

中國醫藥大學中國醫學研究所碩士論文

編號：GICMS-333

指導教授：陳汶吉 教授

論文題目

豬苓湯對於實驗誘發大鼠腎臟草酸鈣結石的預防作用

Prophylaxis of Calcium Oxalate Stones by Zhulingtang on
Experimentally induced Nephrolithiasis in Rats

研究生：潘天健

中華民國九十七年七月

目 錄

第一章 前言

第一節 泌尿道結石的流行病學.....	1
第二節 泌尿道結石的臨床症狀.....	2
第三節 淋證.....	3
第四節 研究動機.....	6

第二章 文獻探討

第一節 泌尿道結石的形成原因.....	8
第二節 泌尿道結石的促進和抑制因子.....	10
第三節 泌尿道結石的種類及組成成分.....	11
第四節 泌尿道結石的手術治療和內科治療.....	12
第五節 草藥治療及預防泌尿道結石的文獻回顧.....	14
第六節 豬苓湯的歷史源流.....	16
第七節 文獻探討小結.....	18

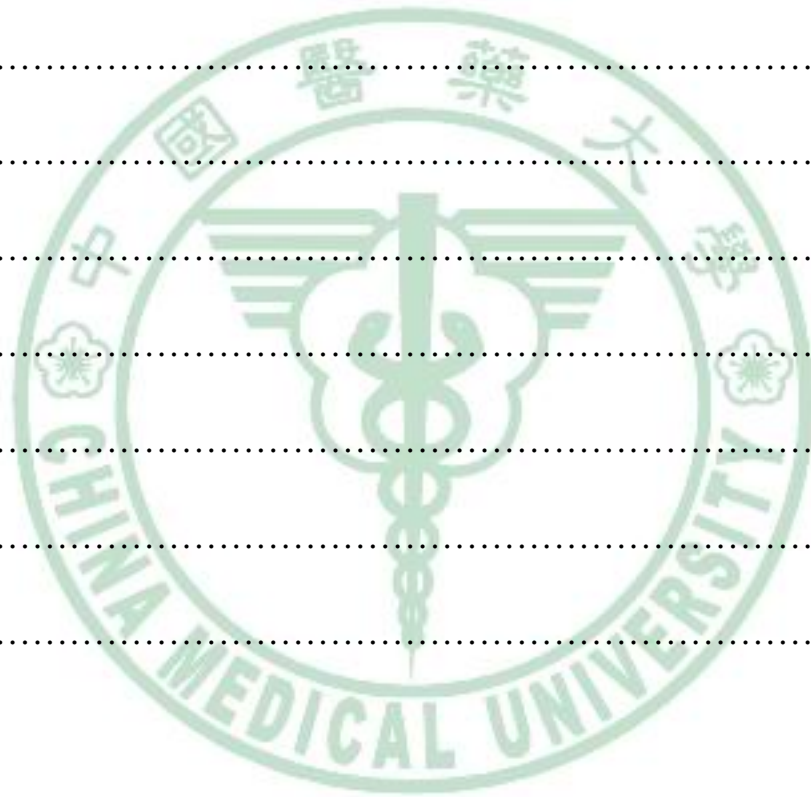
第三章 材料與方法

第一節 概述.....	20
第二節 儀器設備.....	20
第三節 實驗試劑.....	20

第四節 製備豬苓湯萃取液的實驗方法.....	20
第五節 動物實驗的步驟.....	22
第六節 尿液和血清的分析.....	23
第七節 評估腎臟結晶沉積的嚴重度.....	24
第八節 資料分析.....	27
第四章 結果.....	28
第五章 討論	
第一節 豬苓湯對於大鼠草酸鈣結石模型的抑制作用.....	36
第二節、實驗的限制.....	38
第三節 結論.....	39
參考文獻.....	40
英文摘要.....	47
謝辭.....	48

圖目錄

圖3.1.....	21
圖3.2.....	22
圖3.3.....	23
圖3.4.....	24
圖3.5.....	25
圖3.6.....	25
圖3.7.....	26
圖4.1.....	29
圖4.2.....	29
圖4.3.....	30
圖5.1.....	37



表目錄

表4.1.....	31
表4.2.....	32
表4.3.....	33
表4.4.....	34
表4.5.....	35



豬苓湯對於實驗誘發大鼠腎臟草酸鈣結石的預防作用

研究生：潘天健

指導教授：陳汶吉

中國醫藥大學中國醫學研究所

一個傳統中醫藥的方劑豬苓湯，在用乙二醇餵養誘發大鼠腎臟草酸鈣結石的實驗中被用來評估抗結石的影響。共有三十五隻雄性 Sprague-Dawley 大鼠隨機分為四組：正常、安慰劑、低劑量豬苓湯和高劑量豬苓湯組。和安慰劑組相比，這兩組豬苓湯餵食的組別，在晶體沉積的嚴重度上均明顯減少。和大鼠的對照組比較，在低劑量豬苓湯和安慰劑組發現血清磷顯著降低。大鼠安慰劑組中發現到的以體重增加較為緩慢來表現的生長遲緩。我們得到的結論是，豬苓湯可以減低草酸鈣結晶的嚴重度和避免體重增加較為緩慢的效果。因此，傳統中醫方劑豬苓湯可能是一種有效預防腎臟結石的藥物。雖然，我們對豬苓湯抑制結晶的機制仍不清楚，推測其中大分子可能也有參與。因此，未來希望可以一方面進行臨床實驗，證實豬苓湯應用在人體上一樣有預防腎臟結石的作用；另一方面我們可以進行蛋白質體學的研究，以期能對結石的病理生理機制有更透徹的瞭解。

關鍵詞：草酸鈣、乙二醇、傳統中醫藥、豬苓湯

第一章、前言

第一節、泌尿道結石的流行病學

泌尿道結石在整個人類歷史已經成為一個常見的問題，它困擾人類已經有長遠的歷史，因為考古學家曾在七千年前(4800 B.C.)的古埃及木乃伊身上發現腎臟結石與膀胱結石。直到現在它的盛行率一直有逐漸增加的趨勢，並沒有因為醫學的進步而有所減少¹。

泌尿道結石是一種多因子的疾病，它的盛行率(prevalence)和發生率(incidence)會隨著性別、年齡、種族、飲食習慣、氣候和區域環境而有所差異。在亞洲，終身發生率(lifetime incidence)為2-5%；在歐洲和北美為8-15%；在沙烏地阿拉伯為20%。在美國的泌尿道結石的盛行率可以發現有區域性的差異，位於東南方的州盛行率為最高。另外，男性較女性容易罹患；白種人較黑人容易罹患泌尿道結石；有泌尿道結石家族史者，患病機率也較一般人高；經濟愈發展的國家，其人民罹患率愈高²。好發於三十歲至五十歲之間的年齡層，夏季發生率較高。此外，生活型態與職業也有影響，一般沒有適度運動、坐辦公桌者較易得到此病。

泌尿道結石是一個常見的疾病。在世界各國和各地區中，有許多是屬於高發生率的地區，包括有地中海周邊的國家、巴基斯坦、印度、英國、中歐、北歐、澳大利亞等³。在台灣，則9.6%的盛行率，在男性為14.5%，在女性則為4.3%；在美國一年有一百萬人次罹患泌尿道結石的疾病，約有8%至15%的盛行率⁴。如果沒有積極的預防和治療，其第一年的復發率為14%，五年的復發率為35%，十年的復發率為52%⁵，二十五年的復發率則為98%⁶。

有研究指出中，上泌尿道結石的病人，男女的比例為2.32:1。男性在30至39歲和60至69歲這兩個階段時期，較容易罹患上泌尿道結石。女性則在50至59歲較容易罹患上泌尿道結石。另外在20歲以下或70歲以上的病患只有佔少部分。以結石成分來分析，在男性方面，草酸鈣與磷酸鈣混合型佔66%，其次是草酸鈣結石佔22%，再者是磷灰石佔5%，磷酸氫鎂佔3%，尿酸佔3%。在女性方面，草酸鈣與磷酸鈣混合型佔58%，

其次是磷灰石佔13%，再者是草酸鈣佔12%，磷酸氫鎂佔11%，尿酸佔4%。再以性別來做比較，在女性方面，則容易罹患感染性結石（包括磷灰石與磷酸氫鎂結石），男女比例為1:1.4。在男性方面，容易罹患草酸鈣結石、草酸鈣與磷酸鈣混合型結石和尿酸結石，男女的比例分別為4.2:1，2.6:1和1.5:1⁷。在台灣南部地區居民中，以司機、耗費體力的勞工、外務員、商人、公務員與坐辦公桌之職員較易罹患泌尿道結石⁸。

由於泌尿道結石有高發生率和高復發率，為了治療此疾病，許多國家都需要花費大量的醫療費用，對於經濟產生一定的影響。在美國，每年需要花費18.3億美元來治療泌尿道結石⁹。在英國，每年需要花費11.13億英鎊¹⁰。在德國，每年需要花費5.4億歐元¹¹。因此為了節省龐大的醫療費用，我們需要開發有效的預防結石藥物。

第二節、泌尿道結石的臨床症狀

泌尿道結石是泌尿系統疾病中常見的疾病之一，它是指在泌尿系統內有結石的存在，包括腎臟、輸尿管、膀胱、尿道等位置。這些結石是由尿液中難於溶解的物質結晶沉澱而成的，如草酸鈣、磷酸鈣、磷酸銨鎂、尿酸等。

如果結石阻塞在尿路系統內，就會引起病人有急性腎絞痛(renal colic)的症狀，疼痛的嚴重程度和疼痛的部位，依結石的大小、結石阻塞的部位、阻塞的程度、個人差異有所不同，最常見的位置有腎盂輸尿管交接處、輸尿管橫越腸骨動脈處和輸尿管膀胱交接處。若結石阻塞在腎盞處，則疼痛部位會在腰脅部或背部的地方，感覺是一種深部的鈍痛(dull pain)；若結石阻塞在腎盂輸尿管交接處或上端輸尿管，絞痛會發生在肋骨脊椎交角(costovertebral angle)處，絞痛常會放射至腰脅部或同側腹部，甚至向下腹部延伸，引起生殖器的疼痛，男性會有睪丸疼痛，女性則有外陰疼痛的症狀；若結石阻塞在輸尿管中段處，除了上述的疼痛模式，下腹部的疼痛會比較明顯；若是輸尿管下段被堵塞，亦會出現上述的疼痛模式，但痛在恥骨上的地方和生殖器則會比較明顯，當結石下降至膀胱時，並合併有尿急、頻尿、小便灼熱感的症狀。疼痛大都為陣發

性的，但也可呈現為持續的疼痛。有些病人在肉眼可發現血尿或茶色尿，大部分病人在顯微鏡下可發現血尿的現象。另外病人伴隨有臉色蒼白、噁心、嘔吐、冒冷汗、腹部不適、腹瀉，偶而會有發燒的現象，甚至在嚴重的感染病例中，會出現敗血性休克症狀的表現。

腎臟結石有可能長時間存在體內，而病人沒有表現出症狀或是症狀輕微，尤其是體積大的結石。所以上述的症狀，臨床上只會發生於大約一半的病人中，另外的一半的病人症狀並不是很明顯。泌尿道結石應該即早發現即早治療，因為結石會傷害腎臟的功能，產生阻塞性腎病變，導致腎臟積水，而且容易發生感染，甚至發展到腎衰竭，最後需要透析的治療。

但是，大部分的輸尿管結石會自然隨尿液排出，是不須要介入處理的。4~5 mm 的結石有 40%~50% 的機率可以自然排出。若大於 6 mm 以上的結石自然排出的機率只有 5%。位在下段輸尿管的結石，有 50% 的機率可以自然排出，在中段和上段輸尿管的結石，則各有 25% 和 10% 的排出機率¹²。另外，在 Campbell's Urology 中提到，結石依大小其自行排出率，分別為小於 4 mm 為 80%，4 至 6 mm 為 59%，大於 6 mm 是 21%。依位置則分別是近端 22%，中段 46% 及遠端是 71%。從文獻上來看：結石小於 5 mm 時，近端的自行排出率從 71% 到 98%，而遠端則是 29% 至 98%¹³。

第三節 淋證¹³

中國醫學中所謂的「淋證」相當於西醫學中的泌尿道感染、泌尿道結石、泌尿道腫瘤、乳糜尿等範疇。歷代醫家對於淋證的論述、分類以及治療，常有不同見解，但也豐富完整了中醫對於淋證的理論體系和治療方法。這些知識是我們臨床面對淋證時，相當重要的基礎，也能對於科學研究的工作帶來莫大的啟發。所以在開始泌尿道結石的研究前，必須先認識淋證的歷史源流。

(1) 漢代以前：

淋之名稱，首先見於《內經》，《素問·六元正紀大論》稱為「淋閼」。即《金匱要略·五臟風寒積聚病》的「淋秘」，其同時記載：「其病中熱脹，……小便黃赤，甚則淋」。此外，《內經》中尚有淋、淋澀等名稱。後漢張仲景在《金匱要略》中設有淋證專篇，《消渴小便不利淋病脈證並治第十三》謂：「淋之為病，小便如粟狀，小腹弦急，痛引臍中。」文中提到小便溺出狀如粟米者，伴隨小腹疼痛，即今之所謂石淋也。說明淋證是以小便不爽，尿道刺痛為主症，也對本病的症狀表現和病因病位有了進一步的認識¹⁴。

漢代名醫華佗在《中藏經·論諸淋及小便不利》中論述：「諸淋與小便不利者，皆由五臟不通，六腑不和，三焦痞澀，營衛耗失，致起斯矣。」由此華佗認為淋證是屬於一種病機複雜的全身性病證，又提出淋證有分冷、熱、氣、勞、膏、砂、虛、實八種，為日後淋證臨床分類之雛形。北魏姚僧坦在《集驗方》中將淋證歸納為石、氣、膏、勞、熱的五淋之說，成為後世醫家對淋證分類的理論依據，其中熱淋和勞淋即相似於急慢性腎盂腎炎。

(2) 隋唐時期：

隋代巢元方對淋證的發病機製作了精闢的概括，他在《諸病源候論·淋病諸侯》將淋證分為石、勞、氣、血、膏、寒、熱七種，而以「諸淋」統之。又說：「諸淋者，由腎虛而膀胱熱故也。」「腎虛則小便數，膀胱熱則水下澀。數而且澀，則淋瀝不宣，故謂之淋。」明確提出淋證的病位在腎與膀胱，病機以腎虛為本，膀胱熱為標，成為後世醫家所尊崇，指導著臨床診治淋證的主要理論¹⁵。

另外，巢元方所著《諸病源候論》其中亦探討各種淋證的病因病機。論述說到：「熱淋者，三焦有熱，氣搏於腎，流入於胞而成淋也」；「勞淋者，謂勞傷腎氣而生熱成淋也」；「石淋者，腎主水，水結則化為石，故腎客砂石，腎虛為熱所乘」；「膏淋者，……此腎虛不能制於肥液」此外，也說明淋證會有復發的情況存在，如「宿病淋，今得熱而發者」。這種既注意淋證的共性，又強調淋證的個性的病機分析方法，為臨床治療不同淋證提供了理論依據。

唐·孫思邈所著《備急千金要方》提出「五淋」之名，唐·王燾所著《外台秘要》又具體指明五淋的內容：「集驗論五淋者：石淋、氣淋、膏淋、勞淋、熱淋也。」現代臨床仍沿用五淋之名，按臨床實際來講，熱淋和氣淋屬最常見。

(3)金元時期：

宋元時代總結出一些有實用價值的淋證的臨床診療經驗。金代劉河間首先提出感染濕熱毒邪是本病的主要致病因素，根據《素問玄機原病式·六氣為病·熱類》中云：「熱甚客於腎部，干於足厥陰之經庭孔，鬱結極甚而氣血不能宣通，則痿痺而神無所用。」認為淋證的病機是和熱邪客於腎所引起的氣血鬱結有關，這一論點為淋證之上行感染的認識開創了先河。

元·朱丹溪除承襲腎虛而膀胱生熱之說外，丹溪尚強調心及小腸病變與淋證的關係，他說：「大凡小腸有氣則小便脹，小腸有血則小便澀，小腸有熱則小便痛。」進而提出治療原則：「執劑之法，並用流行滯氣，疏利小便，清解邪熱。其於調平心火，又三者之綱領焉，心清則小便利，心平則血不妄行」並指出了淋證與轉胞，癃閉，遺溺以及血淋與尿血的鑒別要點。

朱丹溪在《丹溪心法·淋》中說：「諸淋所發，皆腎虛而膀胱生熱也。水火不交，心腎氣鬱，遂使陰陽乖舛，清濁相干，蓄在下焦，故膀胱裡急，膏、血、砂、石以小便道出焉。於是有欲出不出，淋瀝不斷之狀，甚者窒塞其間，則令人悶絕矣。」這是承襲了巢元方諸淋是因腎虛而膀胱熱所致病的觀念，並強調心腎不交亦是重要病機之一。

(4)明清時期：

明代總結出符合臨床的辨證施治原則，而清代已認識到各類淋證之間可以互相轉化或同時存在。

明·王肯堂在《證治準繩·淋》中提出淋證應隨病本不同而異其治的主張。其理由有二，一為「淋病必由熱甚生濕，濕生則水液渾，凝結而為淋」；二為「五臟六腑，十二經脈，氣皆相通移」，故「初起之熱邪

不一，其因皆得傳於膀胱而成淋。若不先治其所起之本，止從未流胞中之熱施治，未為善也。」

明·張景岳認為淋證與熱毒積蘊有關，並把病程的長短作為辨證的內容，在《景岳全書·淋濁》提出：「淋之初病，則無不由乎熱劇，無容辨矣。但有久服寒涼而不愈者，又有淋久不止及痛澀皆去，而膏液不已，淋如白濁者，此惟中氣下陷及命門不固之證也。故必以脈以證，而察其為寒為熱為虛，庶乎治不致誤。」又提出了「凡熱者宜清，澀者宜利，下陷者宜升提，虛者宜補，陽氣不固者，宜溫補命門」的辨證施治原則。

清·尤在涇所著《金匱翼·諸淋》也認為諸淋的區別並非絕對，往往與病程長短有關，「初則熱淋、血淋，久則煎熬水液，稠濁如膏如砂如石也」。治法原則上認為「散熱利小便，只能治熱淋、血淋而已。其膏砂石淋，必須開郁行氣，破血滋陰方可。」這些看法雖與臨床實際不完全吻合，但他已認識到各種淋證之間可以互相轉化或同時存在，特別是他強調「開郁行氣，破血滋陰」以治療石淋的治療原則，對臨床有很好的指導意義。

在淋症中有一部分敘述到「石淋」和「砂淋」與結石病有很高的關聯性，其症狀也和結石的絞痛相似，因此自中國古代的醫學中就顯示出結石這個疾病很早就困擾著人類。傳統中國醫學對於淋證的認識，隨著時代的不斷前進，認識也在不斷的深入，無論是從病名的提出，症狀的描述，分類，病機病理的分析，還是到治療大法的確立，至明清時代，已逐漸形成了從病因到證治理法比較全面的辨證論治體系，並積累了許多行之有效的方劑¹⁶。他們認識腎虛和熱邪、熱毒和濕熱在淋證致病中的作用，提出了淋證的發生與心和小腸以及氣血病變有關，在治療上確立了辨證論治和治病求本的原則，從而形成了對淋證從病因到證治比較全面的認識¹⁴⁻¹⁷。

第四節 研究動機

泌尿道結石是泌尿系統疾病中最常見的疾病之一。臨床上，病人會

以急性腎絞痛、血尿、尿急、尿頻、小便灼熱感，伴隨臉色蒼白、噁心、嘔吐、冒汗、腹瀉、腹部不適，偶而有發燒等證狀來表現。如果不積極治療，有些病人會發生阻塞性腎病變，甚至發展到腎衰竭，最後需要透析治療。在台灣，泌尿道結石有高達9.6%的盛行率，而且一直有逐漸增加的趨勢，如果沒有積極的預防和治療，其復發率很高。為了治療此疾病，許多國家都需要花費大量的醫療費用，因此為了節省龐大的醫療費用，開發有效的預防藥物，對於泌尿道結石的預防實在是一個很重要的健康議題。

泌尿道結石也是個古老的疾病，在傳統中國醫學中，它是屬於淋證中「石淋」、「砂淋」的範疇。歷代以來，對於淋證的分類、症狀、病因病機、診斷以及治療，發展出完備豐富的內容，其中有許多有效的方劑自歷代以來一直使用著，這些知識及經驗的傳承實在是一個重要的課題，可以提供我們在臨床上治療泌尿道結石和預防復發的指導原則。因此，我們想要從治療淋證的傳統中草藥中找出一些有效的預防藥物，可以利用現代科學的方法及儀器研究來證實其療效，以期擴展其用途，節省龐大的醫療費用進而造福多的病患。

第二章、文獻探討

第一節、泌尿道結石的形成原因¹³

泌尿道結石的形成原因包含三部分，第一部分是種族和環境因素，第二部分是生理生化因素，第三部分是飲食因素。

第一部分：種族和環境因素

1.種族因素：

黑人較白種人不容易罹患泌尿道結石。在南非，15%的白人族群罹患泌尿道結石，然而只有1%的黑人族群罹患泌尿道結石；在美國的黑人族群同樣擁有較低的盛行率。其它盛行率較低的種族還有愛斯基摩人、美洲原住民、以色列人，但是種族之間有如此大差異的確實原因仍然尚未明瞭。

2.氣候因素：

尿液量減少是造成泌尿道結石的重要原因之一，炎熱的氣候會使得尿液量減少，而增加尿中草酸鈣的濃度。因此中東的沙烏地阿拉、美國東南部(包括佛羅里達州、喬治亞州、南、北卡羅來納州)這些炎熱區域的盛行率都較高。

3.職業因素：

從事某些職業的人，尤其是工作需要長時間坐著的人，罹患泌尿道結石的機會較高，例如司機、航空員。另一方面可能是因為水分攝取不足，導致尿液濃縮所致¹⁸。

第二部分：生理生化因素

1.尿液中的鈣離子：

以前許多研究指出，高鈣尿被認為是造成草酸鈣結石的重要危險

因子。但是，目前發現形成尿液中草酸鈣的超飽和現象中，草酸根離子的飽和能力是鈣離子的15倍。因此，目前認為，尿液中的草酸根離子才是草酸鈣結石形成的決定因子¹⁹。

2.尿液中的草酸根離子：

Robertson認為尿液中的草酸根離子是草酸鈣結石形成的最重要的決定因子²⁰。有四個原因會增加尿液中的草酸根離子分泌，第一是飲食中含有過多草酸；第二是腸道吸收過多草酸；第三是內生性的草酸合成過多；第四是消化道中缺少草酸降解細菌(oxalate-degrading bacteria) 特別是Oxalobacter formigenes這隻細菌¹⁸。

3.尿液中的尿酸：

尿液中尿酸分泌過多是草酸鈣結晶形成的危險因子。將近三分之一草酸鈣結石的病人有尿液中尿酸分泌過多的現象²⁰。尿酸分泌過多的原因有攝取過多的蛋白質和內生性的尿酸產生過多。所以，臨床上，在有高尿酸尿症的草酸鈣腎結石病人身上，使用allopurinol可以降低腎結石的復發率²¹。

4.尿液中的檸檬酸鹽：

檸檬酸鹽可以抑制草酸鈣和磷酸鈣的成核、生長和聚集。許多研究指出結石病人同時有低檸檬酸尿症(19 to 63%)。所以，臨床上建議有低檸檬酸尿症的結石病人身上，可以使用鹼化療法(服用鹼性藥鹼化尿液)降低結石的復發率¹⁸。

5.尿液的pH值：

鹼性的尿液可降低草酸鈣結晶形成的危險，然而會增加磷酸鈣結晶形成的危險，磷酸鈣結石大多發生在pH大於6。此外，尿液在pH小於5.5會促進尿酸結石的形成。

第三部分：飲食因素

1.飲食中的草酸鹽：

食物中的草酸鹽含量多寡會影響尿液中的草酸鹽濃度。因此，罹患草酸鈣結石的病人應減少富含草酸鹽的食物，像是菠菜、甜菜的

根、花生、巧克力、荷蘭芹、草莓、小麥、麥麩、茶葉等等¹⁸。

2. 飲食中的鈣：

建議罹患草酸鈣結石的病人減少鈣的攝取量已經是行之有年的方法。但是，近年來的研究顯示這是不適當的方法，甚至有潛在的危險性²²。Curhan的研究中，高鈣的飲食可以降低得到腎結石的機率，相對的，低鈣的飲食反而升高了得到腎結石的機率²²。這是因為低鈣飲食使得鈣在腸道中和草酸鹽結合的量變少，因此更多的草酸鹽會被腸道吸收，再分泌至尿液中，增加尿中草酸鈣過飽和濃度。所以，Wahl建議罹患草酸鈣結石的病人每天需攝取800到1200 mg 的鈣²³。

3. 其他：

飲食中含有較多的動物性蛋白質、食鹽、醣類和脂肪以及較少的纖維質會增加得到泌尿道結石的機率。然而較多的植物性蛋白質、纖維質以及較少的食鹽、醣類和脂肪會降低得到泌尿道結石的機率。此外，足夠水分的攝取也可以降低泌尿道結石的罹患機率，建議美每天水分攝取量為2.5至3 L，維持排尿量每天為2 L^{12, 18}。

第二節、泌尿道結石的促進和抑制因子¹³

造成尿液中的鹽類結晶形成是由於尿液的成分異常引起，一方面是促進因子濃度太高，另一方面是抑制因子濃度太低，或是兩者皆有²⁴。尿液中的鹽類離子的濃度必須要達到飽和狀態，尿液中才會開始出現結晶核心，進而生長或聚集成為較大的晶體，附著在收集管上皮形成結石。

在人類尿液中存在著某些物質可以預防鹽類結晶的形成，這使得尿液總是處在超飽和狀態(metastable status)下而沒有結晶的形成，因此這些物質在控制結晶的形成具有重要的抑制作用²⁵。所以，研究促進因子和抑制因子在預防結石形成上的功能，是值得深入探討的，冀望將來可以運用於臨床治療或預防結石的復發。文獻中所報告的泌尿道結石促進因子有鈣、鈉、草酸鹽類、尿酸、胱胺酸、Tamm-Horsfall protein、低尿液pH值、低尿流量、細菌產物；無機的抑制因子有鎂、pyrophosphate、檸檬酸鹽；有機的抑制因子有Nephrocalcin、Tamm-Horsfall protein、

Urinary prothrombin fragment 1、inter-alfa-inhibitor、Glycosaminoglycans、高尿流量²。

第三節、泌尿道結石的種類及組成成分¹³

泌尿道結石的種類是依照所含結晶物質來做分類，以下為各種結石的種類、組成成分及所佔百分比²⁶：

1. 含鈣結石(Calcium stone)：79%。
 - (1)草酸鈣結石(Calcium oxalate stone)：59%。
 - (2)磷酸鈣結石(Calcium phosphate stone)：9%。
 - (3)草酸鈣和磷酸鈣混合型結石：11%。
2. 尿酸結石(Uric acid stone)：10%。
3. 感染性結石(Struvite stone)：由磷酸氫鎂(magnesium ammonium phosphate)組成：9%。
4. 胱氨酸結石(Cystine stone)和其他結石：2%。

含鈣結石是最常見的泌尿道結石類型，大多數的原因是不明的，只有 15% 的病人可以發現特殊的病因，像是原發性副甲狀腺亢進、腎小管酸中毒、遺傳性尿草酸過多症等等。尿酸有不溶於水的性質，在酸性尿液中較容易沈澱；目前尿酸結石的發生率有逐漸升高的趨勢，主要和飲食的改變有關，在原發性痛風的病人中有 20% 以上和續發性痛風的病人中有 40% 以上會發生尿酸結石。感染性結石和泌尿道感染有關，其病原菌為尿素酵素產生細菌(urease-producing organism)，可以使得尿素分解為氨，使尿液酸鹼度上升，有利於磷酸鹽結石的形成，臨床上最常見的感染性結石為鹿角狀結石。胱氨酸結石症是一個自體隱性遺傳的先天性代謝疾病²⁷。

第四節、泌尿道結石的手術治療和內科治療

一般使用的手術治療有以下四種²⁸：

1. 體外震波碎石法：

是利用 X 光或超音波定位，再利用電擊波或電磁波來擊碎結石，此種治療方法可以門診手術方式實行，不需要麻醉。一般病人經門診做完抽血、心電圖、X 光檢查，如果檢查數據正常便可施行之。一般來說，此種治療方式以腎結石或上輸尿管結石為主，但結石不宜太大，而且有一些危險因子必須術前注意，例如：高血壓的控制、肝脾機能與肝脾腫大、凝血機能好壞、腎臟發炎控制狀態、阻塞嚴重與否，都需要一併考慮清楚，才能減少後遺症的發生。較常見的合併症就是腎血腫、結石位移造成腎臟阻塞水腫、發炎，其成功率約 7 至 8 成。

2. 內視鏡碎石法：

此種治療方式最為多樣化。內視鏡可區分為軟式及硬式鏡，而碎石法可分為水電擊法、氣動碎石法、超音波碎石法、或雷射碎石法，一般台灣醫界大多採用硬式內視鏡加上水電擊或氣動式碎石法。此種方式可解決 8 至 9 成上中下輸尿管結石，但對組織的傷害性較大，因此安全性就與醫師的經驗與技術有絕大的因果關係。即便如此，仍然有許多情況，醫師不敢冒然用此方法來處理一些較複雜的結石。有鑑於此，現在有軟式鏡及欽亞鉻雷射碎石機，運用於泌尿結石與泌尿軟組織的治療。雷射對於任何一種結石皆可擊碎，而且碎石顆粒是所有結石治療方式裡最細小，因此，結石排除率最好、傷害性也最少。另外，雷射也可治療輸尿管軟組織病變，如輸尿管狹窄或息肉，偏偏許多結石會合併有這些軟組織病變，必須同時解決。許多高位與複雜性結石，若用雷射碎石再輔以軟式內視鏡，如此腎盂與部分腎盞結石，都可以用逆行性的方式加以處理，使病人免於開刀之苦。

3. 經皮穿腎截石術：

此種治療方法是由病人側背部插入導管至腎盂，再經過一連串的導管擴張，直至腎臟鏡可進入腎臟內，再利用超音波碎石機加以碎石。傷口一般大概 1 至 1.5 cm 直徑，但是體外可能會背負一條腎臟

引流管，至於時間的長短，則視結石處理的狀況而定，往往術後我們會對殘留的結石用體外震波碎石法來加以處理，這套組合療法稱為「三明治療法」。

4. 開腎取石術：

此乃是後一道方式，當前面幾種方式無法處理的結石，最後只好經此方法治療，但此種方法對腎臟的傷害性也最大。

自從 1980 年 Chaussy 發表全世界首例接受體外震波碎石術 (Extracorporeal Shock-Wave Lithotripsy, ESWL) 的病例之後²⁹，體外震波碎石術已經成為治療泌尿道結石的第一首選方式，目前百分之九十以上的泌尿道結石都可以體外震波碎石術來治療。若腎結石大於 2.5 cm 以及輸尿管結石大於 1.0 cm 以上時，則不適合利用體外震波碎石術來治療，必須採取其他的方法來配合治療。另外對於對孕婦、心肝腎功能不全者，凝血機制障礙者，輸尿管結石造成嚴重阻塞和腎水腫者不能用^{12, 27, 30}。

在內科藥物治療方面，尿酸結石可以口服 potassium citrate、allopurinol 來溶解結石；感染性結石可以口服 acetohydroxamic acid 來溶解結石；胱胺酸結石可以口服 potassium citrate、D-penicillamine、 α -Mercaptopropionylglycine 來溶解結石；草酸鈣結石並沒有有效口服藥物可以溶解結石。

在預防復發方面，必須先經由「代謝性評估」找出病因，這些評估包括結石分析、血液生化分析、二十四小時尿液測定，經由這些評估可以歸納出各種病因，再根據這些病因給予高選擇性的藥物治療，達到有效預防結石復發之目的，例如²⁷：

1. 吸收性高尿鈣症：Sodium cellulose phosphate, Thiazide。
2. 腎性高尿鈣症：thiazide。
3. 原發性副甲狀腺亢進：手術切除副甲狀腺。
4. 高尿酸鈣結石症：allopurinol, potassium citrate。
5. 腸性高草酸症：Mg, vitamin B6。

- 6.尿酸結石：allopurinol, potassium citrate。
- 7.感染性結石：antibiotics, acetohydroxamic acid(AHA)。
- 8.腎小管酸血症：potassium citrate。
- 9.低檸檬酸鈣結石症：potassium citrate。

總之，結石的手術治療已經到達安全、方便、副作用小的一個地步，這或許使得病人和醫師反而忽略了預防的重要性，以致於復發率居高不下，這對於患者的健康是一大威脅，也大量耗費醫療資源。在內科藥物治療方面，某些類型的結石已經有有效的治療和預防性藥物，例如：尿酸結石、感染性結石和胱胺酸結石。但是最常見的草酸鈣結石除了 citrate 類的藥物可利用來預防復發之外，在目前並沒有確切有效的藥物來治療和預防泌尿道結石，這些藥物仍然須要更多長期的臨床試驗來證明其療效。因此，發展有效的治療性或預防性的內科藥物是一個值得研究的議題¹³。

第五節、草藥治療及預防泌尿道結石的文獻回顧

雖然體外震波碎石術或是其他手術方法可用來解決大部分的結石問題，但仍存在造成急性腎損傷³¹、降低腎功能、增加結石復發率等風險^{31,32}。在藥物治療方面，許多臨床試驗已表明其可行性，citrate 是其中較新且有希望的藥物，但是仍然須要更多長期的臨床試驗來證明其療效。此外，這些藥物的使用仍然存在著許多的副作用³³，例如：Thiazide 會引起疲倦、嗜睡和性功能障礙等；Sodium cellulose phosphate 會引起嘔吐和腹瀉；Allopurinol 會引起皮膚紅疹、噁心、嘔吐和腹瀉等；Potassium citrate 會引起胃痛、胃腸氣脹、噁心和嘔吐等¹³。

因為尚無有效而且副作用低的內科藥物，可用來預防或治療泌尿道結石。近年來世界各國盡力在這一方面做研究發展，其中有一部分往地方性的植物性藥物來發展的趨勢，這些植物性藥物都有被使用來治療泌尿道結石的長久歷史，希望透過科學的研究能夠證明其確切療效，以及

有利新藥開發。目前已有許多文獻發表出來，顯示這些植物藥有莫大的潛力在治療和預防泌尿道結石上，例如許多中草藥已經被用於治療腎結石。舉例來說，中國的傳統中藥，澤瀉(*Takusha*)，已經被發表大鼠身上經由調節骨橋蛋白(osteopontin, OPN)的表現，有預防草酸結石的作用³⁴。澤瀉也有效地抑制草酸鈣晶體的增長和聚集³⁵。

傳統中國醫學的方劑—五苓散(*Wulingsan*, *Gorei-san*)，可有效地抑制由供應餵養高磷飲食的大鼠所引發的腎鈣質沉積症³⁶。Yoshimura等學者讓十五名健康男性服用豬苓湯(*Chorei-to*)或五苓散(*Gorei-san*)連續三天，收集服用前後二十四小時的尿液，測量尿液對於草酸鈣結晶的抑制作用；也分析其中的變量，有鈣離子、磷離子、鎂離子、尿酸、草酸、檸檬酸。結果顯示服用豬苓湯前後，尿液中的變量沒有明顯改變，且尿液對於草酸鈣結晶也無抑制作用。服用五苓散前後，尿液中的鎂離子明顯增加，且尿液對於草酸鈣結晶亦顯示明顯抑制作用³⁷。我們以往的研究得出的結論認為，無論是在體外³⁸和動物實驗³⁹，五苓散有預防草酸鈣結石形成的效果。

Atmani和Khan的報告指出，一種北部非洲的植物—毛赫尼亞草(*Herniaria hirsute*)的萃取物，是地中海的傳統藥用植物，在摩洛哥(Morocco)廣泛使用來治療結石疾病，在體外可以抑制草酸鈣結晶生長的影響和聚集⁴⁰。

Freitas等人也有報告指出，在巴西是一種民間常使用來治療泌尿道結石的草藥—真珠草(*Phyllanthus niruri*)的萃取物能抑制晶體生長，他們推測這個作用機轉有可能涉及葡萄胺聚糖(glycosaminoglycans)合併到結石中⁴¹。

Joshi等人也發表了蒺藜草(*Tribulus terrestris* Linn)和岩白菜(*Bergenia ligulata*)這二種草藥，在印度普遍被使用來治療泌尿道結石，可以顯著地抑制單水草酸鈣結晶體生長的體外實驗，其中*Bergenia ligulata*的抑制作用又較*Tribulus terrestris*為佳⁴²。*Trianthema monogyna*和*Macrotyloma uniflorum*這二種可食用的植物，生長在印度的東北部。Dasa等人的實驗顯示出兩者的萃取液可以減小草酸鈣結晶的大小和有溶解草酸鈣結晶的能力⁴³。

在譚思濉等學者對二金排石湯的研究中，利用大鼠膀胱穿線的方式誘發膀胱結石。顯示體外實驗中二金排石湯有溶解膀胱結石的效果，在酸性條件下溶解作用較明顯。在利用大鼠膀胱穿線的方式誘發膀胱結石的實驗中，二金排石湯對於膀胱結石的形成呈現抑制作用；此外對於大鼠膀胱內的埋石，二金排石湯具溶解作用⁴⁴。

在泌尿道結石治療的臨床實驗方面，大陸的學者有許多報導⁴⁵：栗田孝氏等對 1369 例單純性泌尿道結石症患者，探討了豬苓湯合用芍藥甘草湯的排石效果，結果排石率為 75%。因而認為與現時使用的西法排石促進劑與鎮痛劑相比，豬苓湯的效果毫不遜色，且副作用小。吉田種臣氏以豬苓湯並用電極板通電療法(簡稱豬電法)誘導結石自動排出，可提高大結石的排出率(42%)，據此認為豬電法是值得試用的一種方法。鈴木明氏單純使用豬苓湯治療泌尿道結石 23 例，有效率 39.11%，無副作用，其中 78.13% 毋須特別止痛。又對直徑 10 mm 以下的輸尿管結石用豬苓湯治療，並進行療效分析，結果上輸尿管結石的 4 周排石率為 40%，下輸尿管結石的 4 周排石率為 59.19%，總排石率為 50%，多數表現為無症狀的自然排石。田彥用加味豬苓湯防治尿路結石復發療效觀察及分析其臨床因素，收案 375 例患者，其中 103 例西醫排石治療後連續服用加味豬苓湯 3 個月，其餘 272 例只採用西醫常規處理，比較兩組的復發率，並對可能影響復發率的 12 項臨床因素進行 Logistic 回歸分析。結果：豬苓湯治療組的復發率(10.68%)顯著低於西醫常規處理組(20.59%) ($p=0.1025$)，影響其療效的因素有結石的類型，結石的病程和有無感染併發症。趙德柱等人用豬苓湯治療泌尿道結石 58 例，療效標準的治癒為症狀消失，結石排出，經超音波證實結石消失，好轉為症狀改善，超音波證實結石下移 3 cm 以上，體積縮小或數目減少。治療結果為，58 例患者中治癒 20 例，好轉 22 例，無效 16 例，總有效率為 72.4%。

第六節、豬苓湯的歷史源流

豬苓湯出自《傷寒論》，是張仲景針對陰虛水熱互結的病機而設，具有清熱利水作用，為後世開創滋陰利水治法的先河。該方被後世醫家

廣泛用於臨床各科疾病的治療，均有理想的效果。

豬苓湯首見《傷寒論》陽明病篇，第223條曰：「陽明病，……若脈浮，發熱，渴欲飲水，小便不利者，豬苓湯主之。」

224條又曰：「陽明病，汗出多而渴者，不可與豬苓湯，以汗多胃中燥，豬苓湯復利其小便也」。

少陰病319條又提到：「少陰病，下利六七日，咳而嘔渴，心煩不得眠，豬苓湯主之。」⁴⁶

在《金匱要略》「臟腑經絡先後病脈證第一」的第17條和「消渴小便不利淋病脈證並治第十三」的第13條分別指出「夫諸病在臟，欲攻之，當隨其所得而攻之，如渴者，與豬苓湯，余皆仿此」「脈浮發熱，渴欲飲水，小便不利，豬苓湯主之。」

豬苓湯由豬苓、茯苓、澤瀉、滑石、阿膠五藥組成。方中以豬苓為君，故冠以方名。豬苓、茯苓、澤瀉皆淡滲利濕之品，豬苓導熱下行而不傷陰，而茯苓又能健脾崇土，交通心腎；澤瀉甘鹹性寒，既逐膀胱、三焦之水，又瀉肝、腎二經之火，是臨床上利水清熱法中常用之藥。亦能行水而上，使陰津上滋，利水之中，又補陰不足；茯苓、澤瀉在本方中用為臣藥。滑石利竅通淋，導熱瀉熱，與陰陽交通之中而具瀉熱之能；阿膠為血肉有情之品，味厚而甘，既滋真陰，又能濟心火以下交於腎。五藥配伍，能利水而不傷陰，滋陰而不戀邪，共奏水利、陰復、熱清之效⁴⁷。

豬苓湯證的臨床表現原文有：發熱，渴欲飲水，小便不利，咳而嘔渴，心煩不得眠等。後世醫家臨床運用該方時主要以圍繞這些症狀展開的。陳明⁴⁸、谷巖芳⁴⁹、張清苓⁵⁰分別對古今中外有關豬苓湯證治療有效的醫案進行統計分析，三者的統計結果大同小異，與傷寒論原文比較，小便不利、口渴、心煩失眠、發熱皆與之相同。這裡需要指出的是小便不利範圍較廣，它包括了尿頻，尿急，尿痛，小便不禁以及尿後餘瀝不盡等。腰酸痛，指的是腰部酸楚不適，或者纏綿疼痛，甚者不能轉側。腰為腎之府，這裡腰酸痛不僅指出了疾病的部位，而且間接說明了豬苓湯證的病機與腎臟的功能密切相關。

現代治療範圍的研究只要辨證為陰虛水熱互結，運用豬苓湯對多種

急慢性疾病均可以達到治療效果⁵¹。例如：急慢性泌尿道感染、腎小球腎炎、腎病症候群和特發性浮腫、泌尿道結石、腎積水、乳糜尿、口眼乾燥症候群與慢性濕疹、流行性出血熱休克期和肝硬化出血、急性熱病：如小兒腸炎、腎盂腎炎、鉤端螺旋體後遺症、重症感冒等。

由此可知，豬苓湯在古代經典中有使用小便不利的記載，現代亦常使用在泌尿系統感染、結石的問題上，的確有其功效。

第七節、文獻探討小結

泌尿道結石的形成是個複雜的過程。首先，尿液必須要達到鹽類的超飽和濃度，接下來結晶核心形成，晶體的生長和聚集相續發生，形成晶體必須能夠停留在腎小管中不被尿液沖走，才有機會形成結石⁵²。亦受到許多因素的影響，諸如種族、環境、生理生化、飲食等因素。另外在尿液中存在著鹽類結晶形成的促進因子和抑制因子，結石的生成一方面是促進因子濃度太高，另一方面是抑制因子濃度太低，或是兩者皆有所導致。

雖然體外震波碎石術或是其他手術方法可用來解決大部分的結石問題，但仍存在許多風險，例如急性腎損傷、降低腎功能、增加結石復發率等。在藥物治療方面，許多臨床試驗已表明其可行性，但是對於臨床最常見的草酸鈣結石，除了 citrate 之外依然沒有藥物可利用在治療或預防上，而且這些藥物治療仍然有許多的副作用存在。

因為尚無有效而且副作用低的內科藥物，可用來預防或治療泌尿道結石。近年來世界各國盡力在這一方面做研究發展，其中有一部分往地方性的植物性藥物來的趨勢，這些植物性藥物都有被使用來治療泌尿道結石的長久歷史，希望透過科學的研究能夠證明其確切療效，以及有利新藥開發。因此，發展有效且副作用少的內科藥物治療是一個值得研究的議題。之前在二金排石湯的研究中，顯示體外和動物實驗中二金排石湯都有抑制和溶解膀胱結石的效果，原本考慮作為候選的藥物。不過由於二金排石湯是由木通、牛膝、炙甘草、車前子、金錢草、海金沙、滑石、瞿麥所組成，其中的木通有些品種有含馬兜鈴酸的疑慮，所以暫時

不考慮。

豬苓湯在中國已經有兩千年的使用歷史，治療範圍廣泛，主要功能為利水滲濕，古代經典中有使用在淋證或小便不利的記載¹⁷，現代亦常使用在泌尿系統感染、結石的問題上，現代文獻中也有許多對豬苓湯或其中單味藥的研究。所以，豬苓湯在各方面的療效及作用是值得深入探討的，本研究著重於豬苓湯對於草酸鈣結晶的抑制作用，冀望將來可以運用於臨床治療或預防結石的復發。



第三章、材料與方法

第一節、概述

主要是探討豬苓湯對於大鼠腎臟草酸鈣結晶沉積的抑制作用。

第二節、儀器設備

以下為本研究所使用之儀器設備和實驗動物以及其廠商名稱與產地如下：

1. Sprague-Dawley rat (國科會，台灣)
2. Drying oven (DENG YNG DO45, Japan)
3. Autoclave (Tomin TM-328, Taiwan)
4. 離心機 (HERMLE Z200A, Germany)

第三節、實驗試劑

以下為本研究所使用之實驗試劑和其廠商名稱與產地如下：

1. 0.75% 乙二醇：Ethylene glycol (Sigma (E9129), USA)
2. 豬苓湯：Zhulingtang (科達製藥股份有限公司，台灣台中)

第四節、製備豬苓湯萃取液的實驗方法

藥物來源：

豬苓湯是使用科達(Koda)製藥股份有限公司所提供的科學中藥粉末製劑。豬苓湯的組成為 *Polyporus umbellatus (Pers) Fries* (豬苓), *Poria cocos (Schw.)* , *Wolf* (茯苓) , *Alismatis rhizoma* (澤瀉) , *talcum* (滑石) 和 *Colla Corii Asini* (阿膠) 五種藥物，其重量比例為 2:2:2:2:1，其中賦形劑為澱粉(starch)。我們將實驗用的豬苓湯粉末交由財團法人醫藥工業技術發展中心(Medical and Pharmaceutical Industry Technology and Development Center, Taiwan)檢驗；HPLC fingerprint 圖示於圖 3.1，顯示有三個主要的吸收尖峰在 52.210，57.988 和 65.865 分鐘。豬苓湯粉

末的重金屬成分如下：鎘(Cd) $0.180 \pm 0.011 \mu\text{g/g}$ 和鉛(Pb) $0.693 \pm 0.021 \mu\text{g/g}$ 。

豬苓湯萃取液的製備流程：

先秤取 100 g 的豬苓湯粉末，將其倒入 1000 ml 玻璃瓶中，加入 500 ml 的 d.d. water，再把玻璃瓶放在 autoclave 中，溫度設定為 121°C 下，加熱 15 分鐘。然後取出玻璃瓶，瓶中產物呈現果凍狀，此時再加入 d.d. water 直至 750 ml，將其搖晃混合均勻，然後放置 4°C 冰箱中靜置七天。七天後，將析出的上清藥液倒出，以 1,500 rpm 離心 10 分鐘，再將離心後上清藥液儲存於 4°C 下備用。

秤取豬苓湯萃取液的乾重：

取出 1 ml 製備完成的豬苓湯萃取液，裝入 2 ml 小管中，放置在 60°C 烘箱中乾燥一天，之後取出秤重，計算出 1 ml 中含豬苓湯的乾重。實驗重複兩次，取平均值。

製備同一濃度的豬苓湯萃取液：

在動物實驗中，將藥液製備成一種濃度： 65 mg/ml 。

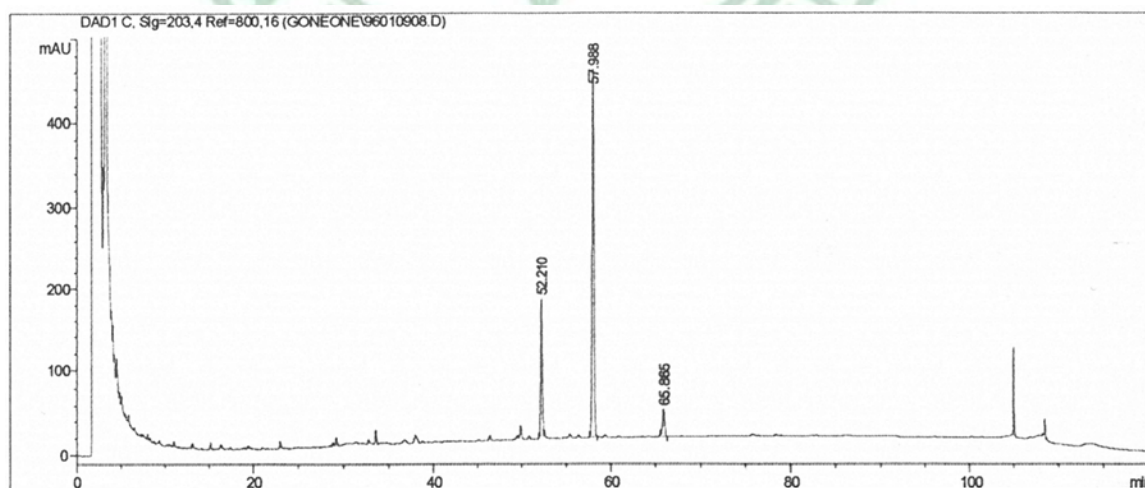


圖 3.1 典型的豬苓湯甲醇萃取液的高壓液相層析法 (high pressure liquid chromatography, HPLC) 色彩層析譜數據。二極管陣列檢測器 (Diode array detector) 定在可吸收紫外線 203 nm.

第五節、動物實驗的步驟

動物實驗分成四小組來進行，每組飼養三週，所有組別都以加入 0.75% 乙二醇(ethylene glycol, EG)的食用水和正常的飼料來餵養。所有組別使用 8 隻雄性 Sprague-Dawley 品系的大白鼠(除第一小組使用 11 隻外)，體重大約為 320 g。以隨機分組的方式分成四個小組，飼養四週。

第一小組(Group 1)為對照組，除了飼料餵養，沒有任何的中藥治療。

第二小組(Group 2)為對照組，除了以 0.75% 乙二醇加入食用水中餵養外，每天用胃管灌食澱粉(starch)4.5 ml 一次，沒有任何的中藥治療。

第三小組(Group 3)為豬苓湯低劑量治療組，除了以 0.75% 乙二醇加入食用水中餵養外，每天用胃管灌食豬苓湯萃取液(濃度 65 mg/ml)1.5 ml 一次(圖 3.2)。

第四小組(Group 4)為豬苓湯高劑量治療組，除了以 0.75% 乙二醇加入食用水中餵養外，每天用胃管灌食豬苓湯萃取液(濃度 65 mg/ml)4.5 ml 一次。(Group 3、Group 4 的平均劑量各別為 305 mg/kg、915 mg/kg。)



圖 3.2 用胃管灌食豬苓湯萃取液的情形

飼養期間終止後，所有大白鼠用乙醚麻醉後，以空針抽取心臟血液致死，然後解剖取出兩側腎臟。雙腎以福馬林(formalin)固定後，再以石蠟(paraffin)包埋，用eosin solution染色製成切片。鼠腎切片以光學顯微鏡和偏光顯微鏡分別觀察。

第六節、尿液和血清的分析

我們使用代謝籠收集二十四小時尿液樣本兩次，在實驗開始和實驗結束的時候(圖3.3和圖3.4)。血清樣本同樣收集兩次。基準點的血清樣本從尾巴收集而實驗結束時是用針頭從心臟抽取。尿液和血清中的結石疾病危險因子，譬如鈣，游離態鈣、磷，和pH值，用Hitachi-7150和Roche-Omic analyzer來測量。



圖3.3 實驗開始時，用代謝籠收集二十四小時尿液樣本的情形

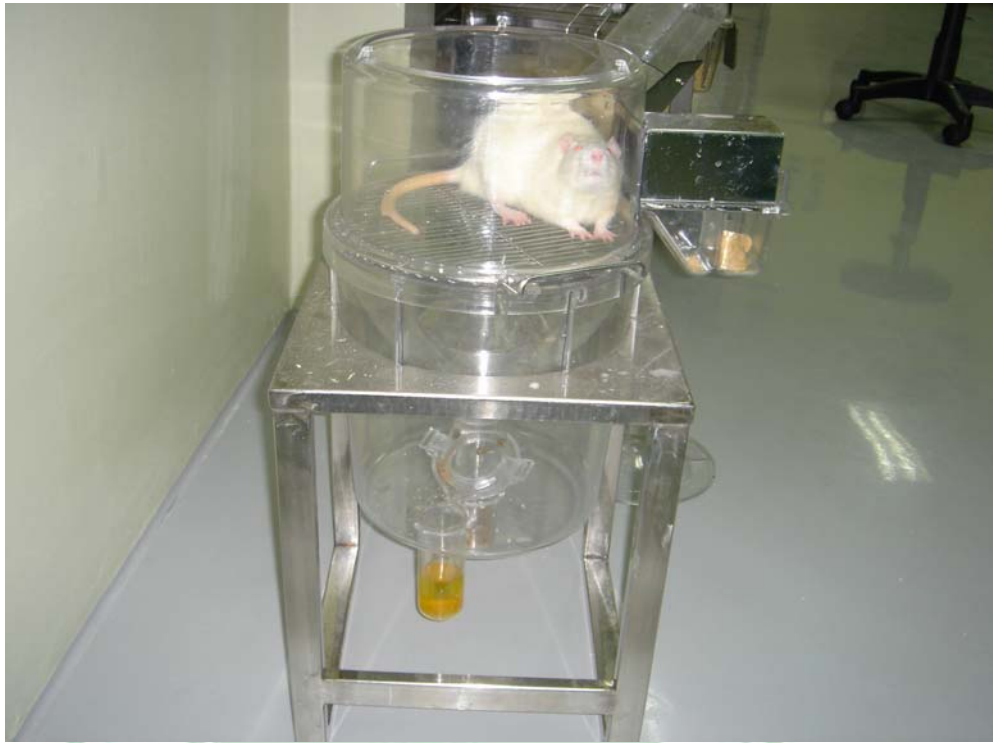


圖3.4 實驗結束前，用代謝籠收集二十四小時尿液樣本的情形

第七節、評估腎臟結晶沉積的嚴重度

評估時，每隻大鼠選取一邊的鼠腎切片，在顯微鏡下，我們用四條線將每個腎臟劃分成八個相等大小的區域(圖3.5)，再使用一臺數位照相機將八個相等大小的區域在40倍的視野下拍照，我們再設計一個電腦輔助的圖像計分方法(*ImageScoring*)，用來幫助計分的工作(圖3.6)。如同Nelde所述⁵³，在偏光顯微鏡100倍下觀察鼠腎切片，所發現的草酸鈣結晶沉積以半定量的方式分成四種等級(-, +, ++, +++)(圖3.7)，分別是從“沒有結晶沉積”到“大量的結晶沉積”。四種等級再分別給予分數(0, 1, 2, 3)來表示，這分數稱為「結晶沉積指數」(*crystal deposition index*)。一共有328個圖像文件被存放在一個檔案中，每個區域以40倍的視野給予一個結晶沉積指數，再將八個分數取平均值。以雙盲的方式，分別由六個同事獨立判讀，再取平均值以適當的統計方法分析，如果有差距太大的個案，則重新討論，以取得共識。

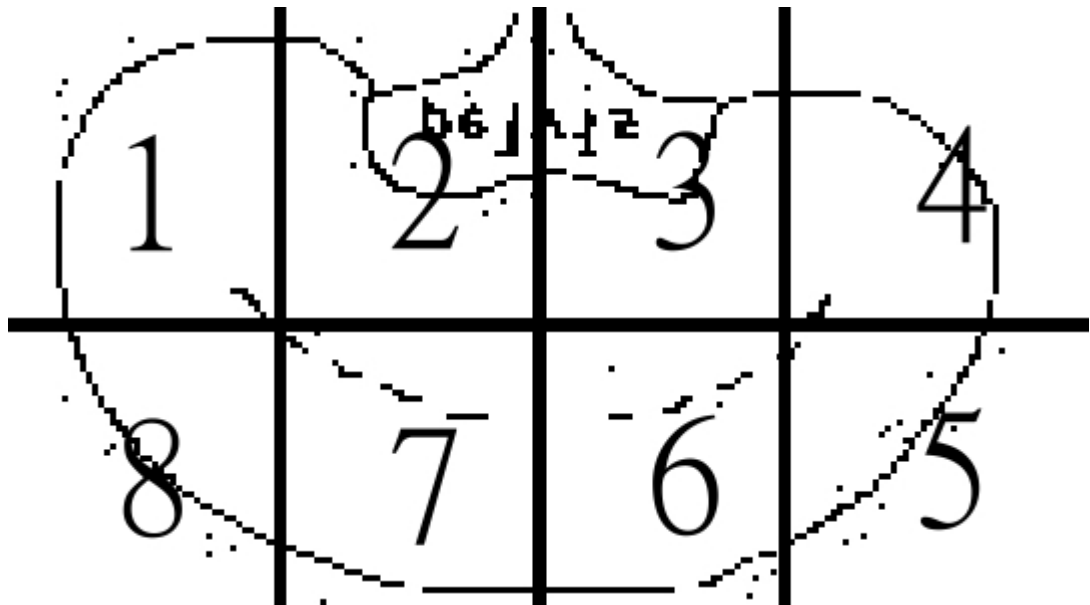


圖3.5 每個大鼠腎臟的矢狀斷面被四個虛擬線分為八個區域。

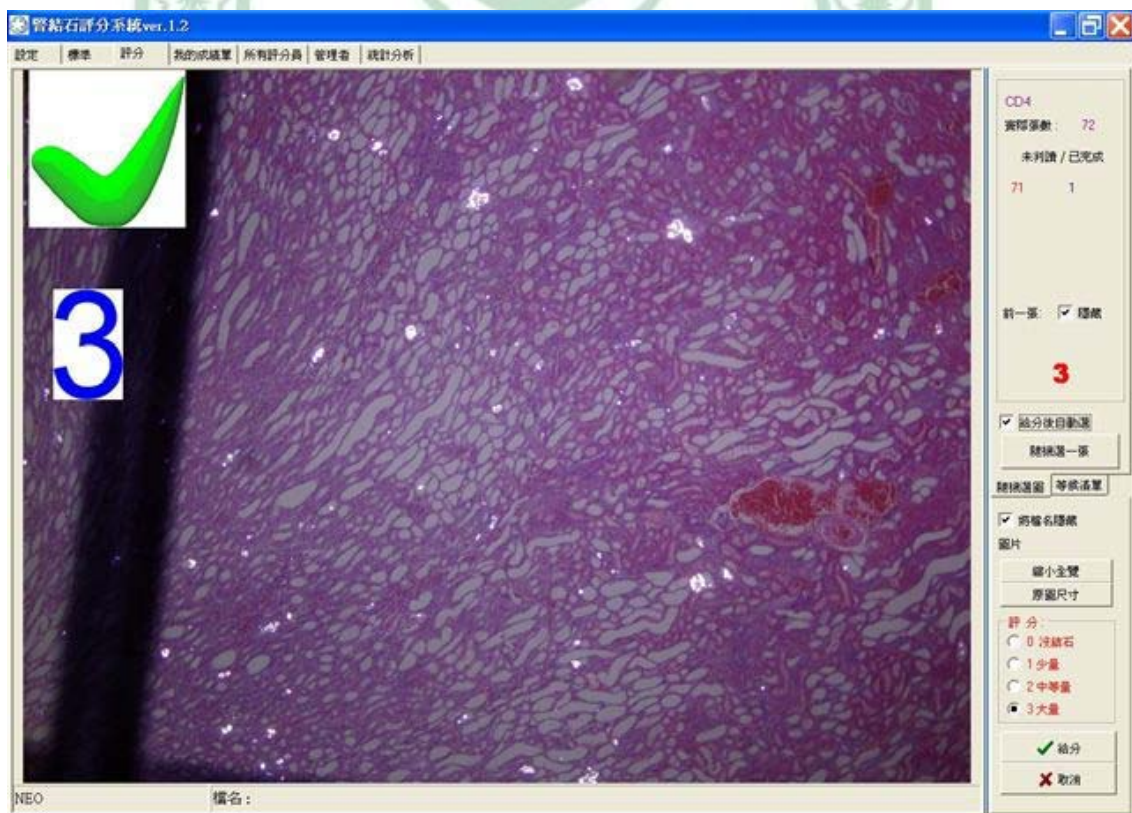


圖 3.6 “ImageScoring”，電腦輔助的快照影像系統。

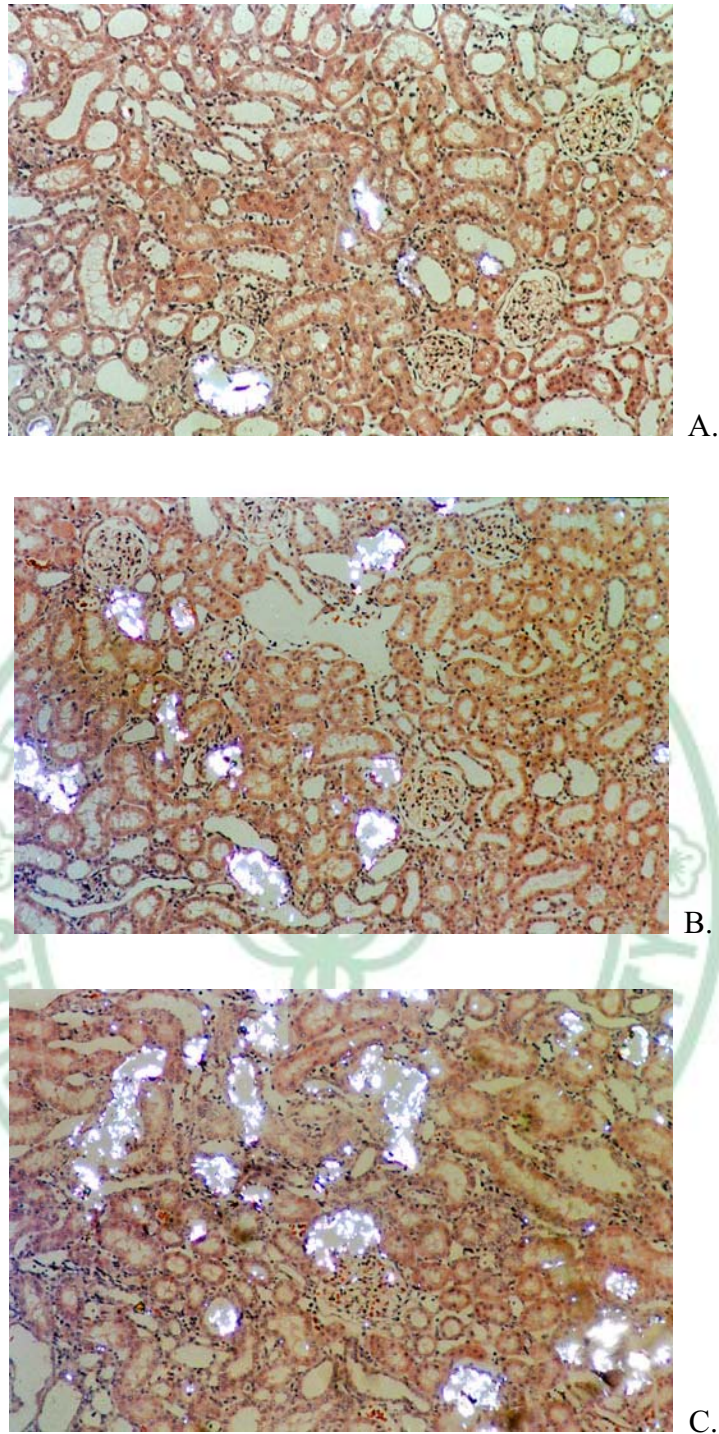


圖 3.7 用偏光顯微鏡觀察(100X)，以半定量的方式分級草酸鈣結晶沉積：A：mild; B：moderate; C：massive；Scale bar=0.1 mm¹³

(圖取自於 陳育正：五苓散對於體外草酸鈣結石模型和大鼠草酸鈣結石模型的抑制作用
碩士論文，中國醫藥大學中國醫學研究所，台中 2006；pp. 58)

第八節、資料分析

在動物實驗中，大鼠重量以及尿液和血清的數值以mean ± standard deviation 來表示，將資料以one-way ANOVA分析。結晶沉積指數則以 non-parametric Kruskal-Wallis test 做組間比較，然後再以Wilcoxon rank sum test(Mann-Whitney test)做配對的比較，若 $p < 0.05$ 代表有顯著意義。本實驗的統計以*the Statistical Package for the Social Science (SPSS® for Windows, release 15.0, SPSS Inc., Chicago, Illinois)*來進行計算⁵⁴。



第四章、結果

在基準生化數據上，顯示四組並無顯著的差異(表 4.1)。大鼠安慰劑組(乙二醇加澱粉)在體重增加上顯示出生長遲緩，平均為 160.63 ± 23.06 gm，和大鼠正常組的平均體重 179.63 ± 13.41 gm 相比，體重增加較為緩慢($p < 0.001$)(表 4.2)。

在尿磷的數據上，大鼠安慰劑組比大鼠正常組顯示出顯著較低的數值($p = 0.045$)。在血清磷的數據上，大鼠安慰劑組和豬苓湯低劑量組這兩組與大鼠正常組比較，顯示出明顯較低的數值(分別為 $p = 0.005$ 和 $p = 0.03$)(表 4.3)。

不過，在尿中的 pH 值、尿中游離鈣、血清中的 pH 值、游離鈣和血清鈣上，這四個群組之間並沒有顯著差異。在實驗前後的尿量變化上，這四組間並無顯著的差異($p = 0.199$, one way ANOVA)。在詳細的數值上來看，實驗前後的尿量變化分別是 8.75 ± 15.627 ml(第 1 組)， 16.13 ± 8.576 ml(第 2 組)， 11.50 ± 9.181 ml(第 3 組)和 5.25 ± 2.315 ml(第 4 組)。

組織學上顯示，正常對照組大鼠沒有腎臟的鈣化，相反的，在用乙二醇餵食的大鼠上(第 2,3,4 組)在腎臟的皮質和髓質可以發現結晶沈積。由偏光顯微鏡觀察下，晶體展示了雙向折射(bi-refringent)的外觀，而且無論是在腎臟的皮質或是髓質都有許多的結晶被發現(圖 4.1)。

同時，我們也注意到發炎性的變化，包括小管內部的晶體，收集小管的結晶栓子，腎小管上皮的細胞損傷，間質發炎反應和晶體被巨細胞吞噬(圖 4.2 和 4.3)。

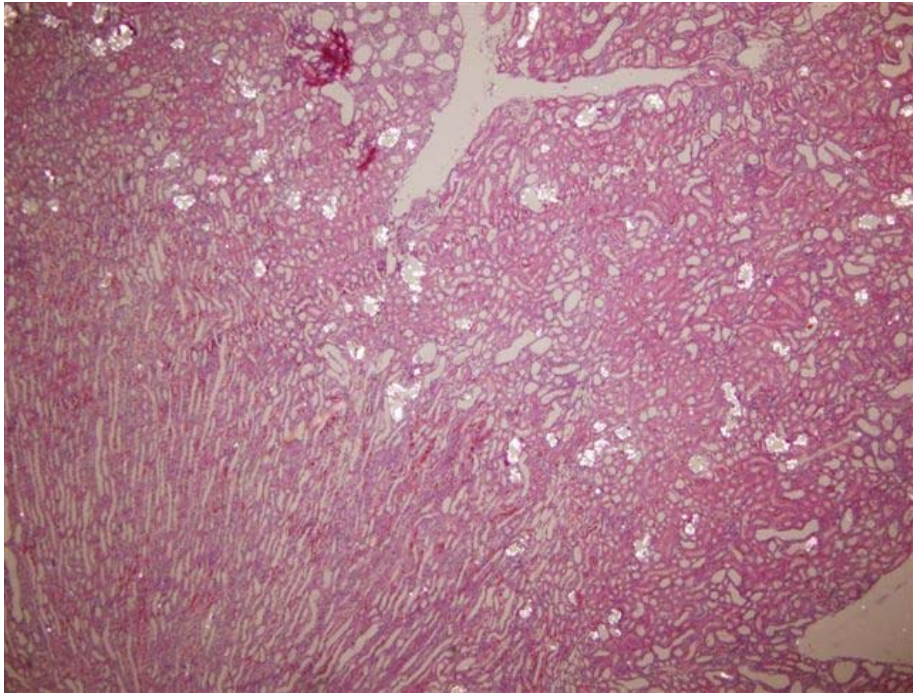


圖 4.1 在腎臟的皮質和髓質均充滿許多的草酸鈣結晶

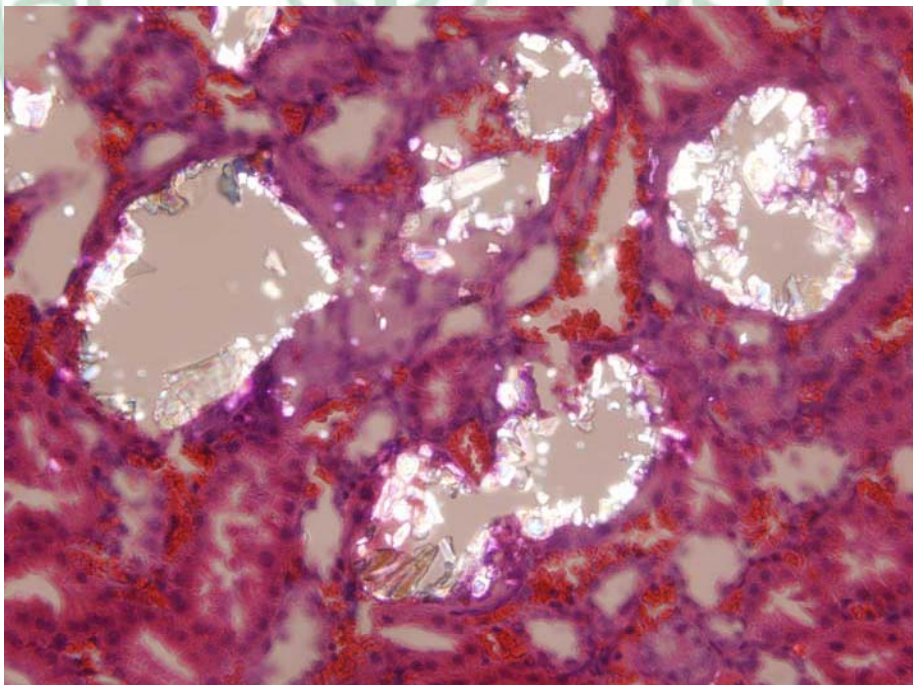


圖 4.2 有發炎性的變化，包括小管內部的晶體，收集小管的結晶栓子和腎小管上皮的細胞損傷

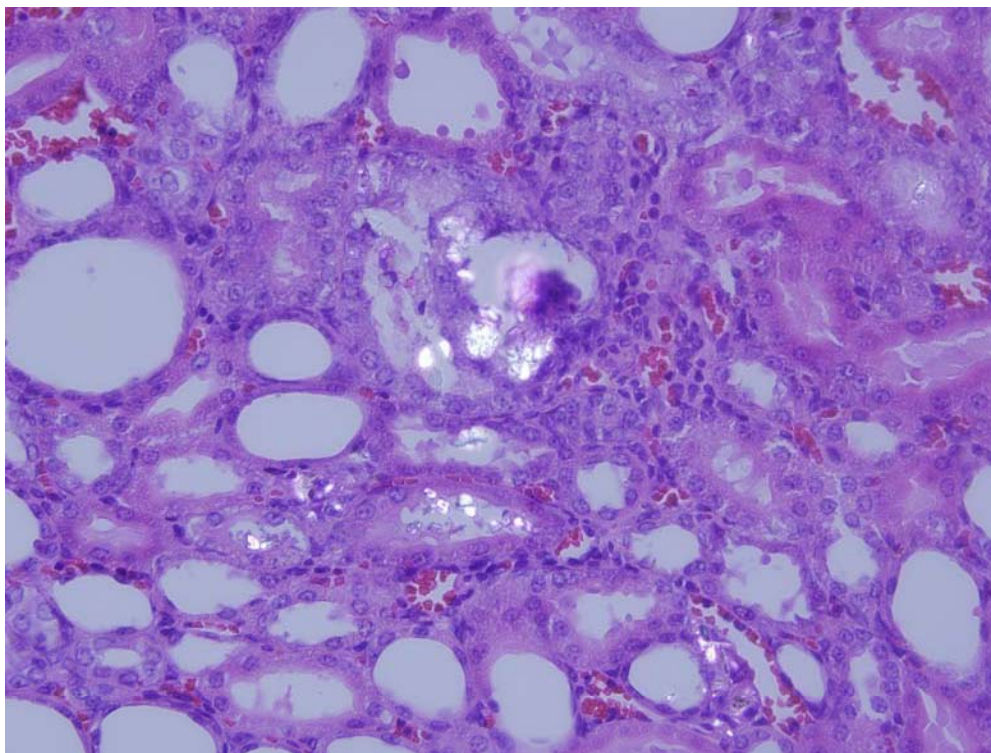


圖 4.3 除了管內部結晶栓子和上皮的細胞損傷，還可以看到間質發炎反應和晶體被巨細胞吞噬

在分析結晶沉積指數後，兩個豬苓湯餵食組均顯著低於安慰劑組。第3組的分數從1.40下降至0.41，而第4組的分數從1.40下降至0.40 (以Mann - Whitney U 檢驗， $p = 0.025$ 和 $p = 0.047$) (表 4.4)。

整體而言，豬苓湯似乎在豬苓湯餵養的大鼠上，成功地抑制了草酸鈣結晶沉積在腎臟(Kruskal-Wallis test, $p = 0.041$)。在結石形成的發生率上，以組內發生結石形成的大鼠個數除以組內大鼠的總數來計算，在低劑量組從90.9%下降至75.0%，在高劑量組由90.9%下降至87.5%(表 4.5)。以相對的風險(relative risk)來看，與安慰劑組相比，第3組從1下降至0.82，第4組並從1下降到0.96。

表 4.1 大鼠的基準生化值

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
Baseline Data	Normal	EG + Starch	EG + ZLT (low dose)	EG + ZLT (high dose)
Urine Phosphorus(mg/dl)	22.16 ± 0.84	22.64 ± 0.40	20.48 ± 5.36	22.45 ± 0.92
Urine free Calcium (mmol/L)	0.79 ± 0.39	1.05 ± 0.40	0.34 ± 0.22	0.40 ± 0.31
Urine pH	6.48 ± 0.53	6.50 ± 0.24	6.33 ± 0.50	6.22 ± 0.24
Serum Calcium(mg/dl)	6.92 ± 1.41	6.88 ± 1.14	5.62 ± 1.09	7.05 ± 1.50
Serum Phosphorus(mg/dl)	21.96 ± 2.08	21.43 ± 2.03	20.19 ± 0.46	22.42 ± 4.65

Values are expressed as Mean ± S.D.

One-way ANOVA.

四組間大鼠的基準生化值沒有顯著差異

表4.2 豬苓湯在大鼠體重和腎臟重量上的作用

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
	normal	EG + Starch	EG + ZLT (low dose)	EG + ZLT (high dose)
Body weight gained (g)	179.63 ± 13.41	130.63 ± 23.06 ^{b*}	167.50 ± 21.21	161.75 ± 16.918
Kidney weight, left (g)	1.83 ± 0.34	1.83 ± 0.33	1.65 ± 0.26	1.69 ± 0.11
Kidney weight, right (g)	1.91 ± 0.50	1.74 ± 0.21	1.65 ± 0.26	1.75 ± 0.21

Values are expressed as Mean ± SD, and analyzed by one-way ANOVA and multiple comparison test (Turkey HSD).

b Denotes the comparison of four groups. * $p < 0.05$

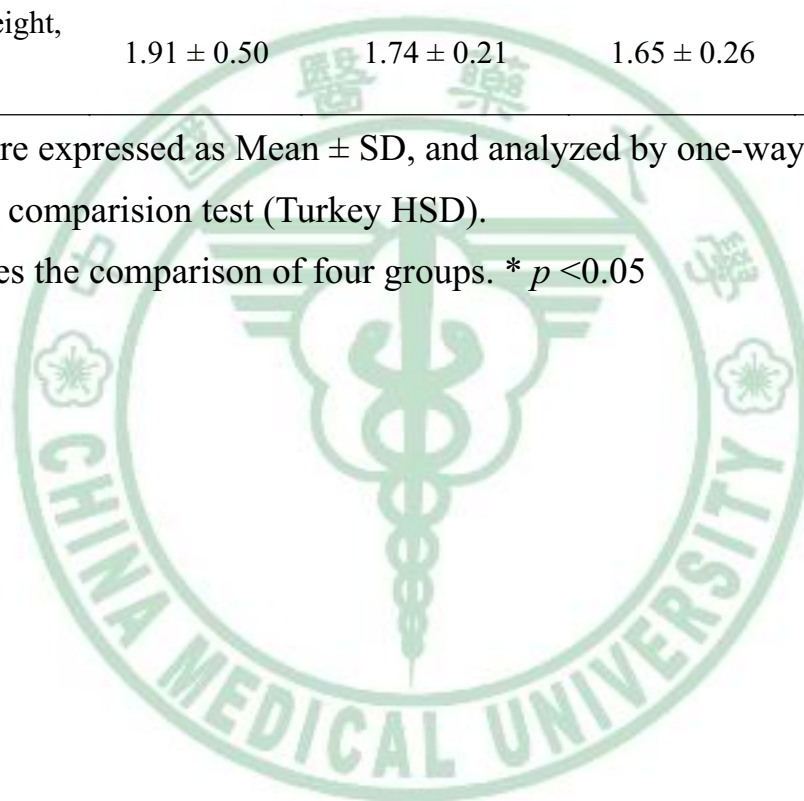


表 4.3 豬苓湯在大鼠尿液和血清生化值上的作用

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
	normal	EG + Starch	EG + ZLT (low dose)	EG + ZLT (high dose)
Urine Phosphorus (mg/dl)	20.98 ± 1.12	19.52 ± 0.68 ^{a*}	20.16 ± 0.62	20.70 ± 0.51
Urine free Calcium (mmol/L)	0.35 ± 0.21	0.19 ± 0.06	0.27 ± 0.06	0.30 ± 0.08
Urine pH	6.92 ± 0.45	6.74 ± 0.32	6.55 ± 0.50	6.49 ± 0.16
Serum Calcium (mg/dl)	11.24 ± 0.26	10.69 ± 0.59	10.75 ± 0.63	10.97 ± 0.68
Serum Phosphorus (mg/dl)	12.54 ± 1.25	9.45 ± 2.26 ^{a*}	8.76 ± 1.63 ^{a*}	10.18 ± 2.84
Serum free Calcium (mmol/L)	1.09 ± 0.07	1.10 ± 0.06	1.09 ± 0.17	1.15 ± 0.04
Serum pH	7.11 ± 0.16	7.13 ± 0.09	7.12 ± 0.10	7.06 ± 0.08

Values are expressed as Mean ± SD, and analyzed by one-way ANOVA and multiple comparison test (Turkey HSD).

^a Values are significantly different compared to normal group **p* <0.05.

表 4.4 結晶沉積指數的分析

Group	Number of rats	Treatment	Mean of scores	P value
				Mann-Whitney U test
Group 2	11	EG + Starch	1.40 ± 1.20	
Group 3	8	EG + ZLT (low dose)	0.41 ± 0.60 ^{a*}	0.025 ^{a*}
Group 4	8	EG + ZLT (high dose)	0.40 ± 0.51 ^{a*}	0.047 ^{a*}

Values are expressed as Mean ± SD.

Kruskal-Wallis test for three groups p=0.041.

a Values are significantly different compared to placebo group (group 2) by Mann-Whitney U test. * $p < 0.05$

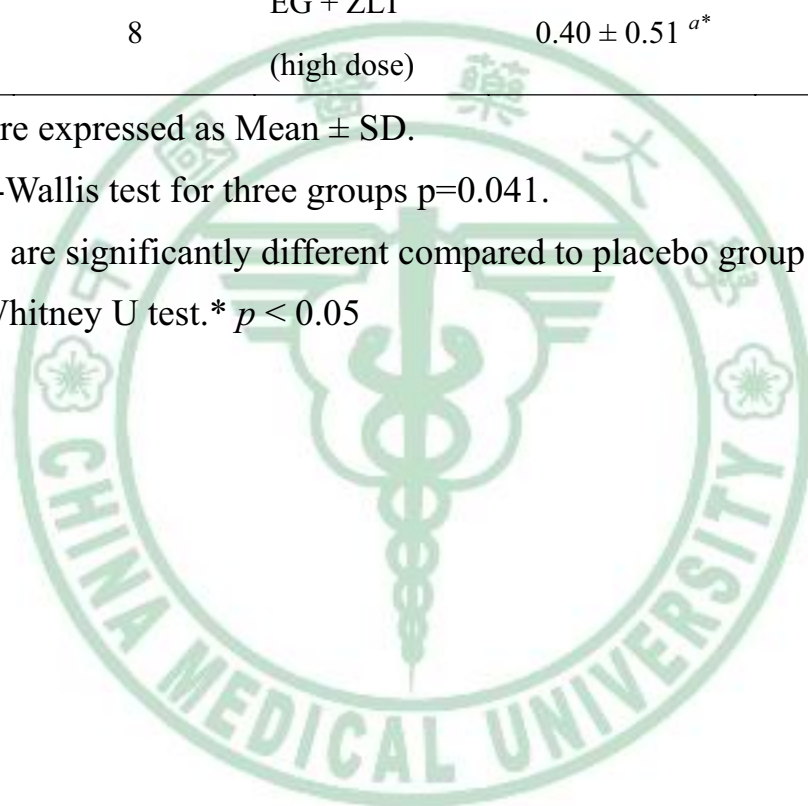


表 4.5 大鼠腎臟中結晶形成的發生率

Group	Treatment	Rat number	Number of urolithic rats	Number of rats without stone	Incidence rate of crystal formation	Relative risk
1. Normal	d. d. water, normal chow	8	0	8	0 %	
2. Placebo	EG water, starch gavages	11	10	1	90.9 %	1
3. Low dose	EG water, low dose ZLT gavages	8	6	2	75.0 %	0.82
4. High dose	EG water, high dose ZLT gavages	8	7	1	87.5 %	0.96

The relative risk is compared to the placebo group, respectively.

第五章、討論

第一節、豬苓湯對於大鼠草酸鈣結石模型的抑制作用

我們的研究結果顯示，在乙二醇餵養大鼠的模型中，豬苓湯可以有效地降低腎臟草酸鈣結晶的嚴重度。在豬苓湯餵養的大鼠(第3和4組)上，可以看到結晶沉積指數降低，而且結晶形成的發生率亦下降。在這個過程中，利尿效果可能沒有涉及當中，因為實驗前後尿量並沒有顯著的增加。無論是在尿液或血清中磷的濃度，安慰劑和低劑量豬苓湯組均低於正常對照組相(表4.3)。可能可以推測，在這個結晶的過程中磷是被使用的，因此在這些群組血清的濃度是降低的。不過，目前並沒有可靠的證據可以作出這一結論。

檢閱所有誘導結石形成的動物模型，給予大鼠乙二醇(ethylene glycol, EG)是在體內誘導草酸鈣腎臟結石⁵⁵⁻⁵⁹最常見和最有效的方法。以其他實驗方法誘導結石形成，也是有幫助的，包括在飲水或食物加入羥基-L-脯氨酸(hydroxy-L-proline, HLP)，植入充滿草酸的滲透迷你幫浦(osmotic mini-pumps)，切除迴腸加上餵食草酸，經腹腔注射草酸或羥基-L-脯氨酸⁶⁰。然而，儘管有代謝性酸中毒的副作用，如乙二醇餵養大鼠模型仍然是一個成功解經常在使用的�方法。

其中羥基-L-脯氨酸(HLP)越來越被重視，因為它和乙二醇一樣可以代謝成草酸(圖5.1)，但卻少了許多毒性較強的代謝產物和代謝性酸中毒的副作用。Neil等學者用10%到20%的羥基-L-脯氨酸(HLP)餵養雄性的Yorkshire-Durox豬二十天，結果成功地造成高草酸尿，草酸鈣的結晶尿，同時在腎乳突也形成草酸鈣，這通常被視為腎臟結石的前驅物。所以，羥基-L-脯氨酸(HLP)一樣可以達到和乙二醇誘導結石形成的結果，因此我們研究團隊在之後的研究已經採用羥基-L-脯氨酸(HLP)作為誘導結石形成的試劑。

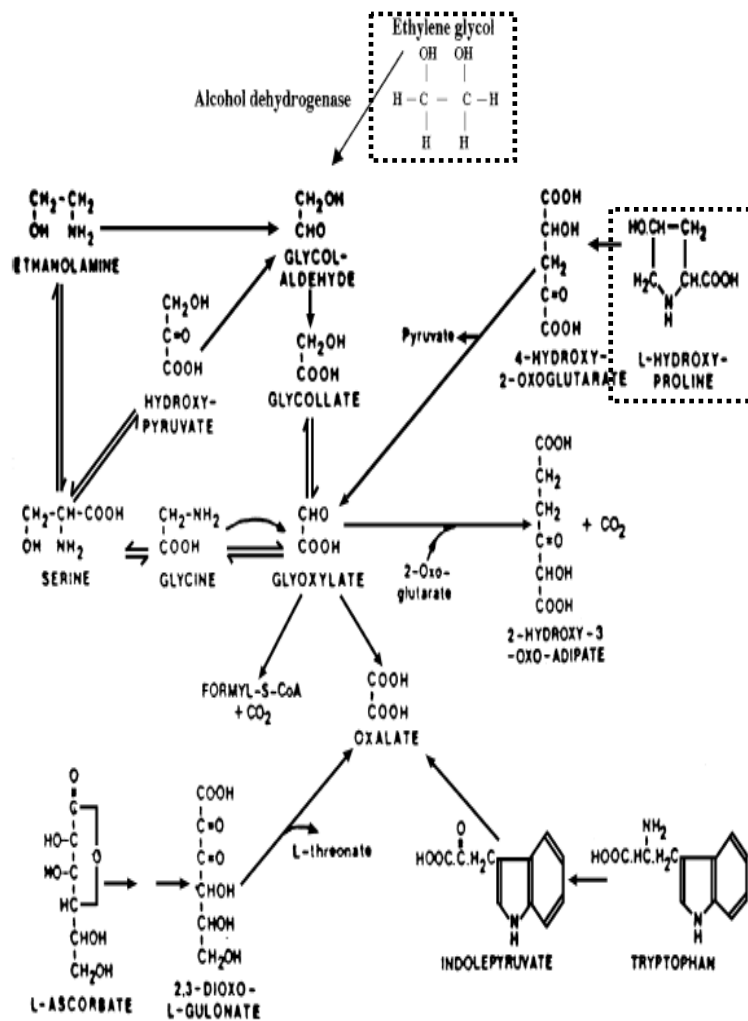


圖 5.1 乙二醇 (Ethylene glycol) 和 羥基-L-脯氨酸(HLP)在人體和動物中代謝合成草酸的途徑⁵⁵

(圖取自於 Halabe et al. Clinica Chimica Acta. 2003;330:136.)

與安慰劑組相比，低劑量豬苓湯治療組在結晶的形成的相對風險 (relative risk) 上是有顯著降低的。其他的研究者也有發表類似的結果，舉例來說，Wang 等人發表在 glyoxylic acid 誘導結石的大鼠模型中，給予腹腔內注射豬苓湯可能向下調控(down-regulate) 骨橋蛋白(osteopontin) mRNA 的表現和減少腎臟結石的嚴重性⁶¹。Koide 等人發現，低劑量豬苓湯有預防結石的效果⁶²。同時，其他研究者也得到相同的結論，就是豬苓湯的其中一項成分—澤瀉，有抑制結石形成的效果⁶²⁻⁶⁴。Yasui 等人

發表，在用澤瀉治療的大鼠上，可以有效地預防草酸鈣結石的形成和減少 OPN 的表現³⁴。賴真等學者用腎結石大鼠模型來看豬苓湯和澤瀉對骨橋蛋白(osteopontin) mRNA 的表達，結果兩者呈現相同的抑制作用⁶⁵。Suzuki 等人用了一個抑制草酸鈣晶體形成作用的體外系統研究，他們得出的結論認為澤瀉可以有效地抑制晶體形成，生長和聚集的每一個步驟³⁵。Xhou 等人由澤瀉中分離出三個化合物，鑑定為 alisol F 24-acetate, alisol A 24-acetate 和 alisomoxide⁶⁴。Yin 等人發表，在澤瀉治療的 Wistar 大鼠上發現，澤瀉可以抑制體外草酸鈣結晶體的生長和聚集，還可以降低腎臟的鈣含量³⁴。

最近對結石的機制研究方面蛋白質體學(proteomics)也扮演了重要的角色，也陸續發現了許多蛋白質與之有關，例如可以降低結晶的成核成長聚集的 Tamm-Horsfall protein (THP)⁶⁶，骨橋蛋白(osteopontin)⁶⁷，bikunin⁶⁸ 和 Urinary prothrombin fragment 1 (UPTF1)⁶⁹ 四種蛋白質。草酸鈣和磷酸鈣可以和非離子結構鍵結到腎臟表皮細胞的表面，包括 phosphatidylserine，osteopontin，nucleolin-related protein (NRP)，hyaluronan，annexin II⁷⁰ 這五種蛋白質。從這些報告和我們的研究結果，我們可以假設豬苓湯可能是一種有效防止草酸鈣泌尿道結石的藥草。雖然目前無法證明，不過我們認為澤瀉可能是其有效成分，能造成減少晶體沉積，豬苓湯抗結石的機制可能涉及大分子的抑制物質與草酸的代謝途徑，我們應該進行更多的研究來澄清這一點。

在這項研究中，我們發現安慰劑組在實驗結束時，發生了以體重增加較為緩慢作為表現的生長遲緩。奇怪的是，這種現象並未發生在豬苓湯飼養的大鼠(group 3 和 4)，因此我們認為給予豬苓湯似乎是一個保護因素。

第二節、實驗的限制

關於本實驗的限制，有四個方面：第一個是動物實驗模型的限制，我們使用了乙二醇(ethylene glycol, EG)來誘導草酸鈣結石，然而如同前面提到其實有許多誘導結石的方法，但是這些方式所誘導的結石和人體

所形成的結石還是有所不同的，所以將來應用到人體時還是會有所差異的。第二個是動物實驗個數的限制，本實驗以申請國科會計畫的方式來進行動物實驗，所以國科會給予我們同一批固定數量的大鼠，因此考慮大鼠的品系、成長環境等客觀條件不可能一致，於是無法再增加實驗個數。第三個是藥廠藥物來源的限制，即便我們已提供豬苓湯甲醇萃取液的高壓液相層析法(HPLC)色彩層析譜數據，但是之後藥廠的藥物來源、製藥過程、餵食所用豬苓湯的製備過程和我們使用的豬苓湯還是有可能有些微的不同。第四個是「結晶沉積指數」(crystal deposition index)評分方式的限制，畢竟半定量的方式仍然存在著人為主觀的差異，結石的分佈和視野的選擇都會影響評分，因此評分方式亦是本實驗的限制。

第三節、結論

總而言之，豬苓湯可以減低草酸鈣結晶的嚴重度和避免體重增加較為緩慢的效果。因此，傳統中醫方劑豬苓湯可能是一種有效預防腎臟結石的藥物。雖然，我們對豬苓湯抑制結晶的機制仍不清楚，推測其中大分子可能也有參與。因此，未來希望可以一方面進行臨床實驗，證實豬苓湯應用在人體上一樣有預防腎臟結石的作用，進而幫住病患解決身上的痛苦，畢竟這是身為醫師的天職，也是我們最終的目的。另一方面我們可以進行蛋白質體學(proteomics)的研究，包括二維電泳(two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, 2D-PAGE)，基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀(matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight, MALDI-TOF)，蛋白質轉印及免疫染色法或酵素免疫染色，干擾性核糖核酸(RNA Interference; RNAi).....等等，以期能對結石的病理生理機制有更透徹的瞭解。

參考文獻

1. Stamatelou KK, Francis ME, Jones CA, Nyberg LM, Curhan GC. Time trends in reported prevalence of kidney stones in the United States: 1976-1994. *Kidney International*. 2003;63:1817-1823.
2. Barbas C, Garcia A, Saavedra L, Muros M. Urinary analysis of nephrolithiasis markers. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical & Life Sciences*. 2002;781:433-455.
3. Mani M, Martin IR. Urinary lithiasis: etiology, diagnosis, and medical management. In: *Campbell's Urology (8/e)*. New York: Elsevier Science Publishing Co., Inc.; 2002; pp. 3229-3305.
4. Lee YH, Huang WC, Tsai JY, Lu CM, Chen WC, Lee MH, Hsu HS, Huang J-K, Chang LS. Epidemiological studies on the prevalence of upper urinary calculi in Taiwan. *Urologia Internationalis*. 2002;68:172-177.
5. Uribarri J, Oh MS, Carroll HJ. The first kidney stone. *Annals of Internal Medicine*. 1989;111:1006-1009.
6. Ljunghall S, Danielson BG. A prospective study of renal stone recurrences. *British Journal of Urology*. 1984;56:122-124.
7. 李瀛輝、黃榮慶、陳明村、張心湜. 性別與年齡在上尿路結石流行病學所扮演之角色. *中華民國泌尿科醫學會雜誌*. 1992;3:824-830.
8. 李瀛輝、張心湜、陳明村、黃榮慶. 台灣南部地區尿路結石流行病學之研究. *中華民國泌尿科醫學會雜誌*. 1994;5:1-7.
9. Chandhoke PS. When is medical prophylaxis cost-effective for recurrent calcium stones? *Journal of Urology*. 2002;168:937-940.
10. WR R. The economics of urinary stone management. In: Borghi L MT, Briganti A, Schianchi T and Novarini A, ed. *Kidney Stones*, 8th European Symposium on Urolithiasis, Parma, Italy; 1999.
11. Strohmaier WL HM. Economic aspect of urolithiasis and metaphylaxis in Germany. In: Rodgers AL HB, Hess B, Khan SR and

- Preminger GM, ed. Urolithiasis. University of Cape Town, Cape Town; 2000.
12. Marshall L DM. Urinary stone disease. In: Smith's general urology. United States of America: Eds Emil AT and Jack WM, McGraw-Hill Co., Inc.; 2000;pp.291-320.
 13. 陳育正：五苓散對於體外草酸鈣結石模型和大鼠草酸鈣結石模型的抑制作用 碩士論文，中國醫藥大學中國醫學研究所，台中 2006；pp. 58.
 14. 孫偉，周棟，高坤. 對中醫古文獻記載淋證的歷史沿革追溯. 中醫藥學刊. 2006;24:14.
 15. 李敏，王靜. 淋證溯源. 陝西中醫學院學報. 2006;29:12.
 16. 淋證的歷史源流
<http://www.zgxl.net/SLJK/ybjb/miniao/linzheng.htm>.
 17. 單書健、陳子華. 古今名醫臨証金鑒·淋証癰閉卷. 北京：中國中醫藥出版社；1999.
 18. Lewandowski S, Rodgers AL. Idiopathic calcium oxalate urolithiasis: risk factors and conservative treatment. Clinica Chimica Acta. 2004;345:17-34.
 19. Robertson WG, Peacock M. The cause of idiopathic calcium stone disease: hypercalciuria or hyperoxaluria? Nephron. 1980;26:105-110.
 20. Coe FL. Hyperuricosuric calcium oxalate nephrolithiasis. Kidney International. 1978;13:418-426.
 21. Ettinger B. Allopurinol for treatment of uric acid and calcium calculi. In: Pharmacological Treatment of Endocrinopathies. 1991:16-36.
 22. Curhan GC, Willett WC, Rimm EB, Stampfer MJ. A prospective study of dietary calcium and other nutrients and the risk of symptomatic kidney stones. New England Journal of Medicine. 1993;328:833-838.
 23. Wahl C, Hess B. [Kidney calculi--is nutrition a trigger or treatment?]. Therapeutische Umschau. 2000;57:138-145.

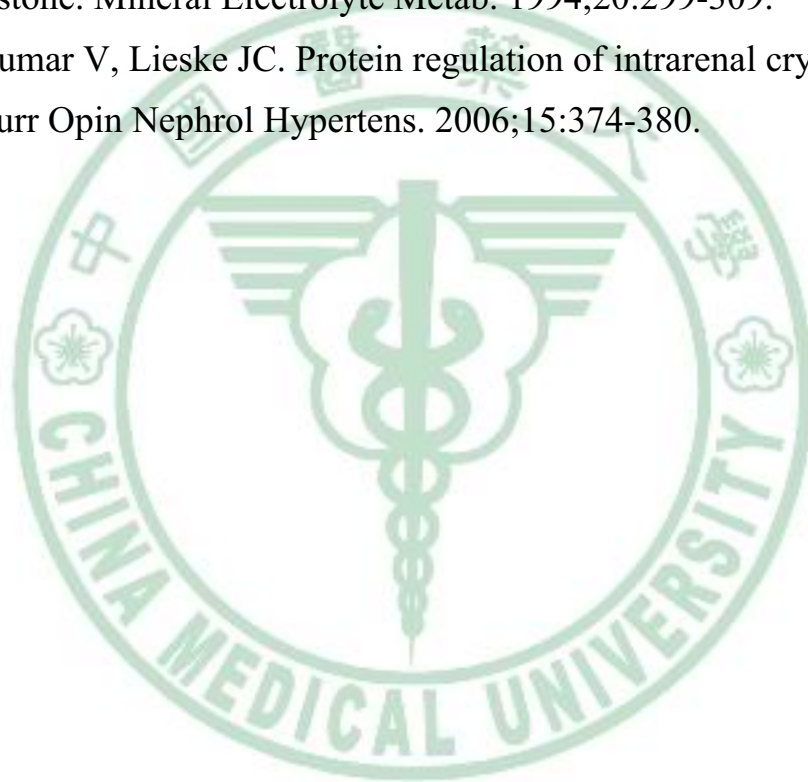
24. Marangella M, Vitale C, Petrarulo M, Bagnis C, Bruno M, Ramello A. Renal stones: from metabolic to physicochemical abnormalities. How useful are inhibitors? *Journal of Nephrology*. 2000;13 Suppl 3:51-60.
25. Bihl G, Meyers A. Recurrent renal stone disease—advances in pathogenesis and clinical management. *Lancet*. 2001;358:651-656.
26. Wilson DM. Clinical and laboratory approaches for evaluation of nephrolithiasis. *Journal of Urology*. 1989;141:770-774.
27. 李瀛輝、陳明村、張心湜. 尿路結石. 臺北: 九州圖書文物有限公司; 1980.
28. 吳靖方, 陳志碩校閱. 十問泌尿道結石—您不可不知的基本常識 <http://www.cgmh.org.tw/new1/new9007-106.htm>
29. Chaussy C SJ, Schmiedt E, Brandl H, Jocham D, Liedl B. Extracorporeal shock wave lithotripsy for treatment of urolithiasis. *Urology*. 1984;23:59-66.
30. 孫光煥、于大雄. 尿路結石之治療最新發展. 臺北: 九州圖書文物有限公司; 1996;pp. 13-67.
31. Kishimoto T, Yamamoto K, Sugimoto T, Yoshihara H, Maekawa M. Side effects of extracorporeal shock-wave exposure in patients treated by extracorporeal shock-wave lithotripsy for upper urinary tract stone. *European Urology*. 1986;12:308-313.
32. Begun FP, Knoll CE, Gottlieb M, Lawson RK. Chronic effects of focused electrohydraulic shock waves on renal function and hypertension. *Journal of Urology*. 1991;145:635-639.
33. Ruml LA, Pearle MS, Pak CY. Medical therapy, calcium oxalate urolithiasis. *Urologic Clinics of North America*. 1997;24:117-133.
34. Yasui T, Fujita K, Sato M, Sugimoto M, Iguchi M, Nomura S, Kohri K. The effect of takusha, a kampo medicine, on renal stone formation and osteopontin expression in a rat urolithiasis model. *Urological Research*. 1999;27:194-199.
35. Suzuki K, Kawamura K, Tsugawa R. Formation and growth inhibition

- of calcium oxalate crystals by takusha(*Alismatis rhizoma*). *Scanning Microscopy*. 1999;13:183-189.
36. Liu QL, Sato S, Kishikawa T, Matsuzaki H, Yamanaka N. Effectiveness of a traditional Chinese medicine, Wulingsan, in suppressing the development of nephrocalcinosis induced by a high phosphorus diet in young rats. *Medical Electron Microscopy*. 2001;34:103-114.
 37. Yoshimura K, Miyake O, Okuyama A, Yoshioka T, Honda M, Yamaguchi S, Koide T. [Effect of chorei-to and gorei-san on calcium oxalate crystallization in human urine]. *Hinyokika Kyo - Acta Urologica Japonica*. 1998;44:13-16.
 38. Chen YC, Ho CY, Chen LD, Hsu SF, Chen WC. Wu-Ling-San formula inhibits the crystallization of calcium oxalate in vitro. *American Journal of Chinese Medicine*. 2007;35:533-541.
 39. Tsai CH, Chen YC, Chen LD, Pan TC, Ho CY, Lai MT, Tsai FJ, Chen WC. A traditional Chinese herbal antilithic formula, Wulingsan, effectively prevents the renal deposition of calcium oxalate crystal in ethylene glycol-fed rats. *Urological Research*. 2008;36:17-24.
 40. Atmani F, Khan SR. Effects of an extract from *Herniaria hirsuta* on calcium oxalate crystallization in vitro. *BJU International*. 2000;85:621-625.
 41. Freitas AM, Schor N, Boim MA. The effect of *Phyllanthus niruri* on urinary inhibitors of calcium oxalate crystallization and other factors associated with renal stone formation. *BJU International*. 2002;89:829-834.
 42. Joshia VS, Parekha BB, Joshia MJ, Vaidyaba AB. Herbal extracts of *Tribulus terrestris* and *Bergenia ligulata* inhibit growth of calcium oxalate monohydrate crystals in vitro. *Journal of Crystal Growth*. 2005;275:1403-1408.
 43. Dasa I, Gupta SK, Ansaria SA, Pandey VN, Rastogi RP. In vitro

- inhibition and dissolution of calciumoxalate by edible plant
Trianthema monogyna and pulse Macrotyloma uniflorum extracts.
Journal of Crystal Growth. 2005;273:546-554.
44. 譚思濉、陳玉芳、柯毅文、蔡輝彥. 二金排石湯對於實驗性動物膀胱結石之研究. Chinese Medical Journal (Taipei). 2004;15:17-29.
 45. 錢峻. 豬苓湯證治療研究概況. 吉林中醫藥. 1997.
 46. 熊曼琪. 傷寒論. 北京: 人民衛生出版社; 2000;pp.487-656.
 47. 陳紀藩. 金匱要略. 北京: 人民衛生出版社; 2000;pp. 76.
 48. 陳明. 豬苓湯證 106 例驗案統計分析. 中國醫藥學報. 1998;13:29-32.
 49. 谷巖芳、候亞文. 豬苓湯證證治規律的研究. 古今中外醫案 119 例統計分析. 實用中醫內科雜誌. 1991;5:4-17.
 50. 張清苓. 豬苓湯證之研究 61 例臨床驗案統計分析. 北京中醫學院學報. 1992;15:14-16.
 51. 錢峻. 豬苓湯證治療研究概況. 吉林中醫藥. 1997;5:42-43.
 52. Khan SR. Interactions between stone-forming calcific crystals and macromolecules. Urologia Internationalis. 1997;59:59-71.
 53. Nelde HJ, Bichler KH, Strohmaier WL, Kriz W. Nephrolithiasis in the kidney of the rat on atherogenic diet and the effect of calcium antagonists(Nifedipine). In: Nephrocalcinosis calcium antagonists and kidney. Berlin: Springer-Verlag; 1988;pp 113-125.
 54. 沈明來. 實用無母數統計學與計數資料分析. 臺北: 九州圖書文物有限公司; 1997;pp. 1-214.
 55. Halabe A SR, Wong NLM, Sutton RAL. Effect of vitamin D3 on the conversion of ethylene glycol to glycolate and oxalate in ethylene glycol-fed rats. Clin Chim Acta. 2003;330:135-139.
 56. Lee Y, Tsai J, Huang J. Combined use of 30% lactose rich diet and 1% ethylene glycol: a new animal model for study of urolithiasis. J Urol ROC. 2000:149-154.
 57. Hennequin C, Tardivel S, Medetognon J, Druke T, Daudon M,

- Lacour B. A stable animal model of diet-induced calcium oxalate crystalluria. *Urological Research*. 1998;26:57-63.
58. Lee Y, Chang L, Chen M. Characterization of ethylene glycol induced urolithiasis model in rats. *J Urol ROC*. 1991;2:518-524.
59. Lee YH, Huang WC, Chiang H, Chen MT, Huang JK, Chang LS. Determinant role of testosterone in the pathogenesis of urolithiasis in rats. *Journal of Urology*. 1992;147:1134-1138.
60. Khan SR, Glenton PA, Byer KJ. Modeling of hyperoxaluric calcium oxalate nephrolithiasis: experimental induction of hyperoxaluria by hydroxy-L-proline. *Kidney International*. 2006;70:914-923.
61. Wang JH, Wang SY, Shi TL, Zhang CR, Xu H, Lai Z, Geng XY. Study on the mechanism of Zhuling decoction on refraining the formation of calculus of kidney. *Hunan Guiding Journal of TCM*. 2004;10:80-82.
62. Wang S, Deng C, Shi Z. Influence of rhizome *Alismatis* on inhibition of renal stone formation. *J of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine*. 2003;20:294-296.
63. Cao Z, Liu J, Zhou S. Effect of *Alisma orientalis* extract on renal stone formation and the expression of inter-alpha-trypsin inhibitor in rat urolithiasis model. *Chin J Exp Surg*. 2004;21:295-297.
64. Zhou X, Yin R, Ruan H, Zhang Y, Pi H, Zhao X, Wu J. Analysis of active ingredients in *Alisma orientalis* (Sam.) Juzé extract for inhibiting formation of urinary oxalate calcium calculi by 2D NMR. *Chinese J of Magnetic Resonance*. 2005;22:196-200.
65. 賴真、耿小茵、王耀幫、石之、張阮章、王沙燕. 腎結石大鼠 Osteopontin mRNA 的表達及豬苓湯和澤瀉對其表達的影響. *Journal of Chinese Physicia*. 2005;7:452-453.
66. Grover PK, Moritz R, Simpson RJ, Ryall RL. Inhibition of growth and aggregation of calcium oxalate crystals in vitro: a comparison of four human proteins. *Eur J Biochem*. 1998;253:637-644.

67. Asplin JR, Arsenault D, Parks JH, et al. Contribution of human uropontin to inhibition of calcium oxalate crystallization. *Kidney International*. 1998;53:194-199.
68. Enghild JJ, Thorgersen IB, Cheng F, et al. Organization of the inter-alpha-inhibitor heavy chains on the chondroitin sulfate originating from ser10 of bikunin: posttranslational modification of IaI-derived bikunin. *Biochemistry*. 1999;38:11804-11813.
69. Stapleton AMF, Ryall RL. Crystal matrix protein: getting blood out of a stone. *Mineral Electrolyte Metab*. 1994;20:299-309.
70. Kumar V, Lieske JC. Protein regulation of intrarenal crystallization. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2006;15:374-380.



**Prophylaxis of Calcium Oxalate Stones by Zhulingtang on
Experimentally induced Nephrolithiasis in Rats**

Tien-Chien Pan

Major professor : Wen-Chi Chen

**Graduate institute of Chinese Medical Science,
China Medical University**

Zhulingtang (ZLT), a traditional Chinese medicine (TCM) formula, was used to evaluate the antilithic effects of experimentally induced calcium oxalate (CaOx) nephrolithiasis in ethylene glycol-fed rats. A total of 35 male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into four groups: normal control, placebo, low dose ZLT and high dose ZLT group.. The severities of crystal deposition were significantly reduced in the two ZLT-fed groups compared with the placebo group. Rats in the low dose ZLT and placebo groups exhibited significantly lower serum phosphorus in comparison with the rats of control. Rats of placebo group encountered growth retardation, in which the body weights were slowly increased. Our Conclusion is that ZLT reduced the severity of CaOx crystallization and slowdown the body weight loss effects. Therefore, the TCM herbal formula ZLT may be an effective reagent for renal stone prophylaxis. Although, the mechanism of ZLT on crystal inhibition remains unclear, the macromolecules may be involved.

Keywords : Calcium oxalate, Ethylene glycol, Traditional Chinese medicine, Zhulingtang

謝 辭

回首這兩年的時間似乎一眨眼就過去(除了最後趕論文的時候覺得度日如年之外)，在研究所的老師、同學和前輩的教導下，獲得了許多寶貴的知識和經驗，也對中醫的科學研究開始跨出了一小步，當然這也是我當初來念研究所的目的。雖然短短的兩年所能做的成果不多，不過而未來要走的路途還很長遠，希望往後我有毅力及機會和有志者一同為中醫的未來而努力。

兩年來，因為許多人的幫助，才能順利地完成實驗和學業，在此由衷感激你們：感謝爸媽多年的養育讓我有機會來念研究所；感謝何建宜在我進研究所之前給了我許多的方向和幫忙，否則可能不會有這個碩士學位。感謝陳育正在實驗初期傳承寶貴的經驗，還有在論文的內容上提供許多參考資料，讓我在實驗和論文上節省許多心力。感謝喬惠一路在實驗上的大力幫忙和指導，辛苦地聯絡大小事，也預祝你碩士順利畢業。雖然相處只有短短的時光，還是要感謝堅忍在實驗上的幫助。感謝林維勇博士不時傳授我這個實驗門外漢許多知識，並且屢屢在成績上扮演讓我拿高分甚至是獎學金的推手，真是感激不盡。感謝蔡宙晃學長一直在實驗和投稿的進度上帶領我向前，更在統計和程式上提供許多資源，在此也祝福你早日拿到博士學位。感謝陳汶吉老師實驗室的同仁們在各方面的協助。感謝賴銘淙老師在病理切片上的細心教導。感謝陳悅生老師在論文格式上的指導。感謝醫院的所有同仁在這兩年來愉快的相處和協助，讓我在唸書的過程無後顧之憂。感謝研究所的文晴、如芳、所有老師和同學，讓我覺得這兩年的碩士研究生涯是很值得的。特別感謝我即將臨盆的老婆淑眉，這一路上的陪伴和支持，讓我更有動力去完成學業。另外，承蒙彭爾康先生獎學金之贊助，得以完成此論文。

最後要特別感謝我的指導老師—陳汶吉教授的用心指導實驗進行和論文寫作，讓我獲益良多。更重要的是老師以身教和言教教導我許多除了學業以外的事，樹立一個身為中醫人的榜樣，不管在品德、工作和學術上都是值得我效法的對象，也希望往後的日子有機會能在老師的帶領下，一起為發揚中醫而奮鬥。