

六味地黄方抑制草酸钙结石形成的实验研究

刘 博¹, 区淑蕴², 苏 倩², 尹春萍^{2*}

1. 华中科技大学同济医学院, 湖北 武汉 430030

2. 华中科技大学同济医学院药学院, 湖北 武汉 430030

摘要: 目的 探讨六味地黄方体外对草酸钙结石形成的影响。方法 采用种晶技术检测六味地黄方不同质量浓度(20、10、5、1 mg/mL)在体外对(Coo)₂Ca·H₂O晶体生长的抑制指数。60只SD大鼠随机分为6组, 对照组, 模型组, 阳性对照组, 六味地黄方高、中、低剂量(0.8、0.4、0.2 g/kg)组。饲养4周后, 检测各组大鼠血生化指标, 24 h尿草酸量, Ca²⁺、Mg²⁺分泌量和肾组织Ca²⁺、Mg²⁺水平。镜下观察各组大鼠肾组织切片中草酸钙结晶分布及组织病理改变。结果 体外实验中, 20、10、5 mg/mL六味地黄方对结晶生长抑制指数分别为98.50%、89.20%、43.94%, 明显高于对照组($P < 0.05$)。体内实验, 六味地黄方高剂量组大鼠血清尿素氮(BUN)、肌酐(SCr)水平, 肾Ca²⁺水平, 24 h尿Ca²⁺分泌量及肾组织草酸钙结晶沉积均低于模型组与阳性对照组($P < 0.05$)。结论 六味地黄方具有抑制草酸钙结石形成的作用, 并且其抑制效果优于枸橼酸钾。

关键词: 六味地黄方; 结石; 草酸钙; 尿素氮; 枸橼酸钾

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)06-1186-04

Inhibition of Liuwei Dihuang Prescription on formation of calcium oxalate stone

LIU Bo¹, OU Shu-yun², SU Qian², YIN Chun-ping²

1. Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

2. School of Pharmacy, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Key words: Liuwei Dihuang Prescription; calculus; calcium oxalate; urea nitrogen; potassium citrate

尿石症是泌尿系统各部位结石病的总称, 是泌尿系统的常见疾病, 而草酸钙结石占尿石症的80%左右。尽管尿石症的治疗方法已取得了长足进展, 但手术取石或体外冲击波后复发率极高, 因此通过药物预防和治疗尿石症是基础研究与临床应用的主要方向。中药治疗泌尿系结石历史悠久, 且具有不良反应少、经济易得、疗效确切等特点^[1]。

六味地黄方出自宋代名医钱乙的《小儿药证直诀》一书, 由熟地黄、山萸肉、山药、泽泻、牡丹皮、茯苓6味中药组成, 具有滋补肝肾的功效, 是历史悠久的经典名方, 其除具有调节免疫、抗衰老等作用外, 在肾脏疾病的实验研究及临床应用中也较广泛^[2-3]。研究报道^[4]六味地黄丸可降低尿路结石体外冲击波碎石术后结石的复发率。目前研究证实, 六味地黄方中泽泻^[5-7]、茯苓^[8]的成分对草酸钙结石形成具有明显的抑制作用。本研究通过体外与体内动物实验进一步探讨六味地黄方对草酸钙结石形成的影响, 为其在尿

石症防治中的应用提供理论依据。

1 材料

1.1 药材与药品

泽泻、牡丹皮(武汉刘天保药业有限责任公司, 批号080907、080801), 茯苓、熟地黄、山萸肉、干山药(亳州千草药业公司, 批号081026、081026、081026、081026), 以上药材均经华中科技大学同济医学院药学院生药系尹春萍副教授鉴定。枸橼酸钾溶液(华中科技大学同济医学院附属同济医院配制, 质量浓度0.1 g/mL, 批号091014); 阿法骨化醇片(重庆药友制药有限责任公司, 规格0.25 μg/片, 批号0902010)。

1.2 动物

健康SD雄性大鼠, 8~9周龄、体质量180~220 g(清洁级, 华中科技大学同济医学院实验动物中心提供), 实验动物使用许可证号: SCXK(鄂)2004-2007。

收稿日期: 2010-07-05

作者简介: 刘 博(1989—), 男, 湖北省武汉市人, 华中科技大学同济医学院临床专业, 参与国家大学生创新课题。

Tel: 15927168582 E-mail: 332998109@qq.com

*通讯作者 尹春萍

1.3 仪器

全自动生化分析仪 (Roche Modular DPP), Varian AA240FS 原子吸收分光光度计, Olympus BX51 光学显微镜。

2 方法

2.1 药物制备

分别制备单味泽泻 (50 g) 及六味地黄方提取物, 六味地黄方处方来源于《中国药典》2010 年版: 茯苓 50 g、山药 66.6 g、山茱萸 66.6 g、熟地 133.3 g、牡丹皮 50 g、泽泻 50 g。泽泻及六味地黄方均煎煮 3 次, 收集滤液, 分别浓缩至 1 g/mL (生药量) 的浸膏, 分装冷藏备用。六味地黄方经 HPLC 测定丹皮酚质量浓度 1.1 mg/mL。

2.2 六味地黄方对草酸钙晶体外生长的抑制作用

取 pH 6.5 Tris 缓冲液 48 mL, 加入 0.03 mol/L 氯化钙和 0.03 mol/L 草酸钙各 1.0 mL, 混匀得 0.6 mmol/L 草酸钙亚饱和液 50 mL。实验分为 6 组, 取草酸钙亚饱和液 50 mL, 分别加入等体积双蒸水, 泽泻浸膏 (20 mg/mL) 及不同质量浓度 (20、10、5、1 mg/mL) 六味地黄方浸膏, 各组均在 37 °C 恒温振荡 10 min, 分别取样 3 mL, 经微孔滤膜滤过, 均加入一水草酸钙种晶悬液 (5 mg/mL) 0.5 mL, 继续恒温水浴振荡 3 h, 分别取 3 mL 滤过。原子吸收分光光度计测滤液中 Ca^{2+} 的吸光度 (A) 值。另精密吸取钙标准溶液适量, 分别稀释成系列浓度为 0.5、1、4、6、8 $\mu\text{g/mL}$ 的标准溶液, 原子吸收分光光度计测定 A 值, 绘制标准曲线。根据标准曲线计算各滤液 Ca^{2+} 浓度, 各组平行操作 3 管, 根据公式计算草酸钙结晶生长抑制指数。

$$\text{抑制指数} = 1 - (C_0 - C_2) / (C_0 - C_1)$$

式中 C_0 为加晶前滤液中 Ca^{2+} 浓度; C_1 与 C_2 分别为蒸馏水和药物处理组加种晶孵育 3 h 后滤液中的 Ca^{2+} 浓度

2.3 六味地黄方对实验性大鼠草酸钙结石形成的影响

2.3.1 动物分组与给药 大鼠适应性饲养第 1 周后, 随机分为 6 组, 每组 10 只, 即对照组, 模型组, 阳性对照组 (枸橼酸钾溶液 0.5 g/kg), 六味地黄方高、中、低剂量 (0.8、0.4、0.2 g/kg) 组。除对照组外, 各组大鼠使用标准常规饲料, 1% 乙二醇自来水饮水及隔天 ig 0.5 μg 阿法骨化醇 28 d, 诱导泌尿系草酸钙 (CaOx) 结晶形成, 同时每天 ig 给药 1 次。对照组自来水喂养, 每天 ig 1 mL 蒸馏水。

2.3.2 指标检测及肾组织病理检查 实验第 28 天用

代谢笼收集大鼠 24 h 尿液, 测定尿量、尿 pH 值、尿总 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 CaOx 的分泌量。原子吸收分光光度法测定尿总 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 水平。高锰酸钾退色法测定尿草酸分泌量。称量各组大鼠体质量后, 断颈处死, 下腔静脉取血, 5 000 r/min 离心 15 min, 取血清, 全自动生化分析仪测定血尿素氮 (BUN)、肌酐 (SCr)、P、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 水平。切取双肾, 右侧肾脏置 10 mL Tris-HCl 缓冲液 (0.02 mol/L, pH 7.4) 中匀浆, 离心, 取上清液于原子吸收光谱仪进行肾组织 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 测定。左侧肾脏用 10% 中性福尔马林固定, 石蜡包埋, 作常规 HE 染色切片和 Von-kossa's 染色切片, 光学显微镜下观察肾组织 CaOx 结晶形态分布及肾组织病理改变。

2.4 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异用 F (One-way ANOVA) 检验进行统计分析。

3 结果

3.1 六味地黄方对草酸钙晶体外生长的抑制作用

单味泽泻及不同质量浓度六味地黄方处理组, 草酸钙结晶生长的抑制指数显著高于对照组; 20、10 mg/mL 六味地黄方浸膏处理组草酸钙结晶生长的抑制指数高于单味泽泻处理组 ($P < 0.05$), 结果见表 1。

表 1 六味地黄方对草酸钙晶体外生长的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Inhibition of Liuwei Dihuang Prescription on formation of calcium oxalate crystal *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	$\rho / (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	抑制指数/%
对照	—	0
泽泻	20	63.18*
六味地黄方	20	98.50* [△]
	10	89.20* [△]
	5	43.94*
	1	15.73*

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与泽泻组比较: $\Delta P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs *Alismatis Rhizoma* group

3.2 六味地黄方对实验性大鼠尿草酸钙结晶形成的影响

3.2.1 一般情况 模型组大鼠食量、体质量均小于其他各组, 但无显著差异 ($P > 0.05$)。实验期间模型组有 2 只大鼠死亡。

3.2.2 生化指标检测 对照组大鼠血清 BUN、SCr 量明显低于其余各组 ($P < 0.05$); 而 Ca^{2+} 、P、 Mg^{2+}

水平各组间无显著性差异 ($P>0.05$); 六味地黄方高、中、低剂量组大鼠血清 BUN、SCr 量明显低于阳性对照组和模型组 ($P<0.05$), 结果见表 2。

3.2.3 24 h 尿 CaOx、Ca²⁺、Mg²⁺ 分泌量及肾组织 Ca²⁺、Mg²⁺ 水平 对照组大鼠 24 h 尿量, 尿 CaOx、Ca²⁺ 分泌量, 肾组织 Ca²⁺ 水平均明显低于其他组 ($P<0.05$);

尿 pH、尿 Mg²⁺ 分泌量、肾组织 Mg²⁺ 量各组间均无明显差异; 模型组、阳性对照组及六味地黄方各组间尿 CaOx 分泌量未见显著性差异; 枸橼酸钾组及六味地黄方各剂量组, 尿及肾组织 Ca²⁺ 量显著低于模型组 ($P<0.05$); 六味地黄方高、中剂量组尿及肾组织 Ca²⁺ 量也明显低于枸橼酸钾组, 结果见表 3。

表 2 各组大鼠血生化检测结果 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Results of serum biochemistry values of rats in every group ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	动物/ 只	BUN/(mmol·L ⁻¹)	SCr/(μmol·L ⁻¹)	Ca ²⁺ /(mmol·L ⁻¹)	P/(mmol·L ⁻¹)	Mg ²⁺ /(mmol·L ⁻¹)
对照	—	10	6.71 ± 0.81 ^{△△}	30.94 ± 4.27 ^{△△}	2.95 ± 0.09	3.81 ± 0.56	1.15 ± 0.34
模型	—	8	27.34 ± 14.98*	67.04 ± 30.78*	3.15 ± 0.18	3.47 ± 0.76	1.02 ± 0.34
枸橼酸钾	0.5	10	25.38 ± 12.14*	63.26 ± 19.22*	3.29 ± 0.34	3.97 ± 0.81	1.11 ± 0.30
六味地黄方	0.8	10	16.90 ± 6.68 ^{*△△}	38.69 ± 14.19 ^{*△△}	2.95 ± 0.28	3.10 ± 0.70	0.96 ± 0.18
	0.4	10	20.73 ± 8.44 ^{*△△}	50.89 ± 12.66 ^{*△△}	3.27 ± 0.26	3.86 ± 1.16	1.25 ± 0.30
	0.2	10	22.45 ± 6.21 ^{*△△}	51.21 ± 8.94 ^{*△△}	3.03 ± 0.22	3.56 ± 0.57	0.98 ± 0.07

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [△] $P<0.05$; 与枸橼酸钾组比较: ^{△△} $P<0.05$, 表 3 同

* $P<0.05$ vs control group; [△] $P<0.05$ vs model group; ^{△△} $P<0.05$ vs potassium citrate group, Table 3 is same

表 3 各组大鼠尿 CaOx、Ca²⁺、Mg²⁺ 分泌量及肾组织 Ca²⁺、Mg²⁺ 水平 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 CaOx, Ca²⁺, and Mg²⁺ excretions in urinary and Ca²⁺, Mg²⁺ content in renal tissue of rats in every group ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	动物/ 只	尿量/mL	尿 pH 值	尿分泌量/(mmol·d ⁻¹)			Ca ²⁺ / (mg·g ⁻¹)	Mg ²⁺ / (mg·g ⁻¹)
					CaOx	Ca ²⁺	Mg ²⁺		
对照	—	10	15.00 ± 4.60 ^{△△}	6.35 ± 0.54	0.21 ± 0.08 ^{△△}	0.25 ± 0.09 ^{△△}	0.84 ± 0.16	0.64 ± 0.21 ^{△△}	1.11 ± 0.14
模型	—	8	39.86 ± 6.07*	6.34 ± 0.80	0.41 ± 0.12*	0.53 ± 0.25 ^{*△}	0.81 ± 1.10	2.92 ± 0.22 ^{*△}	0.98 ± 0.16
枸橼酸钾	0.5	10	42.38 ± 9.26 ^{*△}	6.33 ± 0.78	0.35 ± 0.11*	0.43 ± 0.28 ^{*△}	0.82 ± 0.45	2.31 ± 0.69*	1.04 ± 0.17
六味地黄方	0.8	10	51.50 ± 7.78 ^{*△}	6.34 ± 1.42	0.34 ± 0.01*	0.34 ± 0.07 ^{*△△}	0.78 ± 0.67	1.94 ± 0.21 ^{*△△}	1.05 ± 0.08
	0.4	10	48.50 ± 11.52 ^{*△}	6.35 ± 1.04	0.36 ± 0.03*	0.37 ± 0.12 ^{*△△}	0.88 ± 1.10	1.98 ± 0.35 ^{*△△}	1.05 ± 0.12
	0.2	10	51.00 ± 8.45 ^{*△}	6.33 ± 0.67	0.38 ± 0.04*	0.40 ± 0.04 ^{*△}	0.92 ± 1.23	2.04 ± 0.54 ^{*△}	1.01 ± 0.17

3.2.4 肾组织病理学检查及偏光显微镜检查 肉眼观察, 对照组大鼠肾脏表面光滑, 呈鲜红色, 色泽一致, 切开可见明显的皮、髓质分界, 组织结构紧凑清晰, 触之光滑。除对照组外, 其余各组肾脏均有不同程度肿大(模型组大鼠尤为明显), 呈苍白色, 色泽暗淡。模型组大鼠肾脏切开后可见皮髓质分界模糊, 皮质变薄, 结构组织疏松, 触之有明显的磨砂感。常规病理切片 HE 染色后, 草酸钙结晶在显微镜下呈淡蓝色晶体, 不规则, 折光性较强; Von-kossa's 染色后, 草酸钙晶体显黑褐色。对照组大鼠肾组织结构正常, 模型组大鼠肾组织中可见大量草酸钙结晶, 主要存在于肾皮质、肾乳头、肾小

管内, 肾小体结构破坏, 肾小管管腔明显扩张, 多数管腔内可见连接成片的草酸钙结晶; 在高倍镜下观察可见肾小管上皮细胞肿大、变性、坏死, 管腔内可见嗜伊红染色样坏死物质及部分脱落上皮细胞, 肾间质可见慢性炎性细胞。阳性对照组及六味地黄方各剂量组大鼠肾组织中结晶明显少于模型组, 肾组织结构破坏较模型组轻。六味地黄方高剂量组大鼠肾组织结晶仅少量存在于肾皮质, 肾小体结构少量破坏, 肾小管管腔扩张较轻, 管腔内未见明显的坏死脱落物质, 肾间质中慢性炎性细胞极为少见, 见图 1。

4 讨论

本研究通过体外与体内动物实验探讨六味地黄

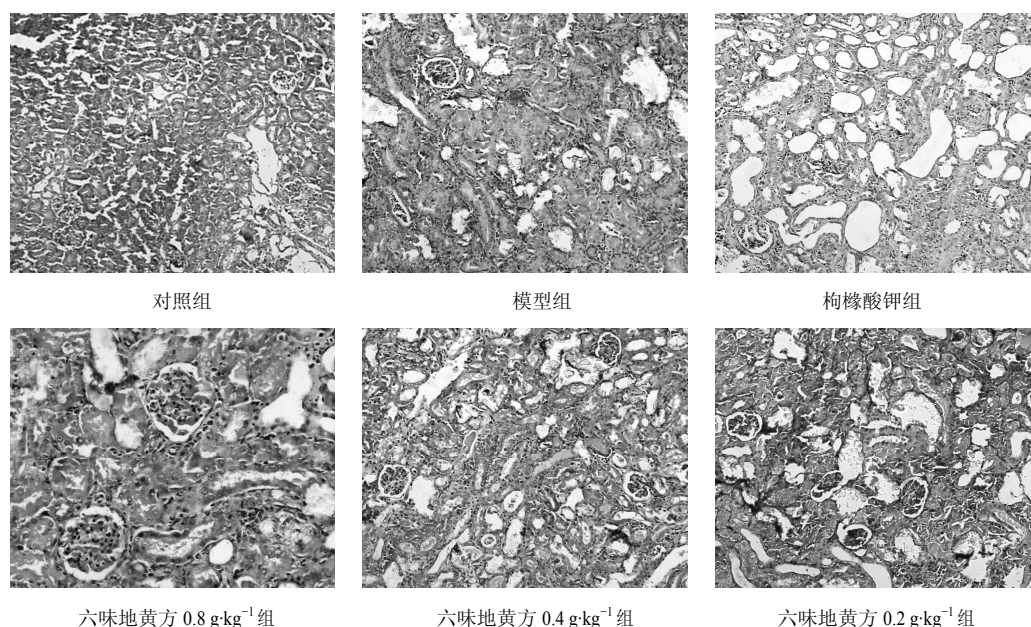


图 1 肾组织切片 (HE)

Fig. 1 Kidney sections viewed under light microscope (HE)

方对草酸钙结石形成的影响。体外实验表明, 六味地黄方能抑制草酸钙晶体的生长, 且 10、20 mg/mL 六味地黄方的抑制效果优于 20 mg/mL 单味泽泻处理组。本实验采用 1% 乙二醇饮水和 ig 阿法骨化醇诱导 SD 大鼠草酸钙结石模型^[9], 结果表明, 模型组大鼠的血清 BUN、SCr 量, 24 h 尿 CaOx、Ca²⁺分泌量及肾组织 Ca²⁺水平明显高于对照组, 这与肾组织病理切片检查结果一致, 证实草酸钙结石模型诱导成功。而六味地黄方各剂量组血清 BUN、SCr 量, 24 h 尿 Ca²⁺分泌量及肾组织 Ca²⁺水平明显低于模型组, 且能减少草酸钙晶体在肾组织内的沉积, 在一定程度上减轻了肾小管的扩张及肾功能的损伤, 表明六味地黄方具有明显的抑制草酸钙结石形成, 并保护肾组织功能的作用。另外, 六味地黄方各剂量组大鼠 24 h 尿量明显多于对照组和模型组, 有较强的利尿作用, 有利于草酸钙结石的排出。六味地黄方各剂量组大鼠血 BUN、SCr 量, 24 h 尿 Ca²⁺分泌量及肾组织 Ca²⁺水平均低于枸橼酸钾组, 表明六味地黄方对草酸钙结石形成的抑制效果要优于枸橼酸钾。

六味地黄方作为经典名方, 已广泛应用于临床, 本研究证实其对草酸钙结石形成具有良好的抑制作用, 为其在尿石症防治中的临床应用提供理论依据。

参考文献

- [1] 邓芳, 罗旭彪, 曾桂生, 等. 植物药治疗泌尿系结石的研究进展 [J]. 中草药, 2007, 38(8): 1272-1276.
- [2] 彭亚军, 何泽云. 六味地黄丸方治疗肾脏病研究进展 [J]. 中国中医急症, 2009, 18(7): 1151-1152.
- [3] 邓红, 王新, 徐芳, 等. 六味地黄汤对糖尿病肾病大鼠肾功能及细胞凋亡的影响 [J]. 中草药, 2010, 41(10): 1679-1682.
- [4] 黄少波. 六味地黄丸防治尿路结石体外冲击波碎石术后复发临床观察 [J]. 广西中医药, 2009, 32(3): 27-28.
- [5] 李浩勇, 刘继红, 曹正国, 等. 中药泽泻提取物对尿草酸钙结石形成影响的实验研究 [J]. 中华泌尿外科杂志, 2003, 24(10): 658-662.
- [6] 曹正国, 吴维, 刘继红, 等. 泽泻中 3 中化学成分抑制尿草酸钙结石形成的体外研究 [J]. 中国新药杂志, 2005, 14(2): 166-168.
- [7] 曹正国, 刘继红, 尹春萍, 等. 泽泻活性成分对肾结石模型大鼠 bikunin 表达的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2006, 16(11): 1601-1605.
- [8] 欧阳健明, 周娜. 中草药治疗泌尿系结石的配位化学基础 [J]. 中草药, 2004, 35(5): 579-582.
- [9] 曹正国, 刘继红, 段永芳, 等. 几种实验性大鼠肾草酸钙结石模型的比较研究 [J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2002, 31(5): 556-559.