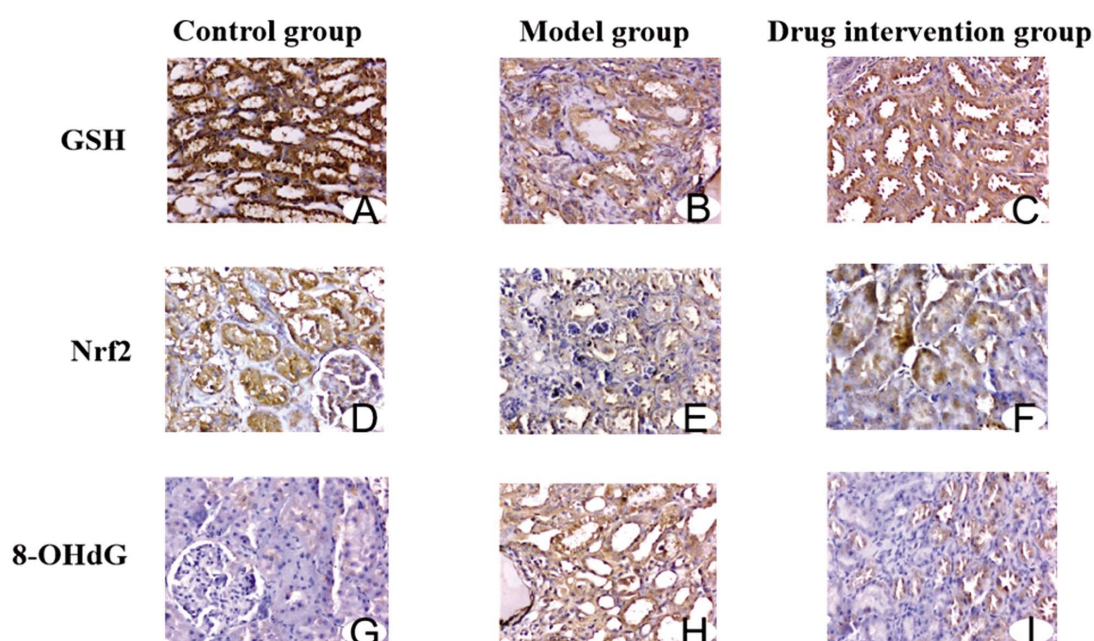


图4 大鼠肾脏组织中各蛋白指标免疫组化(×200)

Fig.4 Immunohistochemical of protein indexes in rat kidney(×200)

表 1 大鼠肾脏组织中各蛋白指标 IHC 评分分析( $\bar{x} \pm s$ , n=6)

Table 1 IHC score analysis of each protein index in rat kidney tissue ( $\bar{x} \pm s$ , n=6)

| Groups                  | GSH                            | Nrf2                             | 8-OHdG                         |
|-------------------------|--------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| Control group           | 6.500 $\pm$ 1.975              | 7.000 $\pm$ 1.095                | 2.333 $\pm$ 1.033              |
| Model group             | 4.167 $\pm$ 1.472 <sup>a</sup> | 2.667 $\pm$ 0.516 <sup>a</sup>   | 3.333 $\pm$ 1.633 <sup>a</sup> |
| Drug intervention group | 5.333 $\pm$ 1.033 <sup>▲</sup> | 4.000 $\pm$ 1.095 <sup>a ▲</sup> | 2.032 $\pm$ 1.072 <sup>▲</sup> |

Note: Data were expressed as  $\bar{x} \pm SD$ , <sup>a</sup>  $P < 0.05$  vs control group; <sup>▲</sup>  $P < 0.05$  vs model group.

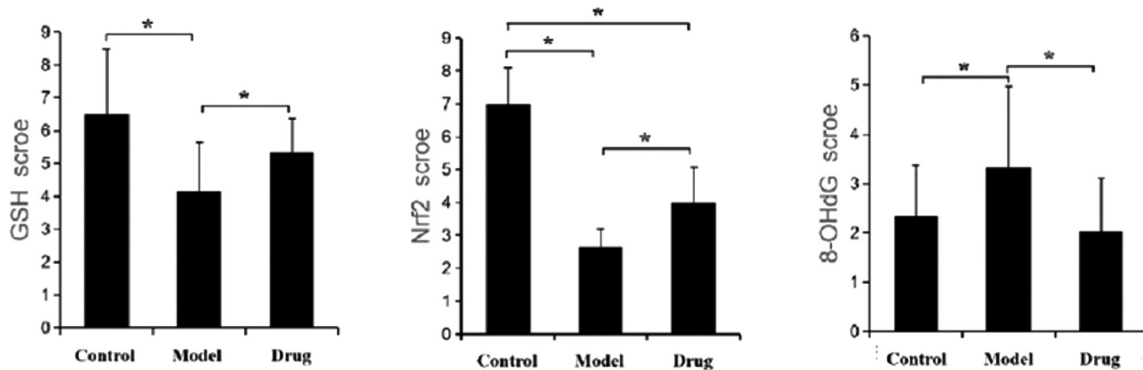


图 5 大鼠肾脏组织中各蛋白指标 IHC 评分图

Fig.5 IHC score of each protein index in rat kidney tissue

大鼠尿液中钙、磷、草酸水平显著增高,HE 结果显示肾小管空泡变性严重、扩张明显、部分管腔内见结晶样物,Von Kossa 染色显示大鼠肾小管出现大量褐色钙盐沉积。大鼠出现尿钙、磷、草酸代谢异常,肾小管出现损伤与草酸钙晶体聚集,表明草酸钙肾结石模型大鼠建模成功。

草酸钙结石的形成机制目前尚无定论,随着研究的深入,学者普遍认为氧化应激损伤在该疾病的进展过程中扮演重要角色<sup>[11]</sup>。活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)大量生成引起的氧化应激促进了结石形成<sup>[12]</sup>,该物质引起炎症性的细胞因子和蛋白聚集,最后促使肾小管上皮细胞损伤和基底膜的暴露,致使草酸钙结晶粘附、聚集和生长在受损伤的肾小管上皮细胞<sup>[13]</sup>,该现象发生后进一步引起了肾小管上皮的氧化损伤和炎症损害,最后导致脂质过氧化引起肾小管细胞膜以及细胞器损伤,细胞凋亡坏死,导致草酸钙结晶最终成石<sup>[14]</sup>。目前,MDA、GSH 和 8-OHdG 已被认为是机体反映氧化损伤程度的生物标志物,已被较多应用于各种疾病氧化损伤判定以及评价抗氧化应激治疗效果<sup>[15,16]</sup>。本次研究表明,模型组大鼠尿液中 MDA、草酸、肾脏中氧化 GSH 表达水平低于空白对照组,8-OHdG 含量较空白对照组明显增高,表明模型组大鼠肾脏发生了较强的氧化损伤反应。结合 HE 染色结果,提示在泌尿系结石发生时,肾小管出现了氧化损伤现象,这个结论与 Wang 团队<sup>[17]</sup>的研究结果基本一致。

SFN 是一种很有研究前景的化合物,该物质可影响细胞增殖在调节炎症反应和凋亡,在影响血管生成等方面发挥着重要作用<sup>[18,19]</sup>。近年研究发现 SFN 优秀的抗氧化作用是通过激活 Nrf2 信号通路,上调 HO-1 等抗氧化蛋白的表达发挥的<sup>[20,21]</sup>。既往研究证实,SFN 对于脓毒症相关急性肾损伤(SA-AKI)大鼠肾组织的氧化应激损伤具有一定程度的保护作用<sup>[22]</sup>。龙青等<sup>[23]</sup>同样证实了 SFN 能够诱导肾病综合征大鼠一氧化氮合酶

(eNOS)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)和神经型一氧化氮合酶(nNOS)的表达,提升大鼠体内 NO 水平,降低尿蛋白含量,改善肾脏损伤程度。Liang Weiqiang 等<sup>[24]</sup>发现 SFN 依赖的 NRF2 活性上调可减轻失血性休克/复苏后小鼠的全身炎症反应和肺损伤。本次研究表明,药物干预组大鼠尿液中 MDA、草酸、钙、磷含量较模型组大鼠显著降低,HE 染色表明在使用 SFN 干预后肾脏的损伤程度较未干预时明显下降,免疫组化结果显示氧化损伤关键指标 GSH 表达水平明显高于模型组,8-OHdG 含量较模型明显下降,提示 SFN 在大鼠肾小管上皮通过其抗氧化作用减缓肾脏损伤,抑制了大鼠肾结石的形成。

Nrf2 是一种碱性亮氨酸拉链转录因子,通过诱导 100 多种细胞保护蛋白(包括抗氧化剂和 II 期解毒酶)防御氧化应激和亲电性毒物。在氧化或亲电应激条件下,Nrf2 途径被激活<sup>[25]</sup>。陈帆团队<sup>[26]</sup>发现 SFN 可能通过激活 Nrf2/Keap1/HO-1 信号通路,上调 HO-1 等抗氧化蛋白的表达而起到治疗子宫内膜异位症(EMs)的效果。孙肖伟等<sup>[27]</sup>在矽肺模型大鼠中发现 SFN 能激活 Nrf2/ARE 通路,从而缓解肺组织纤维化及氧化应激。Zhang 等<sup>[28]</sup>在阿尔兹海默大鼠模型发现,SFN 显著上调 Nrf2 蛋白的表达,同时增加硫氧还蛋白和谷胱甘肽的含量和相关抗氧化酶的活性,在沉默 Nrf2 后,SFN 对 ROS 产生的抑制作用减弱,表明 SFN 通过 Nrf2 信号通路发挥其抗氧化作用。Russo M<sup>[29]</sup>研究表明,在分子水平上,SFN 通过激活转录因子 Nrf2 调节细胞内稳态,发挥相应的抗氧化及抗癌作用。在本次研究结果中,药物干预组大鼠肾脏组织中 Nrf2 蛋白水平较模型组大鼠显著提高,表明 SFN 在大鼠草酸钙肾结石模型中通过激活了 Nrf2 信号通路发挥其抗氧化损伤作用。

综上所述,萝卜硫素可减轻草酸钙肾结石大鼠肾小管的氧化损伤,抑制大鼠草酸钙肾结石的生成,该作用可能与萝卜硫素激活 Nrf2 及其介导的抗氧化应激信号通路有关。然而,本次

实验仅对萝卜硫素对大鼠草酸钙肾结石的调控作用进行了初步探究, 萝卜硫素在大鼠肾脏中激活 Nrf2 信号通路的下游蛋白以及萝卜硫素在不同浓度或不同干预时间下对草酸钙肾结石的具体影响仍有待进一步探究。

#### 参考文献(References)

- [1] 王施广, 王娟, 王振, 等. 泌尿系结石的流行病学研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(003): 597-600
- [2] 中国泌尿外科疾病诊断治疗指南编写委员会. 中国泌尿外科疾病诊断治疗指南: 2014 版 [M]. 那彦群, 孙颖浩. 尿石症诊断治疗指南. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 129
- [3] Chaiyarit Sakdithep, Thongboonkerd Visith. Oxidative modifications switch modulatory activities of urinary proteins from inhibiting to promoting calcium oxalate crystallization, growth and aggregation[J]. Mol Cell Proteomics, 2021, undefined: 100151
- [4] Mathew Annie A-S, Prem-Santhosh Subramanian, Ravichandran Jayasuriya, et al. The Pivotal Role of Nrf2 Activators in Adipocyte Biology[J]. Pharmacol Res, 2021, undefined: 105853
- [5] Atala Anthony. Re: SIRT3 Inhibited the Formation of Calcium Oxalate-Induced Kidney Stones through Regulating NRF2/HO-1 Signaling Pathway[J]. J Urol, 2019, 202(1): 36-37
- [6] Subedi Lalita, Cho KyoHee, Park Yong Un, et al. Sulforaphane-Enriched Broccoli Sprouts Pretreated by Pulsed Electric Fields Reduces Neuroinflammation and Ameliorates Scopolamine-Induced Amnesia in Mouse Brain through Its Antioxidant Ability via Nrf2-HO-1 Activation [J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019: 3549274
- [7] Sun Ling, Zou Lu-Xi, Wang Jie, et al. Mucin 4 Gene Silencing Reduces Oxidative Stress and Calcium Oxalate Crystal Formation in Renal Tubular Epithelial Cells Through the Extracellular Signal-Regulated Kinase Signaling Pathway in Nephrolithiasis Rat Model[J]. Kidney Blood Press Res, 2018, 43: 820-835
- [8] Liu Haoran, Yang Xiaoqi, Tang Kun, et al. Sulforaphane elicits dual therapeutic effects on Renal Inflammatory Injury and crystal deposition in Calcium Oxalate Nephrocalcinosis [J]. Theranostics, 2020, 10: 7319-7334
- [9] 崔智, 陈洪波. 草酸钙肾结石形成机理的研究进展[J]. 临床医学研究与实践, 2021, 6(21): 196-198
- [10] Arafa Ahmed, Eshak Ehab S, Iso Hiroyasu. Oxalates, urinary stones and risk of cardiovascular diseases [J]. Med Hypotheses, 2020, 137: 109570
- [11] Sun Xin-Yuan, Zhang Hui, Liu Jie, et al. Repair activity and crystal adhesion inhibition of polysaccharides with different molecular weights from red algae *Porphyra yezoensis* against oxalate-induced oxidative damage in renal epithelial cells[J]. Food Funct, 2019, 10(7): 3851-3867
- [12] Khan Saeed R, Joshi Sunil, Wang Wei, et al. Regulation of macromolecular modulators of urinary stone formation by reactive oxygen species: transcriptional study in an animal model of hyperoxaluria [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2014, 306 (11): F1285-95
- [13] 吴冠伟, 阿不都赛买提·艾力, 李彬, 等. 草酸钙肾结石大鼠模型肾组织中 Klotho 的表达及其意义[J]. 临床与病理杂志, 2017, 37(02): 359-365
- [14] Oh AJ, Nam BY, Lee MJ, et al. Decreased circulating klotho levels in patients undergoing dialysis and relationship to oxidative stress and inflammation[J]. Petit Dial Int, 2015, 35(1): 43-51
- [15] Chiang P L, Chen H L, Lu C H, et al. Interaction of systemic oxidative stress and mesial temporal network degeneration in Parkinson's disease with and without cognitive impairment[J]. Journal of Neuroinflammation, 2018, 15(1): 281
- [16] 龙云霞. 血清中 8-OHdG、MDA、SOD 和 T-AOC 对脑卒中患者的诊断价值[J]. 中华卫生应急电子杂志, 2020, 6(04): 233-238
- [17] Wang Jian, Chen Jia-Jian, Huang Jia-Hao, et al. Lysimachia christinae Protective Effects of Total Flavonoids from on Calcium Oxalate-Induced Oxidative Stress in a Renal Cell Line and Renal Tissue [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 2021: 6667902
- [18] 李小冬, 郭贝贝, 杨英士, 等. 萝卜硫素抗癌机理研究进展[J]. 中药材, 2015, 38(008): 1768-1771
- [19] Mokhtari R B, Baluch N, Homayouni T S, et al. The role of Sulforaphane in cancer chemoprevention and health benefits: a mini-review [J]. Journal of Cell Communication and Signaling, 2018, 12(1): 91-101
- [20] 孙晓伟, 肖华, 宋学术, 等. 萝卜硫素通过 Nrf2/ARE 通路缓解矽肺模型大鼠肺组织纤维化及氧化应激的实验研究[J]. 临床和实验医学杂志, 2020, (6): 586-604
- [21] 易国栋, 谭静. 萝卜硫素通过 Nrf2/ARE 通路对人结肠上皮细胞氧化应激损伤的调控作用[J]. 西部中医药, 2019, 032(011): 40-43
- [22] 汤鲁明, 徐俊南, 林海鸟, 等. 萝卜硫素对脓毒症相关急性肾损伤大鼠氧化应激损伤的保护作用[J]. 中华危重症医学杂志(电子版), 2021, 14(03): 187-191
- [23] 龙青, 杜宗华. 萝卜硫素对肾病综合征大鼠肾脏损伤保护的机制研究[J]. 国际泌尿系统杂志, 2020, (02): 289293
- [24] Liang Weiqiang, Greven Johannes, Fragoulis Athanassios, et al. Sulforaphane-Dependent Up-Regulation of NRF2 Activity Alleviates Both Systemic Inflammatory Response and Lung Injury After Hemorrhagic Shock/Resuscitation In Mice [J]. Shock, 2021 [Epub ahead of print]
- [25] Lu Hongyan, Sun Xifeng, Jia Min, et al. Rosiglitazone Suppresses Renal Crystal Deposition by Ameliorating Tubular Injury Resulted from Oxidative Stress and Inflammatory Response via Promoting the Nrf2/HO-1 Pathway and Shifting Macrophage Polarization [J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 5527137
- [26] 陈帆, 高扬, 边文玲, 等. 萝卜硫素对大鼠子宫内膜异位组织 Nrf2/Keap1/HO-1 信号通路影响 [J]. 中国计划生育学杂志, 2021, 29(04): 652-656
- [27] 孙晓伟, 肖华, 宋学术, 等. 萝卜硫素通过 Nrf2/ARE 通路缓解矽肺模型大鼠肺组织纤维化及氧化应激的实验研究[J]. 临床和实验医学杂志, 2020, 19(06): 586-589
- [28] Zhang Shunxi, Zhao Jiahe, Bai Zhihui, et al. Sulforaphane inhibits the production of A $\beta$  partially through the activation of Nrf2-regulated oxidative stress [J]. Food Funct, 2021 [Epub ahead of print]
- [29] Russo Maria, Spagnuolo Carmela, Russo Gian Luigi, et al. Nrf2 targeting by sulforaphane: A potential therapy for cancer treatment[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2018, 58(8): 1391-1405