

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2021.06.04

❖ 基础研究 ❖

滋肾排石汤对结石大鼠尿液 pH 值、钙和草酸水平的影响

马志强, 左岩, 张翼

(石家庄市第三医院泌尿外科, 河北 石家庄 050000)

【摘要】目的: 分析探讨滋肾排石汤对结石大鼠尿液 pH 值、钙水平和草酸水平的影响。**方法:** 72 只 SD 大鼠随机分为滋肾排石汤组、结石组与对照组, 每组各 24 只。对照组大鼠标准饮食, 自由饮水; 其余两组标准饮食, 1% 乙二醇自由饮水, 每日清晨采用 2% 氯化铵灌胃, 每只 2 mL, 连续实施 4 周。滋肾排石汤组给药剂量 5.4 g/kg, 每 100 g 灌胃 2 mL, 连续实施 4 周。对比各组间大鼠双肾成石程度、尿 pH、尿钙与尿草酸水平, 氧化应激指标超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)含量, 炎症相关蛋白转化生长因子- β (TGF- β)和骨桥蛋白(OPN)阳性率。**结果:** Pearson χ^2 检验结果显示, 双肾成石率由高到低依次为结石组 > 滋肾排石汤组 > 对照组 ($P < 0.01$)。Mann-Whitney U 检验结果显示: 各组间尿 pH 比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 滋肾排石汤组尿钙与尿草酸水平均低于结石组 ($P < 0.05$)。与结石组相比, 滋肾排石汤组大鼠肾脏组织中 MDA 含量、TGF- β 和 OPN 阳性率显著降低 ($P < 0.05$), SOD 含量显著升高 ($P < 0.05$)。**结论:** 滋肾排石汤可能通过改善氧化应激和炎症反应以降低尿钙与低尿酸含量及双肾的成石率。

【关键词】 滋肾排石汤; 大鼠; 草酸钙结石; 氧化应激; 炎症反应

【中图分类号】 R256.5; R692.4 **【文献标志码】** A

Effect of Zishen Paishi Decoction on urine pH value, calcium level and oxalic acid level in rats with calculi

MA Zhi-qiang, ZUO Yan, ZHANG Yi

(Department of Urology Surgery, Shijiazhuang Third Hospital, Shijiazhuang 050000, Hebei, China)

【Abstract】Objective: To analyze the effect of Zishen Paishi Decoction on urine pH value, calcium level and oxalic acid level in rats with calculi. **Methods:** 72 SD rats were randomly divided into Zishen Paishi decoction group, stone group and control group, 24 cases in each group. Rats in the control group were fed standard diet and drank freely, the other two groups were given standard diet, 1% glycol free drinking water, 2% ammonium chloride per morning, 2 mL for each, for 4 weeks. Dose 5.4 g/kg, for Zishen Paishi Decoction Per 100 g 2 mL, of gavage continuous implementation for 4 weeks. Comparison of renal lithogenesis, urinary pH, urinary calcium and urinary oxalic acid in rats, Oxidative stress indicator superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) content, positive rates of inflammatory-associated protein transforming growth factor- β (TGF- β) and osteopontin (OPN) were observed. **Results:** Pearson χ^2 test results showed that the rate of double kidney stone formation from high to low was in stone group > Zishen Paishi Tang group > control group ($P < 0.01$). The results of Mann-Whitney U test showed that there was no significant difference in urine pH between the groups ($P > 0.05$). The levels of urine calcium and urinary oxalic acid in Zishen Paishi decoction group were significantly lower than those in stone group ($P > 0.05$). Compared to the stone group, the positive rate of MDA content, TGF- β and OPN in kidney tissue of Zishen Paishi Tang group decreased significantly ($P < 0.05$), the SOD content increased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion:** Zishen Paishi Decoction can significantly reduce the content of calcium and hypuria oxalic acid in both kidneys to reduce the rate of stone formation, may be related to its improvement of oxidative stress and inflammatory response.

【Key words】 Zishen Paishi Tang; Rats; Calcium Oxalate Stone; Oxidative Stress; Inflammatory Response

近年来,伴随着人群饮食结构的改变,结石病的发生率显著上升^[1]。2010 年发展中国家的结石复发率约 50%,而 2015 年结石复发率达 75%左右^[2]。泌尿系结石中草酸钙结石是最常见的成分,其形成

可能与肾小管上皮细胞的损伤有关,肾小管上皮在某些因素的作用下发生损伤,使结石成分更易于附着,而坏死的细胞进入肾小管管腔有助于晶体异相成核^[3-4]。从中医角度来讲,泌尿系结石属“石

基金项目: 河北省卫生和计划生育委员会科研基金项目(20170992)

作者简介: 马志强(1973-),男,硕士,副主任医师。E-mail:3129576883@qq.com

淋”、“血淋”、“砂淋”、“尿血”、“腰痛”范畴,其治疗方法为清热祛湿、行气活血以及排石通淋^[5-6]。本研究总结既往临床经验,提出了通过三焦预防草酸钙结石的形成及复发,通过建立大鼠肾草酸钙结石模型,采用消食汤进行灌胃治疗,探讨滋肾排石汤对结石大鼠尿液 pH 值、钙和草酸水平的影响,并分析其可能发生机制。

1 材料与方法

1.1 材料

选取 SD 大鼠 72 只,8~10 周龄,体质量为 200~240 g,雄性,购自北京维通利华实验动物有限公司,动物许可证号:SCXK(京)2017-0001。

1.2 实验方法

72 只 SD 大鼠随机分为滋肾排石汤组、结石组与对照组,每组各 24 只。滋肾排石汤组方:焦山栀 10 g、赤茯苓 20 g、元胡 20 g、鸡内金 20 g、白芍 20 g、瞿麦 20 g、赤小豆 20 g、旱莲草 20 g、覆盆子 10 g、生甘草 10 g。大鼠肾草酸钙结石造模方法参照相关文献^[7-8]严格实施;对照组大鼠予以标准饮食,自由饮水;其余两组标准饮食,1% 乙二醇自由饮水,每日清晨采用 2% 氯化铵灌胃,每只 2 mL,连续实施 4 周。给药剂量参考《药理学实验方法学》^[9]:成年人体质量按照 60 kg 计算,成年人滋肾排石汤日用量为生药 60 g,大鼠系数 0.018/200 g^[10-11],因而滋肾排石汤组 = 60 × 0.018/200 = 5.4 g/kg。按照以上剂量于每日下午进行灌胃,每 100 g 灌胃 2 mL,连续实施 4 周,同时结石组大鼠灌胃等量的生理盐水。

1.3 观察指标

1.3.1 尿液 pH、尿钙、尿草酸水平测定 于实验 4 周末次给药完成后,利用代谢笼采集大鼠 24 h 尿液,检测尿液 pH 值,测定完成后以 3 000 rpm 速度离心 5 min,离心,取上清液,于 -80 °C 条件下冻存待检。尿钙含量与草酸浓度分别采用全自动生化分析仪及离子色谱仪测定。

1.3.2 肾组织草酸钙晶体形成情况 之后称大鼠体重,将大鼠以 3 mL/kg 的剂量用 10% 水合氯醛麻醉,取肾组织,称重。各组中随机取 12 只进行苏木精-伊红染色 (hematoxylin-eosin staining, HE 染色),石蜡切片,放大 100 倍观察肾组织中草酸钙晶体形成情况。肾组织中草酸钙晶体分级标准^[12-14]:(1) 0 级:未发现结晶亮点;(2) I 级:存在许多细小结晶亮点,但未成堆;(3) II 级:存在粗大、成堆的结晶,但未互相连接;(4) III 级:成堆的结晶局部互相连接;(5) IV 级:许多成堆的结晶并连接成片。

1.3.3 肾组织 SOD、MDA 测定 各组剩余 12 只左

肾制成 10% 匀浆,在 4 °C 下以 5 000 rpm 离心 10 min,取上清液,采用酶联免疫吸附剂测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 法严格按照试剂盒说明书测定超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性及丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量。

1.3.4 肾组织 TGF- β 、OPN 测定 各组剩余 12 只右肾组织切片,采用免疫组织化学法进行炎症相关蛋白转化生长因子- β (TGF- β) 和骨桥蛋白 (OPN) 的测定。

1.4 统计学分析

采用 SPSS17.0 软件进行统计分析。计量数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用 Mann-Whitney U 检验;计数资料以 [n(%)] 表示,组间比较采用 Pearson χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组间双肾成石程度对比

Pearson χ^2 检验结果显示,各组间双肾成石率比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);双肾成石率由高到低依次为结石组 (100.00%) > 滋肾排石汤组 (29.17%) > 对照组 (0.00%) ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组间双肾成石程度对比 [n(%)]

组别	0 级	I 级	II 级	III 级	IV 级	成石率
滋肾排石汤组 (n=24)	17(70.83)	5(20.83)	2(8.34)	0(0.00)	0(0.00)	29.17*
结石组 (n=24)	0(0.00)	4(16.67)	7(29.17)	9(37.50)	4(16.67)	100.00#
对照组 (n=24)	24(100.00)	0	0	0	0	0*#
Z 值						32.064
P 值						<0.001

* $P < 0.05$,与结石组相比;# $P < 0.05$,与滋肾排石汤组相比。

2.2 各组大鼠尿 pH 的比较

Mann-Whitney U 检验结果显示:各组大鼠的尿 pH 比较,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$);该结果提示滋肾排石汤疗效可能与尿 pH 无明显相关关系。见表 2。

表 2 各组大鼠之间尿 pH、尿钙与尿草酸水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	尿 pH
滋肾排石汤组 (n=12)	6.1 ± 0.4
结石组 (n=12)	6.1 ± 0.5
对照组 (n=12)	6.2 ± 0.5
F 值	1.048
P 值	0.253

2.3 各组大鼠尿钙与尿草酸水平比较

Mann-Whitney U 检验结果显示,滋肾排石汤组

尿钙与尿草酸水平均低于结石组 ($P < 0.05$); 滋肾排石汤组尿钙及尿草酸水平与对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表3。

表3 各组大鼠尿钙与尿草酸水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	尿钙 (mmol/L)	尿草酸 (mg/L)
滋肾排石汤组 ($n = 12$)	1.3 ± 0.4 *	826.9 ± 25.1 *
结石组 ($n = 12$)	1.9 ± 0.1 #	2 587.1 ± 30.5 #
对照组 ($n = 12$)	1.2 ± 0.4 *	2 084.5 ± 80.7 **
F 值	12.635	15.003
P 值	<0.001	<0.001

* $P < 0.05$, 与结石组相比; # $P < 0.05$, 与滋肾排石汤组相比。

2.4 各组大鼠肾脏组织中 SOD 及 MDA 含量比较

与对照组相比, 结石组大鼠肾脏组织中 MDA 含量显著增加 ($P < 0.05$), SOD 含量显著降低 ($P < 0.05$); 与结石组相比, 滋肾排石汤组大鼠肾脏组织中 MDA 含量显著降低 ($P < 0.05$), SOD 含量显著升高 ($P < 0.05$)。见表4。

表4 各组大鼠肾脏组织中 SOD 及 MDA 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	MDA (nmol/mL)	SOD (U/g)
对照组 ($n = 12$)	12.5 ± 3.9	14.9 ± 2.7
结石组 ($n = 12$)	18.5 ± 3.7 *	11.3 ± 3.2 *
滋肾排石汤组 ($n = 12$)	14.8 ± 4.3 **	13.4 ± 4.2 **
F 值	8.804	6.825
P 值	<0.001	<0.001

* $P < 0.05$, 与对照组相比; # $P < 0.05$, 与结石组相比。

2.5 各组大鼠肾脏组织中 TGF-β 和 OPN 比较

与对照组相比, 结石组大鼠肾脏组织中 TGF-β 和 OPN 阳性率显著增加 ($P < 0.05$); 与结石组相比, 滋肾排石汤组大鼠肾脏组织中 TGF-β 和 OPN 阳性率显著降低 ($P < 0.05$)。见表5。

表5 各组大鼠肾脏组织中 TGF-β 和 OPN 比较 [$n(\%)$]

组别	TGF-β 阳性	OPN 阳性
滋肾排石汤组 ($n = 12$)	7(58.33)	6(50.00)
结石组 ($n = 12$)	12(100.00)	12(100.00)
对照组 ($n = 12$)	1(8.33)	2(16.67)
Z 值	8.735	8.046
P 值	<0.001	<0.001

3 讨论

近年来, 随着饮食习惯、生活方式的转变, 泌尿系结石的发病率呈现明显上升的趋势^[15]。本研究建立了大鼠肾草酸钙结石模型, 并采用消食汤进行灌胃治疗结果显示, 各组间双肾成石率差异有统计

学意义; 双肾成石率由高到低依次为结石组 > 滋肾排石汤组 > 对照组; 该结果提示滋肾排石汤对大鼠肾草酸钙结石具有一定的防治作用。多年临床实践证明, 滋肾排石汤能有效降低患者尿中草酸含量, 预防结石生成和复发^[16-17], 与本研究结果基本一致。

草酸钙结石形成及复发的主要责之于脾, 并可累及肾与心, 其治疗的关键为通利三焦^[18]。多数草酸钙结石患者伴有脾阳、脾气不足, 有些患者心火过盛下移膀胱与小肠, 引发膀胱湿热, 对小肠的分清泌浊功能产生不良影响。滋肾排石汤组方组方之中焦山栀为君药, 味苦性寒, 具有清热利湿、泻火除烦的作用, 能入肺、心、三焦经^[19]; 赤茯苓能泄心、小肠及膀胱湿热、利窍行水之效; 赤小豆具有行血补血、利水消肿、健脾去湿之效, 可泻心经之火; 覆盆子具有温肾、浓缩尿液的功效, 鸡内金化石溶石; 多药合用可有效降低尿草酸含量, 滋肾排石。

本研究对各组大鼠之间尿 pH、尿钙与尿草酸水平进行对比分析。滋肾排石汤疗效与尿 pH 无明显相关关系。而尿钙与尿草酸水平高是诱发泌尿系草酸钙结石的主要因素。尿钙水平高易引发草酸钙的过饱和进而导致泌尿系结石形成^[19]。本研究显示, 滋肾排石汤组尿钙水平低于结石组, 且与对照组比较差异无统计学意义, 提示滋肾排石汤组可降低尿钙水平。尿草酸水平较高对肾细胞有明显的毒副作用, 当肾上皮细胞暴露于草酸中时, 会影响肾上皮细胞的活性, 较高的草酸水平还会导致细胞线粒体功能发生变化, 导致上皮细胞坏死, 促进结晶的黏附、核化以及生长^[20]。本研究显示滋肾排石汤组尿草酸水平均低于结石组, 提示滋肾排石汤组能有效降低患者尿中草酸含量。本研究还显示, 与对照组相比, 结石组大鼠肾脏组织中 MDA 含量显著增加, SOD 含量显著降低, TGF-β 和 OPN 阳性率显著增加; 与结石组相比, 滋肾排石汤组大鼠肾脏组织中 MDA 含量显著降低, SOD 含量显著升高, TGF-β 和 OPN 阳性率显著降低。该结果提示氧化应激和炎症反应可能在草酸钙结石的形成中具有重要作用, 滋肾排石汤组双肾成石率、尿钙与尿草酸水平均较低, 而其氧化应激和炎症反应也较轻, 提示滋肾排石汤组可能通过改善氧化应激和炎症反应发挥保护肾功能的作用。

综上所述, 滋肾排石汤可能通过改善氧化应激和炎症反应以显著降低尿钙与尿草酸的含量及双肾的成石率。

参考文献

[1] 刘英, 王志勇, 杨德慧, 等. 枸橼酸钾对大鼠肾草酸钙结石形成

- 的影响[J]. 中国老年学杂志,2018,38(17):4230-4232.
- [2] Doizi S, Rodgers K, Poindexter J, *et al.* Assessment of urinary inhibitor or promoter activity in uric acid nephrolithiasis[J]. *Journal of Urology*,2016,195(6):1799-1804.
- [3] 芦长廷,卢子杰,胡向农,等. 防石汤对大鼠肾草酸钙结石防治效果的实验研究[J]. 河北中医药学报,2018,33(3):7-10.
- [4] Unno R, Taguchi K, Okada A, *et al.* Potassium-sodium citrate prevents the development of renal microcalculi into symptomatic stone-forming patients[J]. *International Journal of Urology*,2017,24(1):75-81.
- [5] Chew BH, Brotherhood HL, Sur RL, *et al.* Natural history, complications and re-intervention rates of asymptomatic residual stone fragments after ureteroscopy: a report from the EDGE Research Consortium[J]. *The Journal of urology*,2016,195(4 Part 1):982-986.
- [6] Bompreszi R. Dimethyl fumarate in the treatment of relapsing - remitting multiple sclerosis: an overview[J]. *Therapeutic advances in neurological disorders*,2015,8(1):20-30.
- [7] 张晓容,黄雨佳,韩爽,等. 大鼠肾草酸钙结石模型制备效果的比较研究[J]. 国际泌尿系统杂志,2017,37(3):374-377.
- [8] 魏伟,吴希美,李元建. 药理实验方法学[M]. 第4版. 北京:人民卫生出版社,2010,1698.
- [9] 张雍偲,刘春. N-乙酰半胱氨酸抑制大鼠肾草酸钙结石形成机制的研究[J]. 临床泌尿外科杂志,2013,28(3):222-225.
- [10] 刘海华,张亚强,李永岚. 消微防石汤对大鼠肾脏草酸钙微结石防治作用及机制的实验研究[J]. 环球中医药,2014,7(4):266-271.
- [11] Zeng G, Wan S, Zhao Z, *et al.* Super-mini percutaneous nephrolithotomy (SMP): a new concept in technique and instrumentation [J]. *BJU International*,2016,117(4):655-661.
- [12] Tiselius HG. A hypothesis of calcium stone formation: an interpretation of stone research during the past decades[J]. *Urological Research*,2011,39(4):231-243.
- [13] Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, *et al.* Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome[J]. *The Journal of clinical investigation*,2017,114(12):1752-1761.
- [14] Nieuwkamp DJ, Murk JL, Cremers CHP, *et al.* PML in a patient without severe lymphocytopenia receiving dimethyl fumarate[J]. *New England Journal of Medicine*,2015,372(15):1474-1476.
- [15] 刘旸,段小鹿,麦新,等. 陈醋对大鼠肾脏草酸钙结石形成的影响及作用机制研究[J]. 中华泌尿外科杂志,2016,37(4):304-307.
- [16] Balasar M, Piskin MM, Topcu C, *et al.* Urinary kidney injury molecule-1 levels in renal stone patients[J]. *World Journal of Urology*,2016,34(9):1311-1316.
- [17] Marien TP, Miller NL. Characteristics of renal papillae in kidney stone formers[J]. *Minerva Urologica e Nefrologica*,2016,68(6):496-515.
- [18] Asmat U, Abad K, Ismail K. Diabetes mellitus and oxidative stress: a concise review[J]. *Saudi Pharmaceutical Journal*,2016,24(5):547-553.
- [19] Poprac P, Jomova K, Simunkova M, *et al.* Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases[J]. *Trends in pharmacological sciences*,2017,38(7):592-607.
- [20] Krieger NS, Asplin JR, Frick KK, *et al.* Effect of potassium citrate on calcium phosphate stones in a model of hypercalciuria[J]. *Journal of American Society of Nephrology*,2015,26(12):3001-3008.

(收稿日期:2020-06-12

修回日期:2021-03-07)