

# 芦根提取液预防雄性大鼠草酸钙肾结石的研究

贾希栋<sup>1</sup>, 张春阳<sup>2\*</sup>, 刘迎光<sup>1</sup>, 张兵<sup>3</sup>, 赵志博<sup>3</sup>

(1. 辽宁医学院, 辽宁 锦州 121000; 2. 辽宁医学院附属第一医院泌尿外科, 辽宁 锦州 121000;  
3. 吉林大学附属第三医院, 长春 130000)

**[摘要]** **目的:**研究芦根提取液对雄性大鼠肾草酸钙结石形成的影响。**方法:**将 40 只雄性 SD 大鼠随即分为 5 组, 正常对照组(A)、模型组(B)、干预组(C,D,E), 每组 8 只。采用 1% 乙二醇(EG)和 1% 氯化铵(AC)2 mL ig 诱导大鼠肾草酸钙结石模型, 每天 1 次, 持续 4 周。造模同时 C~E 组每天分别给予剂量为 1.0, 1.5, 2.0 g·kg<sup>-1</sup> 的芦根提取物 10 mL·kg<sup>-1</sup> ig。4 周后检测大鼠 24 h 尿草酸(Ox), 钙(Ca<sup>2+</sup>)浓度; 血清尿素氮(BUN), 肌酐(Cr), Ca<sup>2+</sup>, P 含量; 肾组织超氧化物歧化酶(SOD)的活性, 丙二醛(MDA)含量; 观察大鼠肾组织病理学改变和草酸钙结晶沉积情况; 免疫组化检测大鼠肾组织骨桥蛋白(OPN)的表达水平。**结果:**模型组大鼠 24 h Ox, Ca<sup>2+</sup> 浓度, 血清 Cr 较正常对照组明显升高( $P < 0.05$ ), 干预组较模型组明显下降( $P < 0.05$ )。肾组织 SOD 的活力, 模型组较正常对照组显著降低( $P < 0.05$ ), 干预组较模型组明显升高( $P < 0.05$ )。MDA 含量, 模型组较正常对照组明显降低( $P < 0.05$ ), 干预组较模型组明显降低( $P < 0.05$ )。免疫组化 OPN 在各组肾组织中均有表达, 正常对照组中仅能检测到 OPN 的微弱表达, 但模型组 OPN 表达则明显增强; 干预组 OPN 表达强度低于模型组。**结论:**芦根提取液对雄性大鼠肾草酸钙结石的形成有抑制作用。

**[关键词]** 芦根; 草酸钙; 肾结石; 骨桥蛋白

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)11-0224-04

**[doi]** 10.11653/syfj2013110224

## Prevention of Extract from Rhizoma Phragmitis on Calcium Oxalate Stones in Male Rats

JIA Xi-dong<sup>1</sup>, ZHANG Chun-yang<sup>2\*</sup>, LIU Ying-guang<sup>1</sup>, ZHANG Bing<sup>3</sup>, ZHAO Zhi-bo<sup>3</sup>

(1. Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, China;

2. Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, China;

3. No. 3 Hospital Affiliated of Jilin Medical University, Changchun 130000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the influence of extract from Rhizoma Phragmitis on male rats renal calcium oxalate. **Method:** Forty male SD rats were randomly divided into five groups ( $n = 8$  each): control, model, and Rhizoma Phragmitis intervention groups. After 4 weeks, the 24 h urine concentration oxalate (Ox), Ca<sup>2+</sup>, the concentration of serum blood urea nitrogen (BUN), creatinine (Cr), Ca<sup>2+</sup>, P, and malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) of renal tissue were detected. The calcium oxalate deposit in the kidney was observed by microscopy. Immunohistochemistry were used to assess the protein expression of osteopontin (OPN) in rat renal tissue of every groups. **Result:** The 24 h urine concentration Ox, Ca<sup>2+</sup> and serum Cr of Rhizoma Phragmitis intervention group was lower than stone formation group obviously ( $P < 0.05$ ). rhizoma phragmitis intervention group the enzyme activity of SOD of renal tissue was higher than stone formation group ( $P < 0.05$ ). Stone formation group concentration of MDA of renal tissue was higher than Rhizoma

**[收稿日期]** 20121223(008)

**[基金项目]** 辽宁省教育厅基金(2010276)

**[第一作者]** 贾希栋, 在读硕士, 从事泌尿系结石研究, Tel:18841617358, E-mail: j13603699012@126.com

**[通讯作者]** \*张春阳, 教授, 主任医师, 从事泌尿外科及泌尿系结石研究, E-mail: 5469311@qq.com

Phragmitis intervention group ( $P < 0.05$ ). In normal control group, only a weak OPN protein staining was found. The expression was enhanced in the stone group. The extract from Rhizoma Phragmitis-treated rats tended to have lower OPN protein expression than the stone group. **Conclusion:** The extracts from rhizoma phragmitis can block the formation of renal calcium oxalate stone in rats potently.

[**Key words**] Rhizoma Phragmitis; calcium oxalate; renal calculus; osteopontin

肾结石对人体危害巨大,治疗方法多采用放射或手术干预,如体外冲击波碎石、输尿管镜等,但手术治疗具有价格昂贵、复发率高、肾损伤等缺点<sup>[1]</sup>。因此,研究草酸钙结石的预防就显得尤为重要。《中药学》指出:芦根其功效为清热泻火、止呕利尿、能溶解结石<sup>[2]</sup>。《中药大辞典》也指出:芦根,具有清热生津、利尿通淋之功效<sup>[3]</sup>。尿路结石形成的机制与肾小管上皮细胞受到氧化损伤、局部炎症反应有关,若能有效地提高肾小管上皮细胞对尿草酸毒性的耐受力,清除自由基对肾小管上皮细胞的损伤,则有可能预防肾草酸钙结石的生成<sup>[4]</sup>。现代研究发现芦根主要成分芦根多糖有较强的抗氧化作用<sup>[5]</sup>,本实验通过观察芦根提取液对草酸钙肾结石形成的影响,探讨其防治结石的内在机制。

## 1 材料

**1.1 动物** SD大鼠,雄性,由辽宁医学院科学实验动物中心提供,重180~220 g,鼠龄8~10周。动物许可证号SCXK(辽)2008-0007。

**1.2 药物** 生芦根购于锦州中药批发市场,产地河北。由辽宁医学院药学院教研室鉴定 Phragmitis Rhizoma。

**1.3 试剂** 冯库萨染色试剂盒购于上海美杰基因医药科技有限公司;超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒/丙二醛(MAD)试剂盒购于南京建成生物工程研究所;兔抗OPN的多克隆抗体及免疫组化SP试剂盒购于北京博奥森生物科技有限公司;乙二醇(分析纯AR)、氯化铵(分析纯AR)购于天津市天力化学试剂有限公司。

**1.4 仪器** AT261型电子天平(瑞士,Mettler公司),光学显微镜(日本,Olympus),CIAS-1000型细胞图像分析系统(北京大恒图像视觉有限公司),715型紫外线可见光光度计(上海分析仪器总厂),石蜡切片机(德国,莱卡),超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物技术股份有限公司),TGL-16G低温冷冻离心机(日本,日立公司),AU800全自动生化仪(日本,Olympus公司)。

## 2 方法

**2.1 芦根提取液的制备** 生芦根200 g,洗净,放

入2 000 mL大烧杯中,加2次水800 mL,煮沸60 min,过滤。滤渣加2次水600 mL,煮沸40 min,过滤。合并2次滤液浓缩成 $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,用高速离心机离心( $16\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ )10 min,取上清液。分别制备生药质量浓度 $0.15, 0.2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 冷藏备用。

**2.2 动物分组及给药** 大鼠在实验室饲养1周后,随机分成5组。A组(对照组);B组(模型组);C, D, E组(给药组)。除正常对照组(A组)大鼠每天上午ig蒸馏水2 mL外,其于4组大鼠每天上午ig 1%乙二醇(EG)和1%氯化铵(AC)配成的造石液,每只2 mL,每日1次,诱导大鼠草酸钙结石。C, D, E组大鼠每天下午分别以 $0.1, 0.15, 0.2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的芦根提取液剂量为 $1.0, 1.5, 2.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 10 mL·kg<sup>-1</sup> ig,每日1次;模型组每天下午等剂量的生理盐水ig 1次。实验持续28 d。

**2.3 观察指标及检测** 实验结束前1 d用代谢笼收集大鼠24 h尿液,测尿液草酸(Ox)、Ca<sup>2+</sup>浓度(过氧化氢-盐酸苯肼法)。次日用20%的乌拉坦( $0.7 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ )进行腹腔麻醉,下腔静脉取血,血液离心( $3\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ )10 min后,取上层血清测血肌酐(Cr),尿素氮(BUN), P, Ca<sup>2+</sup>含量。纵向剖开肾脏,左侧肾脏取材后用10%福尔马林固定,制石蜡切片,行HE及冯库(Von-Kossa's)染色、免疫组化法检测肾组织骨桥蛋白(OPN)。偏光显微镜观察肾脏的病理学改变及肾组织草酸钙结晶形态分布。取右肾皮质制成10%的匀浆,检测肾组织SOD活力和MDA含量。

**2.4 统计学分析** 采用SPSS 13.0统计软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对大鼠的一般情况影响** 实验中无大鼠死亡。模型组大鼠毛发枯黄、无光泽,精神倦怠,饮食差。芦根提取物高、中剂量组大鼠毛色白净有光泽,体形丰满,精神状况、饮食活动基本正常,芦根提取物低剂量组大鼠状态与模型组比较无明显改善。

**3.2 24 h尿草酸,尿钙及生化检查** 模型组24 h

尿 Ox 浓度、尿钙浓度、BUN 及血清 Cr 均显著升高 ( $P < 0.05$ )。干预组各组均可明显降低大鼠 24 h 尿 Ox 浓度、尿钙浓度及血清 Cr ( $P < 0.05$ )。模型组与

干预组比较,两组的血清 BUN 浓度差别无显著性意义;血 P,  $Ca^{2+}$  各组之间差异均无统计学意义。见表 1。

表 1 芦根提取液对大鼠 24 h 尿草酸、尿钙浓度及各组大鼠血清生化指标比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	24h 尿 Ox /mmol·L <sup>-1</sup>	24h 尿 Ca <sup>2+</sup> /mmol·L <sup>-1</sup>	BUN /mmol·L <sup>-1</sup>	Cr /μmol·L <sup>-1</sup>	Ca <sup>2+</sup> /mmol·L <sup>-1</sup>	P /mmol·L <sup>-1</sup>
对照	-	0.21 ± 0.03	1.40 ± 0.21	5.71 ± 0.82	51.84 ± 6.35	2.48 ± 0.07	2.45 ± 0.13
模型	-	0.60 ± 0.08 <sup>1)</sup>	3.08 ± 0.40 <sup>1)</sup>	11.24 ± 1.06 <sup>1)</sup>	73.35 ± 5.91 <sup>1)</sup>	2.51 ± 0.07	2.52 ± 0.14
芦根提取液	1.0	0.46 ± 0.05 <sup>1,2)</sup>	2.75 ± 0.23 <sup>1,2)</sup>	10.91 ± 0.98 <sup>1)</sup>	67.77 ± 4.43 <sup>1,2)</sup>	2.50 ± 0.05	2.52 ± 0.12
	1.5	0.38 ± 0.04 <sup>1,2)</sup>	2.41 ± 0.24 <sup>1,2)</sup>	10.34 ± 0.89 <sup>1)</sup>	64.28 ± 4.09 <sup>1,2)</sup>	2.49 ± 0.06	2.53 ± 0.12
	2.0	0.33 ± 0.03 <sup>1,2,3)</sup>	2.33 ± 0.17 <sup>1,2,3)</sup>	10.33 ± 0.76 <sup>1)</sup>	59.98 ± 4.18 <sup>1,2,3)</sup>	2.49 ± 0.05	2.57 ± 0.11

注:与对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ;与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ;与芦根提取液低剂量组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$  (表 2 同)。

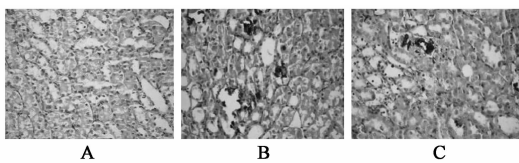
**3.3 血清 SOD 活力及 MDA 含量** 模型组 SOD 活性显著下降 ( $P < 0.05$ ),干预组各组 SOD 活性均明显增强,差异有显著统计学意义 ( $P < 0.05$ )。模型组 MDA 含量明显升高,干预组各组 MDA 含量均较模型组降低,差异有显著性统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 各组实验大鼠肾脏组织 SOD 活力,MDA 含量比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	SOD/U·mL <sup>-1</sup>	MDA/nmol·mL <sup>-1</sup>
对照	-	117.43 ± 6.41	5.12 ± 0.22
模型	-	44.25 ± 4.68 <sup>1)</sup>	6.16 ± 0.20 <sup>1)</sup>
芦根提取液	1.0	70.47 ± 4.53 <sup>1,2)</sup>	5.71 ± 0.24 <sup>1,2)</sup>
	1.5	79.85 ± 4.64 <sup>1,2,2)</sup>	5.44 ± 0.19 <sup>1,2)</sup>
	2.0	87.33 ± 4.22 <sup>1,2,3)</sup>	5.35 ± 0.17 <sup>1,2,3)</sup>

### 3.4 肾脏组织病理形态学变化及草酸钙结晶观察

石蜡切片 HE 及 Von-Kossa's 染色情况为草酸钙结晶经 Van-Kossa's 染色呈黑褐色。A 组肾小管未见明显扩张,染色后未见草酸钙晶体沉积;B 组镜下见肾小管管腔有明显的扩张,且多数管腔内存在弥漫散布黑褐色草酸钙晶体沉积;干预组 C 组肾小管管腔可见较少散在草酸钙结晶存在,管腔扩张程度较 B 组轻。见图 1。



A. 正常对照组;B. 模型组;C. 芦根提取液 2.0 g·kg<sup>-1</sup> 组 (图 2 同)

图 1 各组大鼠肾脏组织病理形态学改变 (HE, ×400)

**3.5 免疫组化肾脏组织 OPN 观察** OPN 蛋白在各组中均有表达,呈棕黄色。模型组可见棕黄色 OPN 表达明显增多,正常对照组中仅检测到 OPN 蛋白的微

弱表达。干预组 OPN 表达强度低于 B 组。见图 2。

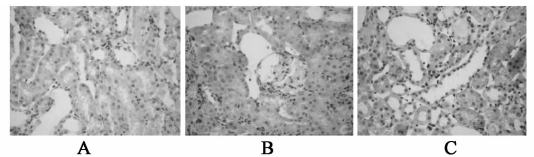


图 2 各组大鼠肾脏组织 OPN 表达

(免疫组化, ×400)

## 4 讨论

在本动物实验中,以 1% 乙二醇 + 1% 氯化铵配成造石液每天 ig,诱导大鼠草酸钙结晶形成<sup>[6]</sup>。取材时见 B 组大鼠肾脏较其他组大鼠肾脏明显肿胀;切片 HE 及 Van-Kossa's 染色后,镜下可见 B 组大鼠肾小管管腔内弥漫散布黑褐色草酸钙结晶,干预组草酸钙结晶较模型组少,肾小管官腔扩张较轻;B 组大鼠血清 BUN, Cr 浓度较正常组明显升高,提示肾脏功能受损;干预组血清 BUN, Cr 较 B 组明显降低,说明干预药物对肾脏功能有一定保护作用。干预组 24 小时尿草酸及尿钙明显减少,肾脏水肿较轻,草酸钙结晶减少,说明提取液能促使尿草酸及钙排出减少,抑制草酸钙结晶形成。

乙二醇经体内代谢形成草酸经肾脏排出,暴露于高浓度草酸 (Ox) 或 (CaOx) 晶体的肾脏上皮会产生活性氧族 (ROS),ROS 引起的氧化应激 (Os) 和肾脏上皮损伤与结石的形成有关联<sup>[7-8]</sup>。Grases<sup>[9]</sup> 等在体外通过模拟肾脏的条件,证明自由基可引起上皮细胞损伤,产生有利于晶体生长的环境,而抗氧化剂可抑制草酸钙结晶的形成。实验结果表明芦根干预组肾组织 SOD 活力明显高于诱石组,MDA 含量明显低于诱石组。因此可以证明芦根提取液可能通过清除氧自由基、抗氧化,来保护肾小管上皮细胞,从而减少草酸钙结晶的沉积。

OPN 也被称为尿桥蛋白(uropontin),是一种酸性糖蛋白,分子质量约为 44 kDa,富含精氨酸,天冬氨酸残基。尿液中的骨桥蛋白由肾上皮细胞合成,Wesson J A 等<sup>[10]</sup>用 OPN 基因缺陷大鼠做实验,发现予以乙二醇形成高草酸尿后,肾上皮细胞表面的草酸钙结晶沉淀明显增加,因此认为 OPN 对结晶黏附起着抑制作用。本实验通过芦根提取液对干预组大鼠干预 4 周,免疫组化发现干预组 OPN 较模型组表达减弱。提示芦根提取液可能通过抑制 OPN 蛋白的表达来防止草酸钙结晶的形成。

综上,芦根提取液可以一定程度的预防草酸钙结石。推测其作用机制可能与增加尿草酸及钙的排除,增强细胞抗氧化能力,减少自由基生成,抑制脂质过氧化反应,保护肾小管细胞,并且抑制肾脏 OPN 蛋白的表达有关。

#### [参考文献]

[1] 施国海,张士青.草酸钙结石预防的研究[J].医学综述,2004,10(9):556.  
[2] 成都中医学院.中药学[M].上海:上海科技出版社,1978:59.  
[3] 郭国华.临床中药词典[M].2版.长沙:湖南科技出版社,2008:281.

[4] 国家中医药管理局.中华本草[M].下册.上海:上海科学技术出版社,1998:2159.  
[5] 沈蔚,任晓婷,张建.芦根多糖的提取及其抗氧化活性的研究[J].时珍国医国药,2010,21(5):1078.  
[6] 曾正国,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.  
[7] Hunag H S, Ma Mc, Chen C F, et al. Lipidperoxidation and its correlations with urinary levels of oxalate, citric acid, and osteopontin in patients with renal calciumoxlate stones[J]. Urology, 2003, 61:1123.  
[8] Tungsanga K, Sriboonlue P, Futrakul P, et al. Renal tubular cell damage and oxidative stress in renal stone patients and the effect of potassium citrate treatment [J]. Urol Res, 2005, 33:656.  
[9] Grases F, Garcia-Ferragut L, Costa-Bauza A. Development of calcium oxalate crystals on urothelium effect of free radical[J]. Nephron, 1998, 78(3):296.  
[10] Wesson J A, Johnson R J, Mazzali M, et al. Osteopontin is a critical inhibitor of calcium oxalate crystal formation and retention in renal tubules[J]. J Am Soc Nephrol, 2003, 14(1):39.

[责任编辑 聂淑琴]

## 《中国中药杂志》2013 年征订启事

《中国中药杂志》系中国科协主管,中国药学会主办,中国中医科学院中药研究所承办的综合性中药学术期刊。创刊于 1955 年 7 月,是创刊最早、发行量最大的中药学术刊物。《中国中药杂志》全面反映我国中医科研最高学术水平,主要报道该领域新成果、新技术、新方法与新思路,内容包括栽培、资源与鉴定、炮制、药剂、化学、药理、不良反应、临床等。设有专论、综述、研究论文、研究报告、临床、学术探讨、药事管理、经验交流、信息等栏目。主要读者对象为医药领域各级管理部门、研究所、大专院校、企业以及医院等从事医药科研、管理、生产、医院制剂及临床研究等方面的专业人员。

《中国中药杂志》现为半月刊,128 页,2013 年定价每期 30 元,全年 24 期定价为 720 元。国内刊号 11-2272/R,国际刊号 1101-5302。

本刊现已全面实现网络编辑办公,如欲投稿或联系本刊、获取本刊各种信息动态请登录中国中药杂志网站 [www.cjcm.com.cn](http://www.cjcm.com.cn) 或 [www.中国中药杂志.com](http://www.中国中药杂志.com)。

联系电话:稿件查询 010-64045830 转 602;主任电话 010-64058556;资源与栽培栏编辑:010-64048925;制剂剂编辑:010-64040392;化学栏编辑:010-64040113;药理栏编辑:010-84022522;临床栏编辑:010-64059766;电子杂志制作发行及网上维护:010-64030625。