

中國醫藥大學中國醫學研究所博士論文

指導教授：陳汶吉 教授

共同指導教授：蔡輔仁 教授

論文題目

五苓散預防草酸鈣腎結石之探討

—實驗誘發大鼠腎結石模式及蛋白質體學研究

**Studies of antilithic effects of Wulingsan on
calcium oxalate stones -- an experimental
induced-nephrocalcinosis rat model and
proteomics research**

研究生：蔡宙晃

中華民國九十八年七月

目 錄

第一章 前言

- 1-1 研究動機與目的.....1
- 1-2 研究背景.....1
- 1-3 五苓散相關藥物的先期研究成果.....2

第二章 文獻探討

- 2-1 傳統中醫學的泌尿道結石.....3
- 2-2 五苓散治療石淋文獻記載.....5
- 2-3 泌尿道結石傳統處置摘要.....6
- 2-4 五苓散的歷史源流考據.....7
- 2-5 植物藥治療泌尿道結石文獻回顧.....10
- 2-6 尿路結石流行病.....10
 - 2-6-1 尿路結石概觀.....10
 - 2-6-2 尿路結石分類及成因.....11
- 2-7 尿路治療結石現況.....12
 - 2-7-1 臨床症狀.....12
 - 2-7-2 外科治療方法.....13
 - 2-7-3 尿路結石的預防與保守治療方法.....14
- 2-8 尿路結石的成因探討.....15
 - 2-8-1 尿路結石的形成過程.....15
 - 2-8-2 高鈣尿症與腎結石.....17
 - 2-8-3 草酸與尿路結石的關聯.....17
- 2-9 尿路結石的其它可能成因.....20
- 2-10 腎結石動物實驗模式文獻回顧.....22
 - 2-10-1 常見的動物模式.....22
 - 2-10-2 乙二醇誘導成石的機轉.....23
 - 2-10-3 成石率計算與結晶之評分標準.....23
 - 2-10-4 其它誘導腎結石的方法.....24

2-11 文獻回顧總結.....	24
第三章 材料與方法	
3-1 實驗流程.....	25
3-2 實驗動物.....	26
3-3 動物分組與藥物灌食.....	26
3-4 五苓散萃取液的製備.....	27
3-4-1 五苓散藥物組成.....	27
3-4-2 五苓散萃取液的製備流程.....	27
3-5 五苓散指紋圖譜分析方法.....	27
3-5-1 檢品溶液配製.....	28
3-5-2 高效液相層析儀分析條件.....	28
3-6 動物處置.....	29
3-7 血清尿液分析.....	30
3-7-1 二十四小時尿液收集.....	30
3-7-2 血液採集.....	30
3-8 結晶沉澱嚴重度評分.....	30
3-8-1 結晶沉澱嚴重度評分標準.....	31
3-8-2 腎臟切片拍攝成數位化圖片.....	32
3-8-3 成石率計算方式.....	32
3-9 圖片瀏覽評分輔助程式.....	32
3-10 資料統計分析.....	33
3-11 蛋白質體學研究流程.....	34
3-12 鼠腎樣本製備.....	35
3-12-1 鼠腎樣本挑選.....	35
3-12-2 組織研磨.....	35
3-12-3 丙酮沉殿.....	36
3-13 蛋白質定量步驟.....	36
3-14 等電點聚焦凝膠電泳.....	37
3-15 SDS-PAGE第二次元電泳.....	39
3-15-1 SDS膠片調配方法.....	39

3-15-2 第二次元電泳過程.....	39
3-15-3 第二次元電泳條件設定.....	40
3-16 膠體染色.....	40
3-17 膠體影像擷取與分析.....	41
3-17-1 膠體影像擷取.....	41
3-17-2 膠體影像分析與蛋白質點比對.....	42
3-18 膠體內蛋白酶水解.....	43
3-19 質譜儀分析.....	45
3-20 蛋白質身份鑑定網路資料庫比對.....	46
第四章 結果	
4-1 實驗前後的血液、尿液數據變化.....	50
4-2 實驗前後的體重變化.....	52
4-3 腎臟病理變化.....	53
4-4 腎結晶嚴重度評分結果.....	54
4-5 結石發生率與相對危險性分析.....	55
4-6 蛋白質比對結果.....	56
第五章 討論	
5-1 五苓散治療腎結石的機轉探討.....	62
5-2 蛋白質扮演的角色.....	64
5-2-1 本研究發現的蛋白質.....	64
5-2-2 蛋白質與腎結石關聯探討.....	65
5-3 五苓散讓大鼠體重增加維持正常.....	67
5-4 五苓散對於大鼠血液尿液的影響.....	67
5-5 動物實驗模式探討.....	69
5-6 圖片瀏覽程式可有效簡化統計分析工作.....	69
5-7 檢討改進與未來展望.....	70
第六章 結論	71
參考文獻	72
英文摘要	81
謝詞	83

圖目錄

圖 2.1	Peroxisome 內的 AGT 缺陷.....	19
圖 3.1	實驗流程.....	25
圖 3.2	五苓散色層分析指紋圖譜.....	29
圖3.3A	結晶嚴重度給分標準1+.....	31
圖3.3B	結晶嚴重度給分標準2+.....	31
圖3.3C	結晶嚴重度給分標準3+.....	31
圖 3.4	腎臟切片分區示意圖.....	32
圖 3.5	圖片瀏覽輔助軟體 (ImageScoring) 評分執行畫面.....	33
圖 3.6	蛋白質體學研究流程.....	34
圖 3.7	Bio-Rad Protean IEF cell 電泳儀.....	37
圖 3.8	掃描器 Bio-Rad GS-800 Image Densitometer.....	41
圖 3.9	PDQuest 2-D Analysis Software.....	42
圖 3.10	Brucker ultraflex III mass spectrometer.....	45
圖 3.11	MASCOT 網路資料庫搜尋界面.....	46
圖 3.12	Mascot Wizard 簡易版搜尋界面.....	47
圖 3.13	PIDWizard 執行畫面.....	48
圖 3.14	MascotWizard 與 PIDWizard 整合示意圖.....	49
圖 3.15	PIDWizard 搜尋 Bovine serum albumin 傳回結果.....	49
圖 4.1	草酸鈣結晶呈現雙折射特徵.....	53
圖 4.2	結晶阻塞腎小管.....	53
圖 4.3	腎小管上皮細胞損傷發炎.....	53
圖 4.4	吞噬細胞包圍結晶體.....	53
圖 4.5	AGT2 網路資料庫比對結果.....	56
圖 4.6	AGT2 膠片比對圖.....	57
圖 4.7	AGT2 在膠片上位置.....	57
圖 4.8	正常組與安慰劑組腎臟 AGT2 的 mRNA 定量比較圖.....	58
圖 5.1	AGT 催化反應.....	64

表 目 錄

表 3.1	動物分組與餵食分配.....	26
表 3.2	五苓散高效液相層析儀分析條件設定.....	28
表 3.3	進行蛋白質體學研究之鼠腎樣本.....	35
表 3.4	IEF電泳儀條件設定.....	38
表 3.5	SDS-PAGE gel配製方法.....	39
表 3.6	蛋白酶水解使用試劑.....	44
表 4.1	實驗開始前大鼠的血液生化尿液數據.....	50
表 4.2	實驗後大鼠的血液生化尿液數據變化.....	51
表 4.3	五苓散對於大鼠體重及腎臟重量的影響.....	52
表 4.4	腎結晶嚴重度評分結果.....	54
表 4.5	大鼠腎結石發生率與相對危險性分析.....	55
表 4.6	蛋白質鑑定結果(對照組).....	59
表 4.7	蛋白質鑑定結果(第二組 安慰劑+EG).....	60
表 4.8	蛋白質鑑定結果(五苓散+EG).....	61

五苓散預防草酸鈣腎結石之探討—實驗誘發大鼠腎結石模式及蛋白質體學研究

單 位：中國醫藥大學中國醫學研究所

指 導 教 授：陳汶吉教授

共同指導教授：蔡輔仁教授

研 究 生：蔡宙晃

中 文 摘 要

泌尿道結石在台灣名列十大常見疾病之一，處理結石耗費龐大的醫療資源與支出，因此，本研究希望能找到一種有效的替代治療方法。

本研究探討中藥方劑—五苓散，對於乙二醇所誘發大鼠腎結石的預防治療效果，並使用蛋白質體學方法探索相關之蛋白質。

實驗目的乃是希望從分子生物學層面，探討腎結石致病機轉；並且評估五苓散在動物體內的結石預防效果。

四十一隻 Sprague-Dawley 品系雄性大鼠分成四組：對照組接受正常食物及飲水，另外三組接受 0.75% 乙二醇飲水誘發腎結石，其中安慰劑組接受管灌澱粉，而另外兩個藥物組分別接受 375 mg/kg 或 1125 mg/kg 不同劑量的五苓散餵食。

實驗四週後，處死動物，分析血液、尿液，摘取腎藏，並評估體重變化，檢視腎臟病理變化，針對結晶沉澱嚴重度給予客觀評分。結晶嚴重度之評分，係採用光學偏光顯微鏡分區拍攝腎臟切片，再輔以自行研發的圖片瀏覽軟體，隨機匿名顯示圖片；並採用「半定量計分方式」由六位評分者獨立給分，最後統計分析各組之差異。

選取各組具代表性的鼠腎樣本，經過研磨製備萃取，進行第一維等電點聚焦電泳分離，再經第二維 SDS-PAGE 凝膠電泳。使用 PDQuest 程式比對膠片蛋白質點，挖取差異較大者進行胰蛋白酶水解，並送入 MALDI-TOF 質譜儀分析胜肽片段。蛋白質身份鑑定，則使用 BioTools 軟體並連線 MASCOT 搜尋網站，與各大序列資料庫連線比對確認身份。

結果顯示，安慰劑組大鼠的體重增加遲緩，而餵食五苓散的兩組體

重增加情況與正常對照組相似。飲用乙二醇水的大鼠腎臟組織切片，可發現明顯的腎小管破壞、損傷或發炎反應。餵食五苓散後大鼠腎臟內結晶情況顯著地減輕，結晶評分之平均值，低劑量組是 0.46，高劑量組是 0.45，相較於安慰組的 1.40，顯著地較低($p=0.034$, Kruskal-Wallis test)。

實驗後血清尿液變化顯示，血清鈣濃度四組並無不同，但是血清游離鈣濃度，在接受五苓散餵食兩組大鼠都明顯地低於安慰劑組 ($p=0.001$)，低劑量組是 0.91 ± 0.07 mmol/L，高劑量組是 0.94 ± 0.17 mmol/L，而安慰劑組則是 1.10 ± 0.06 mmol/L。安慰劑組的血磷值是 9.45 ± 2.26 mg/dl，明顯低於正常對照組的 12.54 ± 1.25 mg/dl ($p=0.015$)。餵食五苓散的兩組大鼠血液酸鹼值(pH)也明顯地低於安慰劑組，分別是低劑量組的 6.96 ± 0.07 ，高劑量組的 6.96 ± 0.17 ，而安慰劑組是 7.13 ± 0.09 ($p=0.006$)。五苓散高劑量組大鼠的尿磷值是 19.36 ± 2.59 mg/dl，明顯地低於正常對照組的 20.98 ± 1.12 mg/dl ($p=0.021$)。

在安慰劑組大鼠腎臟內發現 AGT2 (丙氨酸乙醛酸轉氨酶; Alanine-glyoxylate aminotransferase 2; EC 2.6.1.44)蛋白質的存在，其 mRNA 表現量明顯地高於正常組，達 2.69 倍($p<0.05$)。

本研究獲得結論如下：餵食五苓散可以減輕大鼠腎臟草酸鈣結晶嚴重程度，而罹患腎結石的危險性也相對較低，因此五苓散的確是一個預防腎結石的有效方劑。目前，五苓散的抑制結石機轉尚未明瞭，推測存在於尿液或腎臟內的蛋白質應該扮演著重要角色。從質譜儀蛋白質身份鑑定結果，發現蛋白質 Alanine-glyoxylate aminotransferase 2 的存在，推測應該和乙二醇解毒功能有關。

(關鍵字：尿路結石，草酸鈣，五苓散，乙二醇，蛋白質體學)

第一章 前言

1.1 研究動機與目的

本研究的目的，在探討傳統中藥方劑—五苓散，使用在乙二醇誘發大鼠腎結石的預防治療效果，並運用蛋白質體學方法探索相關之蛋白質。希望能從分子生物學層面，探討腎結石致病機轉，進一步評估五苓散在動物體內的結石預防效果，更期待能有效應用於人體，為腎結石的治療有所貢獻。

1.2 研究背景

泌尿道結石在台灣是一種常見的疾病，是目前台灣十大常見疾病之一。根據健保資料顯示，治療尿路結石所造成的花費極高，處理結石所耗費的相關醫療支出，也名列前 20 大支出項目之內[1]。據估計，處理泌尿道結石的醫療花費每年高達 100 億新臺幣，佔全部健康保險醫療支出百分之四以上[1, 2]。

在台灣，上泌尿道結石的總體盛行率是 9.6%，其中男性盛行率是 14.5%，而女性是 3.5%[3]。此一好發情況，高於我們的鄰國，如韓國(3.5%)及日本(1%)[3-8]。在台灣接受震波碎石術治療者，每年超過壹萬人次[1]。如果，從醫療資源耗用觀點來看，在兩千三百萬人口，面積 35,801 平方公里的台灣境內，即擁有超過 130 臺的體外震波碎石機[2, 9, 10]。換言之，在台灣每百萬人口就擁有一台體外震波碎石機[11]。

我們身處在這一結石盛行率極高的區域，而處理此疾病又如此耗費醫療資源。因此，如果能找出一種預防結石的有效替代療法，將更是意義重大，本研究即肇因於此。

1.3 五苓散相關藥物的先期研究成果

我們的研究團隊針對五苓散相關藥物，所進行的先期研究，也證實：五苓散在體外實驗中，可以有效的抑制草酸鈣的「成核」(nucleation)、「結晶」(crystallization)及「聚集」(aggregation)反應[12, 13]。從研究中發現，五苓散萃取液可藉由抑制草酸鈣結晶核心形成，以及抑制晶體彼此聚集的作用機轉，來達到抑制作用。經由分光光度計分析結果發現，五苓散萃取液濃度達到6.25mg/ml以上時，即可明顯抑制結晶之成核作用(nucleation)，並呈現劑量正相關效應(dose-dependent)。而在其濃度達到3.125mg/ml以上時，也可以明顯抑制晶體之聚集現象(aggregation)，同樣也存在著劑量正相關的效應關係(dose-dependent)。

五苓散此方，自從東漢《傷寒論》一書記載以來，延用迄今已超過兩千年仍未被淘汰，可見其具備臨床療效[14]。明清醫家運用此方治療「石淋」之症，更可讓砂石從病患尿液中排出。

五苓散的組成藥物，有多種已被證實確實具有治療結石的功效[15-18]。不過，從我們先期研究也發現到，個別的組成藥物在體外實驗中的結晶抑制效果，卻不如五苓散配方來得好。因此，本次研究我們使用方劑進行活體內的效果探討，希望瞭解五苓散在動物體內的腎結石治療效果，並進一步探討腎臟內所發生的蛋白質變化情況。

在本次實驗中，我們運用飲水添加乙二醇的動物模式誘發大鼠腎結石，評估五苓散在動物體內的治療效果[19-21]。分析血清、尿液等生化數據並評估體重變化，檢視腎臟病理變化，並針對結晶沉澱嚴重度給予客觀評分。並採用蛋白質體學方法，二維膠體電泳分離蛋白質，質譜儀分析胜肽片段，以及網路資料庫蛋白質身份比對鑑定等方法，分析腎臟內蛋白質之變化，期待能藉此解開腎結石成因之謎。

第二章 文獻探討

本章首先探討，中國醫學古籍對於泌尿道結石的觀察與治療，深入考察「石淋」、「砂淋」、「五苓散」等議題。其次，簡介泌尿道結石之臨床症狀與治療近況，探討腎結石成因與致病機轉，以及蛋白質所可能扮演的角色。最後，回顧各種腎結石動物實驗模式之優缺點。

2.1 傳統中醫學的泌尿道結石

傳統中國醫學(traditional Chinese medicine; TCM)文獻所謂的「石淋」、「砂淋」等症，即是現代西方醫學的泌尿道結石疾病(urinary stone disease)[18]。「石淋」發病症狀包括：(一)、尿中排出結石，如《臨證指南醫案》所述：「砂淋為病，陰莖中有砂石而痛，溺不得卒出，砂出痛止是也。」(二)、尿道疼痛、小便困難、小腹疼痛、頻尿。如《外臺祕要》所述：「石淋之為病，小便莖中痛，尿不得卒出，時自出，痛引少腹，膀胱裡急」。

考察古籍文獻得知，「石淋」一詞最早應該出現於隋唐時期，如隋朝，巢元方著《諸病源候論》中敘述：「因黃發病後小便澀兼石淋候黃病後，小便澀，兼石淋，發黃疸，此皆由蓄熱所為。熱流小腸，小便澀少而痛，下物如沙石也。」；又如唐朝，孫思邈所著《千金翼方》中敘述：「尿白微寒，主消渴傷寒寒熱破石淋及轉筋，利小便，止遺溺，滅癥痕。」等。而對於石淋此病，古代醫家治療的方法很多，包括植物藥、動物藥、方劑或針灸等，其中使用五苓散來治療石淋的確切記載，始於西元 16 世紀的明朝，王肯堂著作的《女科證治準繩》書中。以下依照年代順序，條列出本研究考察所得文獻，以供參考。

隋

《諸病源候論·巢元方》：「因黃發病後小便澀兼石淋候黃病後，小便澀，兼石淋，發黃疸，比皆由蓄熱所為。熱流小腸，小便澀少而痛，下物如沙石也。」

唐

《千金翼方·孫思邈》：

「石龍子味鹹寒有小毒，主五癰邪結氣，破石淋下血，利小便，利水道，一名蜥蜴，一名山龍子，一名守宮，一名石蜴，生平陽川谷及荆山山石。」

「石蚕味鹹寒有毒，主五癰，破石淋墮胎。」

「治石淋方，車前子貳升，絹袋貯，以水捌升，煮取參升，頓服之，須更當下石子，宿勿食，服之良。」

「石淋，臍下三十六種疾不得小便，灸關元三十壯（一云百壯）。」

「桃膠主下石淋，破血中惡疰忤，花主下惡氣消腫滿利大小腸。」

宋

《太平惠民和劑局方》「砂淋、熱淋，小便出血，同車前草七葉、生薑小塊研爛，水調去渣，嚼藥一錠，以水送下。」

明

《女科證治準繩·王肯堂》「五苓散，治膀胱有熱水道不通，淋瀝不出，或尿如豆汁，或成砂石，或如膏汁，或熱沸便血。」

清

《臨證指南醫案·葉天士》

「砂淋為病，陰莖中有砂石而痛，溺不得卒出，砂出痛止是也。」

《醫方集解·汪昂》

「琥珀散〔濕熱諸淋〕治氣淋、血淋、膏淋、砂淋、心腎氣鬱，清濁相干，熱蓄膀胱，溺澀而痛曰淋，氣淋便澀餘瀝，血淋尿血而痛，膏淋便出如膏，砂淋精結成石，勞淋遇勞即發，冷淋寒戰後洩，大抵多屬於熱，熱甚生濕，則水液渾濁而為淋，若冷氣滯於膀胱而作淋者」

《張氏醫通·張璐》

「熱極成淋，莖中痛，五苓散減桂大半，加滑石、木通、生甘草梢。」

2.2 五苓散治療石淋文獻記載

西元 16 世紀，明朝王肯堂所著《女科證治準繩》書中，首度使用五苓散治療「石淋」，文中記載：「五苓散，治膀胱有熱水道不通，淋瀝不出，或尿如豆汁，或成砂石，或如膏汁，或熱沸便血。」，另段敘述：「治婦人諸般淋，苦杖根俗呼為杜牛膝多取洗淨剉碎取一，合用水五盞煎至一盞，去滓用麝香乳香少許調下，鄞武尉耿夢得，其內人患沙石淋者十三年，每漩痛楚不可忍，溺器中小便沙石，剝剝有聲，百方不效，偶得此方服之一夕而愈，目所視也，局方五苓散，八正散，清心蓮子飲皆可用。」

上段文句，敘述一位罹患石淋症十三年婦女的治療過程，她解尿時劇烈疼痛，伴有沙石排出「剝剝有聲」，服用苦杖根煎劑而痊癒，並且建議五苓散、八正散、清心蓮子飲都是治療方藥。

清朝，張璐所著《張氏醫通》也有五苓散治療石淋記載，原條文如下：「〔閉癃〕閉癃者，溺閉不通，淋瀝點滴也，惟肝與督脈三焦膀胱主之，經云：膀胱之胞薄以懦，得酸則縮蜷，約而不通，水道不行，故癃，又云：膀胱不利為癃，不約為遺溺，蓋實則閉癃，虛則遺溺，遺溺則補之，閉癃則瀉之，然遺溺閉癃，不取膀胱俞者，蓋膀胱但藏溺，其主出溺者，皆從三焦及肝與督脈也，閉癃者，合而言之，一病也，分而言之，有暴久之殊，蓋閉者，暴病，為溺點滴不出，俗名小便不通是也，可用疏通利竅之劑，甚則用吐法以提其氣自通，若補中益氣、二陳、五苓，俱可探吐也，癃者，久病，為溺癃淋瀝，點滴而出，一日數十次，名淋病是也，惟宜滋養真陰，兼資氣化，如六味、生脈之類，亦可合用…」…「熱極成淋，莖中痛，五苓散減桂大半，加滑石、木通、生甘草梢。」

此段文句解釋「閉癃」之症的治療，文中所述「閉」「癃」就是小便不通或點滴尿出不順暢，書中提議使用：補中益氣、二陳、五苓、六味、生脈等方劑治療。依現代醫學觀點，這些症狀應該是膀胱尿道出口阻塞所造成，原因可能是攝護腺肥大或尿道結石所，在已經阻塞出口的

狀況下，若給予利尿劑(如五苓散)應該是禁忌。另外，後段文句所述：「…莖中痛，五苓散減桂大半…」，敘述沙石從尿道排出造成疼痛，並建議使用五苓散加減方來治療。

清朝，沈金鰲所著《沈氏尊生書(上)雜病源流犀燭》關於五苓散治療石淋，原條文如下：「淋病之原，大約由腎虛，膀胱有濕熱，說膀胱與腎為表裡，俱主水，水入小腸與胞，行於陰為溲便，若腎虛而膀胱有濕熱，則因腎虛致小便澀數，因膀胱濕熱致小便澀，數而且澀，則淋瀝不宜，小腹弦急，痛引於臍，此石勞、血氣、膏冷所由成也。說石淋者，膀胱畜熱積成，如湯在瓶中，日久結成白鹼也，治須清積熱，滌去沙石，則水道自利（宜如聖散、神效琥珀散。）。勞淋者，多思慮，負重遠行，勞於脾也（宜補中益氣湯與五苓散分進。）」…「血淋者，小腹硬，莖中痛欲死，血瘀也，以一味牛膝煎膏，大妙，但虛人恐損胃耳…」

此段文句敘述，各種「淋症」之病因與治療，沈金鰲認為「淋症」的原因是「腎虛而膀胱有濕熱」所造成，如果出現小便不通、下腹疼痛等石淋症狀，則建議使用如聖散、神效琥珀散；如果是「多思慮，負重遠行」造成的勞淋，則建議使用宜補中益氣湯與五苓散合併治療；如果是尿道劇烈疼痛並解出血尿的「血淋」，則建議使用一味牛膝煎膏。

2.3 泌尿道結石傳統處置摘要

傳統中國醫學所謂的「石淋、砂淋」，發病症狀表現出：尿道疼痛、小便困難、頻尿、血尿等症狀，與現代醫學的尿路結石(urolithiasis)所患雷同。

中醫藥之結石治療方法甚廣，舉凡動物、植物、礦物等都是可用藥材。桃膠是薔薇科植物桃或山桃等樹皮中，分泌出來的樹脂，也是一種治療方藥[22]。又如上述的；石龍子(蜥蜴)、尿白、車前草、五苓散、苦杖根...等等。而五苓散治療「石淋」記載於西元16世紀《女科證治準繩》一書。

2.4 五苓散的歷史源流考據

西元三世紀，在東漢張仲景所著《傷寒雜病論》一書之中首度出現「五苓散」此一方名，其組成與用法如下：「豬苓十八銖(去皮)，澤瀉一兩六銖，白朮十八銖，茯苓十八銖，桂枝半兩(去皮)。上五味，搗爲散，以白酒和服方寸匕，日三服，多飲暖水，汗出愈，如法將息。」[23]。

《傷寒雜病論》有關五苓散的原文敘述如下：

《辨太陽病脈證並治中》：

「太陽病，發汗后，大汗出，胃中乾，煩躁不得眠，欲得飲水者，少少與之，令胃氣和則愈。若脈浮，小便不利，微熱，消渴者，五苓散主之。」

「太陽病，發汗已，脈浮弦，煩渴者，五苓散主之。」

「傷寒，汗出而渴者，五苓散主之；不渴者，茯苓甘草湯主之。」

「中風發熱，六七日不解而煩，有表裏證，渴欲飲水，水入則吐者，名曰水逆，五苓散主之。」

《辨太陽病脈證並治下》：

「病在陽，應以汗解之，反以冷水澀之，若灌之，其熱被劫不得去，彌更益煩，肉上粟起，意欲飲水，反不渴者，服文蛤散；若不差者，與五苓散。」

「本已下之，故心下痞，與瀉心湯，痞不解，其人渴，而口燥煩，小便不利者，五苓散主之。」

《辨陽明病脈證並治》：

「太陽病，寸緩，關浮，尺弱，其人發熱汗出，復惡寒，不嘔，但心下痞者，此以醫下之也。如其不下者，病人不惡寒而渴者，此轉屬陽明也。小便數者，大便必鞭，不更衣十日，無所苦也。渴欲飲水，少少與之，但以法救之。渴而飲水多，小便不利者，宜五苓散。」

《辨霍亂脈證並治》：

「霍亂已，頭痛，發熱，身疼痛，熱多，欲飲水者，五苓散主之。寒多，不飲水者，理中湯主之。」[23]

《金匱要略·痰飲篇》：

「假令瘦人，臍下有悸，吐涎沫而顛眩，此水也，五苓散主之。」

從上述條文歸納得知，張仲景當時使用五苓散的時機是，病患出現下列症狀：「頭痛、發燒、煩燥、口渴飲水後立即嘔吐、小便困難和脈搏快速」，也就是所謂的「小便不利」、「水入則吐」、「水逆」、「停水」等症。如果，我們從原文推敲探究：「…大汗出，胃中乾，煩躁不得眠，欲得飲水者……，小便不利，微熱，消渴者…」，得知此時病患已經大量流汗，處於脫水狀態，缺乏足夠尿液可以排出，此時卻給予具有利尿作用的「五苓散」，似乎有加速其體內水份流失之嫌；但是，從條文之中，我們無法確切得知該病患治療之後續狀況如何，也不知道張仲景之治療原意，是否真的是「利尿作用」。

此後，歷代中醫師們更廣泛運用五苓散來治療各種病症，今特列舉數則於下：

《千金翼方·唐·孫思邈》

「中風發熱六七日不解而煩，有表裏證，渴欲飲水，水入而吐，此為水逆，五苓散主之。」

《備急千金要方·唐·孫思邈》

「五苓散，主時行熱病，但狂言煩躁，不安精彩，言語不與人相主當者方。豬苓、白朮、茯苓（各十八銖）、桂心（十二銖）、澤瀉（三十銖）。右五味治下篩，水服方寸匕，日三，多飲水汗出即愈。」…

「五苓散，主黃疸利小便方。豬苓、茯苓、澤瀉、白朮、桂心（各三十銖）。右五味搗篩為散，渴時水服方寸匕，極飲水，即利小便及汗出愈。」

《血證論·清·唐容川》

「子氣者，水腫也，胞與膀胱，並域而居，胞宮為胎所站，侵逼膀胱，以致膀胱之水，不能化行，亦由膀胱之氣化，先有不足，故能為胎所用，五苓散主之…」

《校註婦人良方·宋·陳自明》

「第九十七章，婦人協熱下痢方論論曰：痢赤黃，米穀不化，作渴嘔逆，小便不利，心胸煩燥，脈虛大而數，此胃經經虛熱，津液不分，併於大腸所致，先用五苓散，次用玉粉丹，四味阿膠丸爲主。」

《政和經史證類備急本草·唐·唐慎微》

「張仲景曰：水搖渴煩，小便不利，或吐或瀉，五苓散主之。方用澤瀉，故知其用長於行水。」

《景岳全書·明·張介賓》

「五苓散治暑熱煩躁，霍亂泄瀉，小便不利而渴，淋瀝作痛，下部濕熱。白朮，豬苓，茯苓，各七錢半。肉桂，五錢。澤瀉，一兩二錢半。古法爲細末，每服二錢，白湯調下，日三服。今法以水煎服。」

《溫病條辨·清·吳塘》

「足太陰寒濕腹脹，小便不利，大便溏而不爽，若欲滯下者，四苓加厚朴秦皮湯主之，五苓散亦主之。」…「濕傷脾胃兩陽，既吐且利，寒熱身痛，或不寒熱，但腹中痛，名曰霍亂。寒多不欲飲水者，理中湯主之。熱多欲飲水者，五苓散主之。」

《本草求真·清·黃宮繡》

「澤瀉〔水草〕{瀉膀胱氣分濕熱}澤瀉〔耑入膀胱腎〕甘淡微寒，能入膀胱氣分，以瀉腎經火邪，功耑利水除濕；故五苓散用此以除濕熱〔張仲景治傷寒，有大小澤瀉湯、五苓散輩，皆用澤瀉行利停水爲最要藥；又治水蓄煩渴小便不利，或吐或瀉，五苓散主之；方用澤瀉，故知長於行水。〕[24]。

現代中醫師更廣泛的使用五苓散，治療各科疾患，諸如心臟衰竭、胸腔積水、水腫、泌尿系統感染、結石、腦積水、腸胃疾病、婦科及皮膚科等範疇，都有其適用病症。

2.5 植物藥治療泌尿道結石文獻回顧

近年來世界各國對於植物性藥物治療尿路結石的研究，也有重大進展。有如：在摩洛哥（Morocco）廣泛用來治療結石的傳統藥用植物 *Herniaria hirsute*，其在體外實驗中可以明顯地抑制草酸鈣結晶的聚集作用 (aggregation) [25]。盛行於印度的草藥製劑 *Tribulus terrestris*、*Bergenia ligulata*、*Trianthema monogyna*、*Macrotyloma uniflorum* 具有抑制、溶解草酸鈣結晶的能力 [26, 27]。

巴西民間常用草藥：*Phyllanthus niruri* (珍珠草)，使用在結石治療，為期三個月的臨床實驗中，證實可讓高尿鈣症結石病者的尿鈣顯著降低 [28]。

Suzuki 研究澤瀉 (Takusha, *Alismatis Rhizoma*)，發現其對於草酸鈣結晶的形成、生長、聚集皆有明顯的抑制作用 [29]。Utsunomiyam 及 Koide 發現澤瀉 (Takusha) 能明顯的抑制草酸鈣結晶的生長、聚集，而使用豬苓湯 (Chorei-to) 進行動物實驗，可以明顯的抑制結石 [30, 31]。

2.6 尿路結石流行病學

2.6.1 尿路結石概觀

人類罹患尿路結石的歷史，最早可回溯到西元4800年前的埃及木乃伊身上 [4]。古希臘的醫學家希波克拉底 (Hippocrates) 在西元前第四世紀，就曾經描述處理結石的手術情形。據估計尿路結石的盛行率約 2~3%，而台灣屬於腎結石好發地區，盛行率高達 9.6%，其中男性的盛行率是 14.5%，而女性是 3.5% [2, 3, 5, 6]。如果不接受治療，草酸鈣結石患者很容易反復發病，其復發率：一年內有 14%，五年內有 35%，十年內有 52% [32]。

種族與遺傳因素也和結石發病情況有所關連，許多研究者都注意到此病與人種差異確有關聯，他們發現美洲原住民、黑人以及土生土長的以色列人罹患結石者比較少[4]。百分之 25 的尿路結石患者具有家族病史，從 Curhan 的世代研究中指出：有結石家族病史者罹患結石的勝算比(odds ratio)是沒有家族史者的 3.16 倍[33]。推測尿路結石可能是多重基因缺陷所造成的，不過，種族間差異與遺傳所造成的因果與影響，目前尚待釐清。

台灣的腎結石現況，根據李瀛輝等研究指出：台灣南部 20 歲以上成年人當中，8.93% 曾罹患尿路結石，其結石復發率為 63.3%。以司機、勞工、外務員、商人、公務員與坐辦公桌之職員較易罹患尿路結石[34]。而患者年齡大多集中在 30-50 歲，以男性居多，男女比例約為 3 比 1；而孩童及老人發生尿路結石者較少[4]。

男性患者較易發病之原因，推測可能與雄性激素(testosterone)有關，雄性激素讓肝臟內的內源性草酸產量增加，造成尿中草酸排泄量增多，因而讓男性更容易形成腎臟的草酸鈣結石，這種現象在去勢的(castrated)大鼠動物實驗中已經獲得證實[19, 35-37]。

氣溫炎熱可能也是影響因素之一，多位研究者都發現到，氣溫炎熱季節也是尿路結石好發的時候；高溫讓人更容易流汗、尿液濃縮，因而促進尿液中結晶形成[38, 39]。不過，也有其它學者認為在陽光下曝曬，會導致 Vitamin D₃ 產量增加以及尿液中鈣質排泄量增加，這才是導致夏季結石容易發病的主要因素[40]。

2.6.2 尿路結石分類及成因

尿路結石依其化學成份可分類為：含鈣結石(80%)、尿酸結石(10%)、感染性結石(9%)、胱胺酸結石及異物結石等[41]。百分之八十的尿路結石都屬於含鈣結石，通常是由草酸鈣和磷酸鈣混合而成[42]。含鈣結石又可細分為：單純的草酸鈣、混合草酸鈣和磷酸鈣或混合少量的

尿酸成份等[43]。

草酸鈣化學式 CaC_2O_4 ，分子量 128.10，在水中溶解度很小。草酸鈣結石可再細分為：單水草酸鈣(Calcium oxalate monohydrate；Whewellite； $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)及雙水草酸鈣(Calcium oxalate dihydrate；Weddellite； $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)。

尿酸結石(uric acid stone)的發生率近年來有逐漸昇高的趨勢，可能與目前的飲食習慣有關。感染性結石(Struvite stone)是由磷酸(phosphate)、氨(ammonium)、鎂(magnesium)和碳酸鹽(carbonate)混合組成的，與尿路感染有關，導因於人體受到某種能夠製造尿素水解酶的細菌(urease-producing organism)的感染，此細菌可將尿素分解為氨，導致尿液酸鹼度上升，因而造成有利於磷酸鹽結石形成環境，此類細菌最常見的是 *Proteus mirabilis* [44]。

另外，胱氨酸結石症(cystine stone)是一種罕見的遺傳代謝疾病，導因於座落在第二對染色體上掌控 cystine 代謝再吸收的基因突變，此類病患的腎臟無法將 cystine amino acid 再吸收，於是這種不易溶解的胱氨酸就在尿路內沉積造成結石[4]。

2.7 尿路結石治療現況

2.7.1 臨床症狀

尿路結石發病時，可能會表現出所謂的「急性腎絞痛」(renal colic)症狀：腰腹部陣發性劇烈疼痛，伴隨有臉色蒼白、噁心、嘔吐、冒冷汗等情況。此種疼痛有時會延伸到下腹部，引起生殖器疼痛，男性會有睪丸疼痛，而女性則是外陰疼痛等。也常合併發生尿急、尿頻、小便灼熱、血尿或茶色尿等症狀。如果造成泌尿道感染，可能會有發燒、畏寒甚至敗血性休克等情況。

尿路結石應該即早發現積極治療，以免因阻塞導致腎臟積水病變，尿路反覆感染，甚至嚴重發展到腎衰竭等重症。[45, 46]

2.7.2 外科治療方法

自從1984年，美國食品藥物管理局(U.S. FDA)核准使用體外震波碎石術(ESWL； Extracorporeal shockwave lithotripsy)來治療尿路結石，再加以內視鏡儀器技術的精良與改進，目前尿路結石的治療方式已有重大進步[4]。體外震波碎石術是最常用的治療方式，百分之九十以上的尿路結石都可以使用ESWL來治療，但是為了節制醫療資源避免浪費，因此台灣泌尿科醫學會特別提出「尿路結石治療共識準則」，讓醫師的治療有所遵循[45-47]。治療原則如下：

(A)、治療一般原則：

結石小於0.4cm，因為自行排出機會極高，所以建議密切觀察與採取保守療法。若屬於不容易排出者或經過ESWL治療後X光片上結石沒有被擊破跡象者，則不建議再次使用ESWL治療。

(B)、輸尿管結石治療原則：

輸尿管結石若小於1公分，開刀手術不應列為首選方式，應先選用ESWL或內視鏡方式治療。如果大於1cm，由於堵塞時間長久，ESWL治療效果極差，應視其結石部位再決定選擇採用內視鏡或者開刀手術。

(C)、腎結石治療方針：

- 2cm以上的腎結石，以經皮腎造瘻取石術(PCNL； Percutaneous nephrolithoripsy)治療效果較好。2cm以下的腎結石，ESWL是首選的治療方式。
- 腎內結石直徑超過2.5cm者，需以PCNL先行減輕腎石負擔，若有殘石再輔以內視鏡或ESWL，加速殘石的廓清；原則上不宜單獨使用ESWL來治療。
- 感染性鹿角狀結石病患即使沒有明顯臨床症狀，除非有手術禁忌症皆需要積極處理。

2.7.3 尿路結石的預防與保守治療方法

許多研究者與醫師都建議指出，尿路結石病患應該多喝水，藉此稀釋尿液，預防結石。每天維持喝水量3000 cc以上，讓每天的排尿量超過2500 cc[4, 48, 49]。水份攝取量的增加，一方面可以降低尿液中結晶體的濃度，而喝水所造成的利尿作用，還可以減少結晶體滯留的時間，兩者都有益於降低罹患尿路結石的危險性。

此外，蘇打水、檸檬水或柑橘類飲料，因其可以增加尿液中的檸檬酸鹽濃度(citrate)，因此對於預防尿酸結石和含鈣類結石的再發也有相當的好處。

大量攝取動物性蛋白質將會增加罹患腎結石的危險性，與正常飲食者相比其相對危險比(relative risk)是1.33倍。

但是在飲食方面，多年來卻存在著不正確的「低鈣飲食」觀念。「低鈣飲食」可能更容易促進結石，其原理是腸道中的鈣減少之後，會造成鈣和草酸鹽結合的量也會變少，如此，反而讓更多的草酸鹽被腸道所吸收，再從尿液中大量排出，進而增加了尿液中草酸鈣濃度呈現「超飽和」(supersaturation)狀態。為此，針對含鈣飲食的建議，Curhan [33]的前瞻性世代研究(prospective cohort)就明白指出：「高鈣飲食」可以降低罹患腎結石的危險性。從前倡導的「低鈣飲食」觀念，目前已經逐漸被揚棄了，Wahl甚至建議可以每天攝取1200 mg的含鈣食物，而動物蛋白的攝取量每天不應該超過每公斤體重1g的量[50]。

另外，應該避免攝取大量的草酸食物。而且過量的維他命C，也會增加腎結石的復發率，因此建議維他命C的每日攝取量應該限制在2g以內[4]。

2.8 尿路結石的成因探討

尿路結石的發生原因大多不明，80%的尿路結石都屬於含鈣結石，通常是由草酸鈣和磷酸鈣混合而成[42]。1797年，Wollaston 首度發現在腎結石中含有草酸鈣(calcium oxalate)的成份[51]。

結石患者可以找出病因的，只有 15%，有如：原發性副甲狀腺機能亢進症(primary hyperparathyroidism)、原發性高草酸尿症(primary hyperoxaluria)、腎小管酸中毒(renal tubular acidosis)等[4]。

尿路結石形成原因複雜多樣化，有許多理論學說解釋其形成機轉，每個學說都有他們的支持者與理論證據基礎。但是，目前卻還無法找出單一理論來完全解釋其成因。

這些理論較著名的包括：1. 強調「超飽和」(supersaturation)的「分泌增多—結晶形成學說」(hyperexcretion-crystallization theory)。2. 有機基質構成結晶附著骨架的「結石基質學說」(stone matrix theory)。3. 結晶抑制物學說(inhibitors of crystallization theory)。4. 核心母質學說(matrix-nucleation theory)等[52-58]。

2.8.1 尿路結石的形成過程

尿路結石的形成過程可能是經過許多複雜步驟，首先結晶物質在尿液中達到鹽類濃度超飽和狀態 (supersaturation)，繼之結晶的核心開始形成(nucleation)，隨後晶體生長 (growth)、聚集 (aggregation)，晶體變大後停留在腎小管內，如果沒有被尿液沖走就有機會形成結石[13, 59, 60]。

超飽和狀態(supersaturation)是結石發生的主要事件，所謂溶液達到飽和(saturated)，就是指某物質不能再溶解於水中即將變成固體的狀態。當溶液已達到飽和而開始產生結晶的時候，此點稱之為「熱流力學溶解常數」(Thermodynamic solubility product; K_{sp})；在此濃度下，溶液內的化學物質處於液態與固態的平衡狀態。例如：在37°C，單水草酸鈣在蒸餾水中的 K_{sp} 是 2.34×10^{-9} [4, 61]。

如果，尿液中鈣與草酸結合物的濃度超過它的 K_{sp} ，應該就會產生沉澱。但是事實上，結晶成份的濃度在尿液中都已經達到超飽和狀態，卻還沒有發生沉澱，而是處在所謂的動態平衡(metastable)狀態。或許，我們應該探討的問題並不是：「為什麼有些人會長結石」，而應該是：「為什麼大多數的人不會長結石」這個問題。

溫度與酸鹼度對於結晶過程影響很大。大部份在試管內進行的結晶實驗都是在室溫下進行，而不是在動物體溫狀態下進行實驗；而且，尿液的酸鹼度變異範圍頗大，這些種種因素都應該列入考量之中。

除此之外，尿液不同於單純的水中狀況，相對的比較複雜。當尿液中某物質的濃度已經達到此物質在水中的飽和濃度時，卻沒有發生應有的結晶沉澱現象。事實上，和水相比較之下，尿液能夠溶解更多的物質，探究其原因，可能是存在尿液中的許多帶電離子會相互作用，因而改變了他們原本的溶解度。此外，尿中的許多有機分子也可能會影響溶解度。例如：檸檬酸(Citrate)可以與鈣結合形成可溶解物質，藉此大大降低了鈣與草酸或磷酸結合形成結晶的機會。多位學者也證實，如果尿液中的檸檬酸不足，的確是造成草酸鈣結石的一項重要危險因子[4]。

正常情況下尿中草酸鈣濃度高出其在水中的四倍，或許是因為存在某種抑制物(inhibitors)或其它分子的緣故，草酸鈣在尿液中的超飽和狀態必須達到它溶解度的7至11倍時，才會產生沉澱物[4, 62]。接下來，此結晶核(crystal nuclei)會附著在其它結構物的表面(例如：上皮細胞、細胞碎片、紅血球或其它晶體等)，並讓其他結晶陸續堆積上來，逐漸變大，就是所謂的晶體聚積(crystal aggregation)，如果晶體太大，就會堵塞腎小管的管腔。

目前發現，有許多物質都具有抑制晶體生長或聚積的能力，例如：magnesium, citrate, nephrocalcin, Tamm-Horsfall mucoprotein, Bikunin等[63, 64]。如果能夠有效地干擾晶體的生長與聚積，或許會是預防腎結石的可行之道。

2.8.2 高鈣尿症與腎結石

尿液中含鈣成份太高造成所謂的高鈣尿症(hypercalciuria)，也是腎結石患者主要表現之一。罹患含鈣尿路結石的患者之中，有半數都會表現出「不明原因的高鈣尿症」(idiopathic hypercalciuria)[65, 66]。不過有百分之五的健康人，也可能會出現此種不明原因的高鈣尿症。在草酸鈣尿路結石的患者之中，大約有30%~60%的病患會有尿鈣排泄量增加的現象，但是他們的血清鈣濃度並不會升高[4]。歐陽等認為，並不是尿中鈣離子濃度越高，就越容易形成結石[67]。他們研究結論出，尿液中鈣與草酸濃度和結石形成並沒有正比關係，只有當尿中鈣與草酸濃度在0.60~0.90 mmol/L時，才會形成最大尺寸的結晶。

所謂「高鈣尿症」的定義各方說法不同，目前公認的定義是：每日每公斤體重的尿鈣排泄量大於4 mg，或是每100 ml的腎絲球過濾液中含量大於0.11 mg的鈣質[68, 69]。造成尿中含鈣量增加的原因，可能是導因於腸道對於鈣的吸收量增加，或是因為腎臟過濾的流失增多，也可能是因為骨頭的鈣質釋出量增多。

2.8.3 草酸與尿路結石的關聯

早期的研究指出「高鈣尿症」是形成草酸鈣結石的主要原因，但是近年來卻有不同的看法，認為在結石形成過程中，「高草酸尿症」可能更為重要[70]。研究者注意到，草酸鈣結石者的尿中結晶生成速度，與其尿中鈣的排泄量關聯並不大；反倒是，尿中的草酸排泄量會比正常人明顯地增加許多，依此推測「高草酸尿症」應該是一項重要的決定因素。草酸與結石之間的確存在著某種關聯，本文對此將進一步探討。

在腎臟內，草酸的主要分泌部位是位於近端腎小管，尿液中的草酸有80%是來自於肝臟代謝產生的所謂「內生源性」(endogenous)草酸，其中40%源自於ascorbic acid，而另40%來自於glycine的代謝[4]。

而從飲食得來的草酸，只佔有尿液中草酸含量的10% [71]。此類得自食物的草酸，有一半會被細菌所分解(如：*Oxalobacter formnigenes*，

Pseudomonas oxalacticus)，另外的25%以原來型態從糞便排出，其餘的草酸才經由尿液排出[72]。

正常人從腸道吸收的草酸量並不多，但是，在某些接受過小腸切除手術(仍保留大腸)的病患，他們的草酸吸收量就明顯增加許多，因此推測胃部及遠端小腸應該是草酸在腸道內的主要吸收部位[61]。

「高草酸尿症」在臨床上以三種方式表現：1. 草酸產量增加。例如：原發性高草酸尿症(Primary hyperoxaluria)、肝臟轉換量增加(increased hepatic conversion)等。2. 草酸吸收量增加。3. 原因不明的高草酸尿症[4, 61]。現在擇其重要者，略述於後。

原發性高草酸尿症(Primary hyperoxaluria)

可再細分為兩型：第一型的原發性高草酸尿症，是一種自體隱性遺傳的先天代謝疾病，發生率約百萬分之一，Danpure與Jennings在1988年證實此病是導因於某種肝臟酵素：AGT (alanine-glyoxylate aminotransferase)的缺損所造成的，他們更在1990年完成調控此一蛋白質的基因(AGxT)定序工作[73, 74]。

其臨床症狀表現出：腎臟內鈣化、器官組織內沉積草酸、尿中oxalic acid、glycolic acid及glyoxylic acid排泄量都增加，如果未經治療，病患20歲以前會因腎臟衰竭而死亡[4, 75, 76]。

探其病因，在正常人的肝臟內AGT可以催化轉氨作用(transamination)將glyoxylate變成glycine，此一作用在過氧化物酶體(peroxisome)內完成；但是此類患者的peroxisome內缺乏此種AGT催化酶，無法完成此一轉氨步驟，導致過多的glyoxylate進入細胞質內被代謝成為大量的草酸，如圖2.1所示。草酸大量形成後，再與鈣離子結合進而形成不溶解的草酸鈣結晶沉澱，造成腎臟結石。

第二型的原發性高草酸尿症則更為罕見，導因於缺乏肝臟內酵素：D-glycerate dehydrogenase及glyoxylate reductase，因而造成尿中oxalate及glycerate排泄量劇增形成結晶[76]。

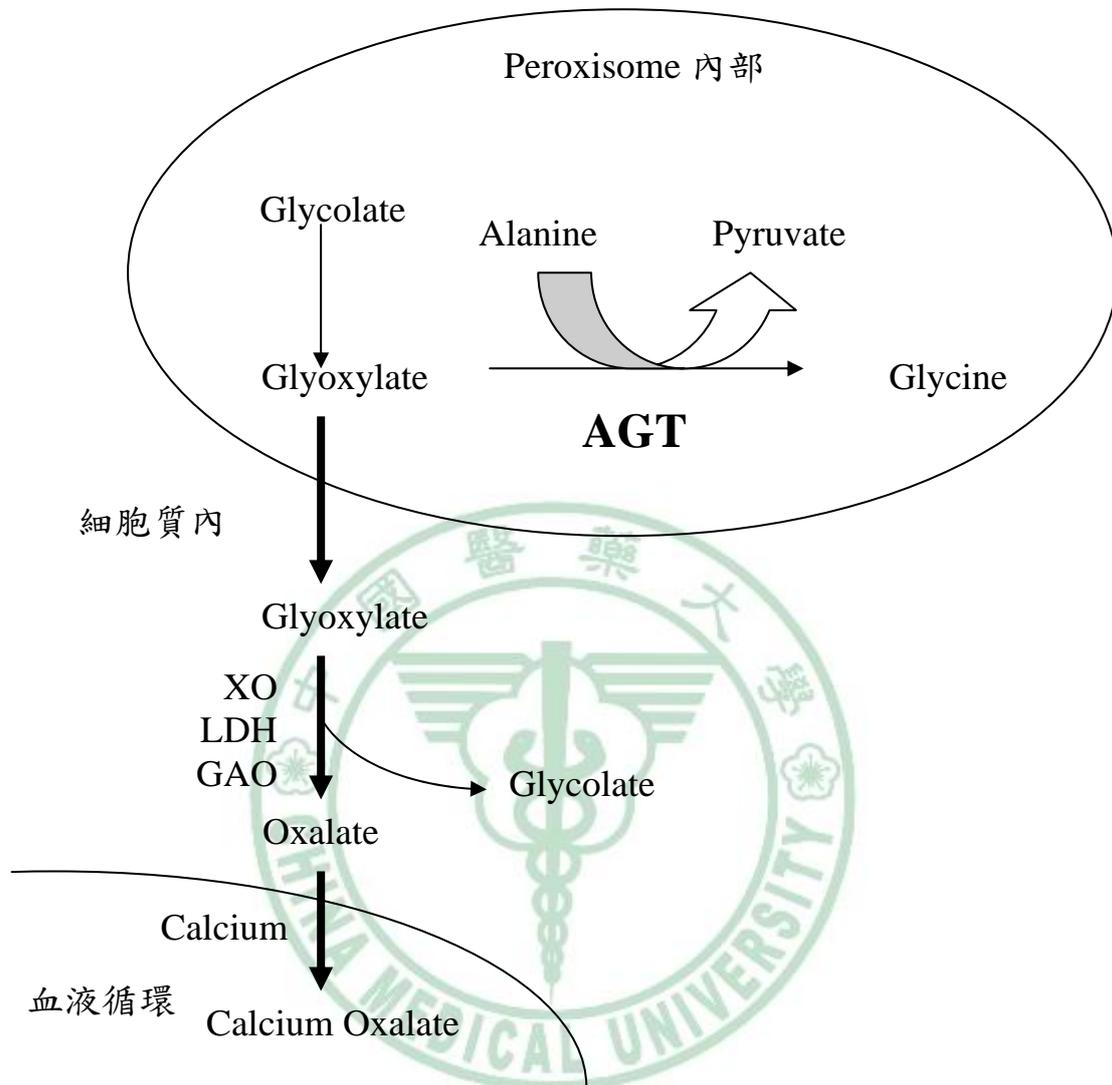


圖 2.1 Peroxisome 內的 AGT 缺陷。AGT (Alanine-glyoxylate aminotransferase deficiency) 缺陷導致 oxalate 增多，形成草酸鈣結晶。XO, xanthinoxidase; LDH, lactate dehydrogenase; GAO, glyoxylate acid oxidase

草酸在肝臟的轉換量增加

pyridoxine 的缺乏，或者使用 methoxyflurane 麻醉劑，或者食用 ethylene glycol，這三種情況都會造成草酸的過量產生。

本實驗即採用第三種方式，使用 ethylene glycol 餵食大鼠，藉此增加草酸產量，誘發草酸鈣的腎臟結晶。

草酸吸收量增加

從飲食得來的草酸，主要經由胃、大腸吸收，如果大量食用此類食物，就容易產生所謂的腸道性高草酸尿症(Enteric hyperoxaluria)。Hautmann的研究指出，食用草酸製劑兩小時後，即可從尿液中排出20%的草酸，六小時後就已經排出60% [77]。

此外，曾經接受過小腸切除(small bowel resection)或空腸迴腸繞道手術(jejunoileal bypass)的病患，對於草酸的吸收量將會大幅增加，其道理在於大腸黏膜因為直接受到膽汁的刺激，所以導致草酸在大腸內的通透性(colonic permeability of oxalate)增加，如果再加上腸道內鈣質成份減少，更容易讓草酸處於溶解狀態，進一步造成反覆的草酸鈣結石沉積[61, 77, 78]。

2.9 尿路結石的其他可能成因

草酸鈣結石病患，以男性居多，推測性荷爾蒙在結石病因機轉上也具有重要角色。Estrogen, progesterone與testosterone，經由調控1,25-dihydroxyvitamin D3和刺激腎臟內的 1α -hydroxylase增加腸道鈣的吸收，來影響結石的生成[79, 80]。

基因突變異常造成腎小管功能的改變，形成高鈣尿症(hypercalciuria)，或者腎小管細胞的氧化壓力(oxidative stress)因素都是可能成因。

檸檬酸鹽(citrate)具有抑制結石的作用，它與鈣結合後會降低尿中鈣離子的濃度，進而抑制結晶成核反應(nucleation) [81, 82]。某些合併有腸道疾患或同時服用利尿劑的草酸鈣結石病患，的確可以發現到他們的citrate排出量明顯地減少，這表示citrate也是一項重要的影響因素[83]。

Robertson觀察發現，含鈣結石患者其尿中排出的草酸和鈣遠高於常人[84, 85]。但是，超飽和結晶理論並無法完全的解釋結石發生機轉，多位學者也提出質疑認為，大多數人尿液中都有結晶的存在，也常常處於「超飽和」狀態，可是他們並不會因此而形成結石；尿液之中應該存在著某些物質造成重要的影響[4]。因此研究者認為，這些人的尿液中存在

著某些抑制結晶形成的物質，可以藉此避免結石的生成。

這些物質可以區分為抑制物(inhibitors)、複合物(complexors)和促進物(promoters)。所謂的「抑制物」(inhibitors)可能有很多，包括離子(ion)或巨分子(macromolecule)等物質，有一些是為了反應結石所帶來的損傷，而從腎元(nephron)製造出來的，而有一些不只會影響到結晶形成(crystallization)，也同時會造成晶體附著在細胞上[86]。草酸鈣結晶的抑制物大多是高分子量的化合物，其中包括；citrate, pyrophosphate, glycosaminoglycans, RNA fragments以及nephrocalcin [63]。

此外，和結石成因可能有關的蛋白質，有如下述：albumin, globulin, Tamm-Horsfall protein, nephrocalcin, alpha1 and beta2 microglobulin, hemoglobin, neutrophil elastase, alpha1-antitrypsin, protectin, alpha1 acid glycoprotein, apolipoprotein A1, retinol-binding protein, renal lithostathine, urinary prothrombin fragment a, inter-alpha-trypsin inhibitor, glycosaminoglycans [87-89]。

結石基質(Matrix)的角色也引起學者廣泛的研究，因為除了晶體成份之外，結石之中仍然存在有10%~65%非結晶物質(此即稱之為matrix)[4]。六〇年代開始，Boyce開始提出這種結石基質學說，化學分析顯示matrix含有65%的hexosamine，此物質與尿中大量存在的蛋白質uromucoid成份相似[52]。當然，每種結石所含有的matrix都不盡相同。Moore與Gowland也發現某種名為Substance A的物質，是由三四種結石特異抗原(stone-specific antigens)所組成的，85%的結石患者尿液中可以發現它們的蹤跡[90]。

抑制物(inhibitors)與結石基質(matrix)所扮演的角色仍是一大謎惑，是否腎結石患者所分泌的某些抑制物與常人不同？如果真是如此，它是不是經由基因來調控的呢？凡此種種，都亟待解決。

2.10 腎結石動物實驗模式文獻回顧

2.10.1 常見的動物模式

目前最常見的動物模式是實驗性誘發大鼠產生高草酸尿症 (hyperoxaluria)，並進而造成腎結石[91]。誘導的方法，可經由餵食草酸的前驅物(precursors)，例如：ethylene glycol (EG)，hydroxyl-L-proline 或 glycolic acid，來誘發產生高草酸尿症。或者，也可藉由調控動物的飲食，例如：給與維他命 B6 缺乏的食物、低磷或高蛋白質飲食，來達成目的 [92-99]。凡此種種誘導方式，將造成兩種不同型態的高草酸尿症：(一)、慢性高草酸尿症：長期、多次、低劑量的投與誘石劑。(二)、急性高草酸尿症：單次、大劑量的投與誘石劑。

Khan 研究指出，併用 0.75% 乙二醇(EG)與 2% 氯化氨(ammonium chloride)餵食大鼠，第三天即可造成持續性高草酸尿症，第七天即可發現腎結石。如果，只單純給予 EG，則必須等到第 12 天，尿液中的結晶物才能持續存在，而且 2 至 3 週後才會看到腎結石的出現[91]。結晶較常沉澱在腎乳頭部位，而在腎小管管腔內、腎小管上皮細胞內或細胞間隙等處，也會發現結晶聚積。

多位學者使用乙二醇經由不同途徑投予(例如：加入飼料中、加入飲水中自由攝取或管灌餵食等)，大都可以達到 60% 以上的成石率[93-96]。從文獻回顧中，我們發現使用乙二醇添加於飲用水的模式，操作比較方便，其動物死亡率較低，而且誘導結晶之成功率也比較高。不過，此模式下的成石率並不是百分百，意味著如果 8 週以前可能只有少數大鼠會發生腎內結晶。

這些實驗所使用的乙二醇濃度也各自不同，從 0.5% 到 2% 都有；我們發現若使用 0.75% 乙二醇添加於飲水飼養，4 至 8 週成石率較穩定，而且大鼠死亡數目也比較少[21, 93, 94]。

2.10.2 乙二醇誘導成石的機轉

乙二醇(EG; ethylene glycol; $C_2H_4(OH)_2$)常被使用於抗凍劑、煞車液、工業用溶劑等，也常被拿來充當乙醇製成假酒以圖利。其味道甘苦、無色、無臭，飲後很快從腸胃道吸收，四小時內達到血中最高濃度，半衰期3~8小時，而從肺或皮膚僅有微量吸收。成人常因誤飲假酒或自殺服食而中毒，小孩則是誤飲所造成。

動物食入乙二醇後，在其體內經由肝臟酵素：酒精去氫酶(alcohol dehydrogenase)分解成四種有機酸：glycoaldehyde, glycolic acid, glyoxylic acid 及 oxalic acid。這些代謝物具有細胞毒性，可成中樞神經系統抑制、心肺衰竭、腎衰竭等，其中 glycolic acid 造成嚴重的酸中毒，而草酸(oxalate)會造成草酸鈣沉積於腎及其它組織中[100]。偏光顯微鏡下檢視，可見到大量的草酸鈣晶體呈現出雙折射(doubly refractile)特徵，沉積在遠端腎小管與與集尿管等處，並造成細胞的廣泛壞死，危及生命。

因為乙二醇所具備的這種腎臟結晶特性，因此常被利用當做動物實驗中的誘石劑。

2.10.3 成石率計算與結晶之評分標準

在瀏覽過數篇動物實驗文獻之後，我們發現到：所謂的「成石率」與「結晶嚴重程度」評分方式，在學者之間似乎沒有共通的標準。有些研究只測定磨碎後的腎臟懸浮液內草酸鈣的濃度，做為嚴重度的標準。而有些研究僅單就病理組織病變，就主觀判定其結晶嚴重與否。

比較客觀而較多學者採用的方法，是 Nelde 所使用的一種「主觀式的半定量給分方法」，係將腎臟切片置於光學顯微鏡下，使用偏光鏡，將視野範圍內發現的結晶，依照其數量多寡給予評分[20]。這也是本研究採用的方式。

2.10.4 其它誘導腎結石的方法

王建紅等使用乙醛酸(glyoxylic acid)誘發結石，發現其造成大鼠腎臟 OPN mRNA 表現量明顯增加，而使用豬苓湯可以有效抑制此種 OPN mRNA 的表現[97]。另外，將大鼠切除小腸，也是一種有效誘導腎結石的模式。Worcester 使用此模式經七個月實驗發現，草酸鈣晶體最初是由近端腎小管的毛刷側緣(brush border)形成，並且在腎小管與腎乳頭內造成沉積，並造成管腔的阻塞與發炎等反應[98, 99]。

2.11 文獻回顧總結

傳統中國醫學所謂的「石淋、砂淋」，發病症狀表現出：尿道疼痛、小便困難、頻尿、血尿等症狀，與現代醫學的尿路結石(urolithiasis)所患雷同。自古中醫藥之結石治療方法甚廣，舉凡動物、植物、礦物等都是可用藥材，譬如本章各節提及的：石龍子(蜥蜴)、桃膠(桃樹幹樹脂)、尿白、車前草、五苓散、苦杖根...等等。五苓散治療「石淋」記載於西元 16 世紀《女科證治準繩》一書。另外世界各國對於他們本土植物藥的結石治療也頗有成效。

從流行病學觀點可知，尿路結石的歷史記載早於西元 4800 年前的木乃伊身上就已發現。台灣屬於腎結石好發地區，盛行率高達 9.6%。性別、種族、遺傳、飲食等因素都可能造成影響，男性、司機、勞工、外務員、商人、家族病史者都傾向於比較容易發病。百分之八十的尿路結石都含有鈣成份，大都是草酸鈣和磷酸鈣混合而成。目前治療方式傾向於「低侵襲性方法(minimum invasive)」為主，如體外震波碎石術、內視鏡碎石術等方法。預防之道首重「多喝水」，沖淡尿液，減少尿液中「超飽和」狀態發生。

尿路結石的成因複雜，單一理論無法完全解釋其原因，舉凡：過飽和理論、基質學說、抑制促進物等理論，尚待後人深入探討。草酸鈣結石的動物實驗模式，以使用乙二醇添加水誘導大鼠為主，可有效誘發高草酸尿症並形成腎結石，實驗期短，動物死亡率較低，是目前運用較廣泛的方法。不過，實際運用上應注意，成石率與結晶嚴重度之評定，必須注重客觀性與標準之一致性。

第三章 材料與方法

3-1 實驗流程

本實驗分兩大部份：(一)、飼養動物，餵食乙二醇或實驗藥劑五苓散等，四週後解剖取出腎臟，右側腎臟病理切片，評估結晶嚴重度。(二)、左側腎臟液態氮保存，進行蛋白質體學研究。實驗流程如圖 3.1 所示。

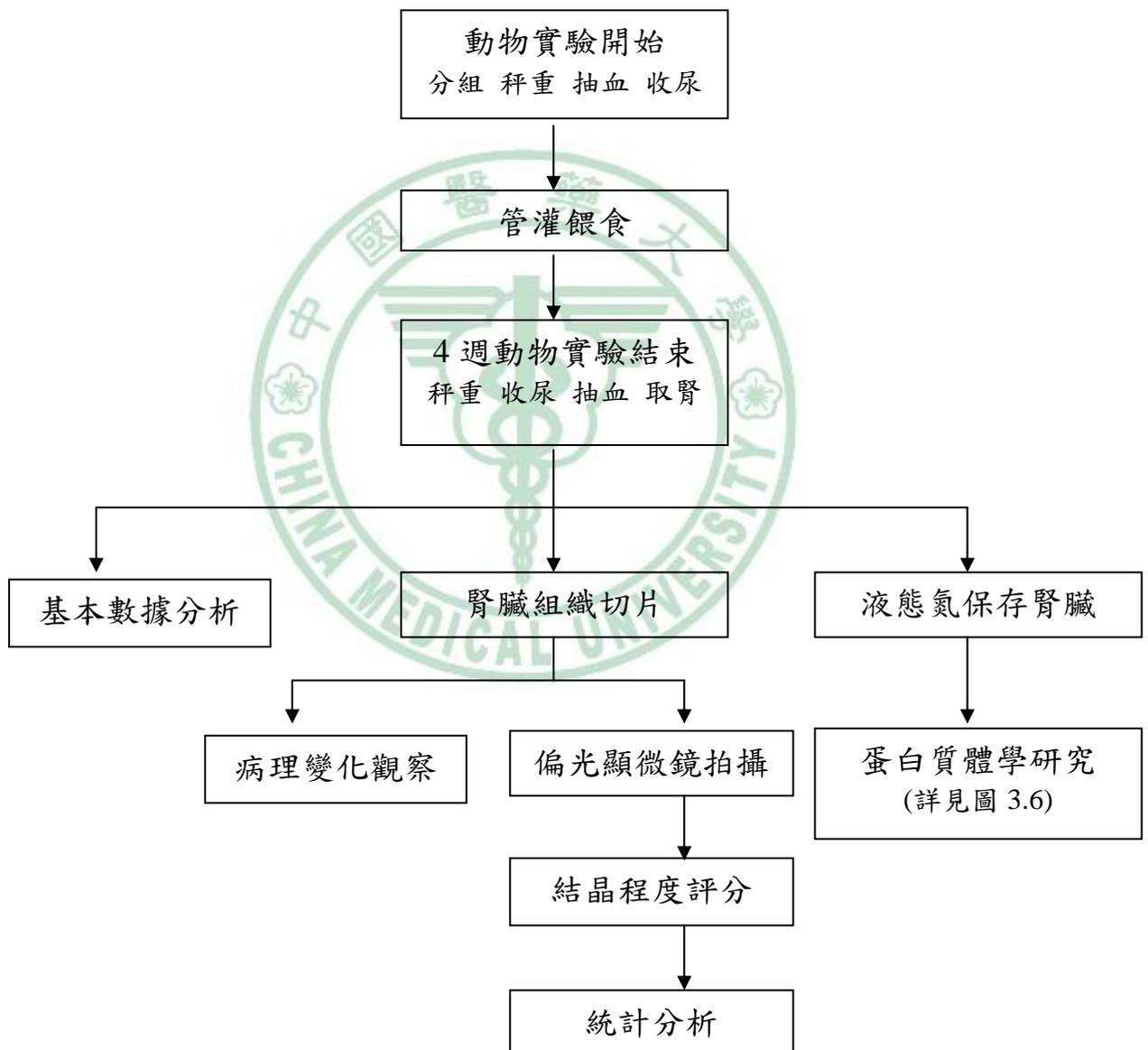


圖 3.1 實驗流程

3-2 實驗動物

本研究採用 Sprague-Dawley(SD)品系雄性大鼠，四週齡，體重 200-250 公克，購自 BioLASCO 公司。飼養於中國醫藥大學動物中心，室溫維持於 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ，濕度 $55\pm 5\%$ ，每日光照、黑暗各 12 小時。動物實驗過程與步驟，遵循中國醫藥大學動物中心委員會之規範守則。

3-3 動物分組與藥物灌食

四十一隻 SD 品系雄性大鼠分成四組：對照組接受正常食物及飲水，另三組接受 0.75% 乙二醇飲水誘發腎結石，其中安慰劑組接受管灌澱粉，而另外兩個藥物組分別接受 375 mg/kg 或 1125 mg/kg 不同劑量的五苓散餵食。動物餵食與分組等細節，詳見表 3.1。

表 3.1 動物分組與餵食分配

	分 組	食 物	飲 水	管灌餵食
Group 1	Normal Control	8 隻 normal	d.d. water	無
Group 2	Placebo Group	11 隻 normal	EG water	澱粉
Group 3	low dose Group	11 隻 normal	EG water	WLS 375 mg/kg
Group 4	high dose Group	11 隻 normal	EG water	WLS 1125 mg/kg

3-4 五苓散萃取液的製備

3-4-1 五苓散藥物組成

本實驗所使用的五苓散配方是科學中藥粉末製劑，係由科達(Koda)製藥股份有限公司所提供。五苓散的組成是：茯苓 (*Poria cocos Wolf*)、豬苓 (*Polyporus umbellatus Fries*)、白朮 (*Rhizoma Atractylodis Macrocephalae*)、澤瀉 (*Rhizoma Alismatis*)、桂枝 (*Ramulus Cinnamomi Cassiae*) 五種藥物，其重量比例分別是 3:3:3:4:2，賦形劑是澱粉。

3-4-2 五苓散萃取液的製備流程

五苓散灌食液的製備方式，依序如下：

1. 將100 gm五苓散粉末倒入裝有500 ml二次水的廣口瓶內，放置於壓力鍋內，設定121°C，加熱15分鐘。加熱後，瓶內溶液已變成果凍樣粘稠糊狀，再加入二次水，使該溶液達到750 ml，並存放於4°C下，靜置七天備用。
2. 七天後，將廣口瓶內上清液倒出，以1,500 rpm、將其離心10分鐘。
3. 此溶液濃度之決定方法：離心完成後，取1 ml上清液置於Eppendoff試管內，置放烤箱內，設定60°C烘乾，並置放隔夜。
4. 連瓶秤重後，扣除試管瓶身重量，計算出粉末之重量。
5. 步驟3、4重覆兩次，以其平均數值當成該溶液之濃度。
6. 最後，依該濃度加入適量二次水，將溶液濃度調製成每毫升含有80 mg的五苓散粉末(80 mg / ml)[13]。

3-5 五苓散指紋圖譜分析方法

本藥品之指紋圖譜分析，係委託財團法人醫藥工業技術中心進行，方法敘述於下：

3-5-1 檢品溶液配製

1. 精確秤取濃縮顆粒 2.00 gm 置於 30 ml 離心管中，加入 70% 甲醇溶液 8 ml 混勻。
2. 於 40°C 下以超音波(Cole-Parmer 8893)震盪 15 分鐘。
3. 以 HERMLE Z323K 離心機於室溫、10000 rpm 下離心 10 分鐘。
4. 離心後取上清液置於 20 ml 定量瓶中。
5. 將此離心管內剩餘藥渣加入 70% 甲醇溶液 8 ml 混勻。
6. 重複上述步驟 2、3，混合兩次上清液，並以 70% 甲醇溶液定容至 20 ml。
7. 以 0.45 μ m 濾膜過濾後注入 HPLC 分析，設定條件如表 3.2。

3-5-2 高效液相層析儀分析條件

表 3.2 五苓散高效液相層析儀分析條件設定

儀器設備	Agilent 1100 series Vacuum degasser(G1379A), Quaternary pump(G1311A), Autosampler(G1329A), Thermostated column compartment(G1316A), Diode array detector(G1315A)				
層析管	Cosmosil 5C18-MS-II Waters 4.6x250 mm (5 μ m) (NACALAI)				
前置管柱	LiChrospher® 100 RP-18e (5 μ m) (MERCK)				
管柱溫度	37°C				
流速	1.0ml/min				
檢測波長	UV 203 nm				
注射體積	10 μ l				
分析條件	Time(min)	0	70	120	130
	0.1% H ₃ PO ₄ (%) ^{註一}	95	52	0	0
	Acetonitrile(%)	5	48	100	100

^{註一} 0.1% H₃PO₄ 配製：於 2000ml 定量瓶中，加入 1800ml H₂O 與 2.35ml Phosphoric acid(85%，Riedel-de Haën)，以超音波震盪使其均勻溶解後，加 H₂O 定容至 2000ml，抽氣過濾後使用。

經高效液相層析檢驗分析，五苓散所含金屬成分：Cd $0.237 \pm 0.001 \mu\text{g/g}$ 、Pb $1.658 \pm 0.031 \mu\text{g/g}$ 。

五苓散之指紋圖譜如圖 3.2 所示，五個主要吸收尖峰分別在：33.178, 37.340, 42.136, 45.337 和 108.455 min。

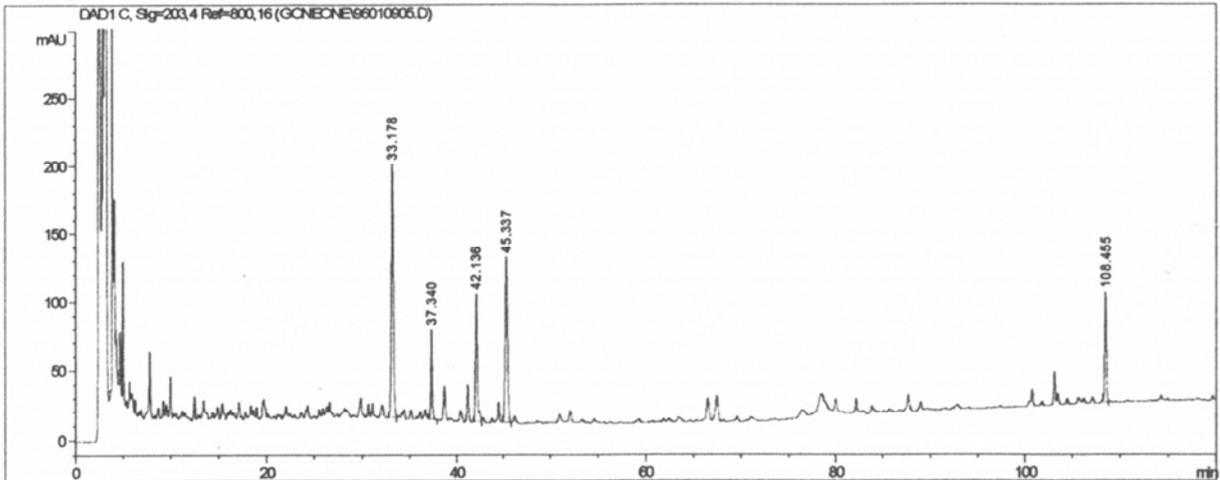


圖 3.2 五苓散色層分析指紋圖譜

3-6 動物處置

1. 實驗開始第一天，隨機分組，編號，秤重。從尾巴採血。
2. 每隻大鼠個別置入代謝籠，收集 24 小時尿液。
3. 依照表 3.1，分組分配飲水、餵食，進行四週。
4. 實驗四週後終止飼養，記錄每隻大鼠體重變化。
5. 個別收集 24 小時尿液。
6. 以乙醚麻醉，從心臟抽取血液，處死動物，摘取兩側腎臟秤重。
7. 檢驗分析血液、尿液數據變化。
8. 右側腎臟以福馬林固定後，再以石蠟(paraffin)包埋，hematoxylin-eosin 染色，製成切片，檢視其病理變化，並進行結晶嚴重程度的評分工作。
9. 左側腎臟以液態氮保存，進行下一步的蛋白質體學研究。

3-7 血清尿液分析

3-7-1 二十四小時尿液收集

時間點：第一週(實驗開始前)與第四週(實驗結束前)，各壹次。

收集方式：每隻大鼠個別放置於生理代謝籠中，持續 24 小時，計錄總量，並檢驗分析其成份數據。

3-7-2 血液採集

第一週(實驗開始前)：尾巴採血。

第四週(實驗結束時)：心臟採血。

檢驗項目：

Serum (calcium, free calcium, phosphorus, pH value)

Urine (calcium, free calcium, phosphorus, pH value)

檢驗儀器：

Hitachi-7150； Roche-Omnicon analyzer

3-8 結晶沉澱嚴重度評分

為了避免評分者預先知道切片之組別，因而造成主觀之評分偏差，也為了減少評分者間之互相影響，我們採用雙盲隨機方式進行評分工作。在偏光顯微鏡下，將鼠腎切片分區拍攝成數位影像，再輔以自行研發的圖片瀏覽軟體，採用雙盲、隨機、匿名顯示圖片方式，讓評分者個別評分。

結晶嚴重度分級，係採用 Nelde 提出的一種「半定量計分方式」，由六位評分者獨立評分，匯整後交由統計者分析各組差異[20]。

草酸鈣結晶認定方式：光學偏光顯微鏡下(100 倍)，檢視發現其具有「雙折射」(birefringent)特徵之結晶影像，即視為草酸鈣結晶(crystal of CaOx)。

3-8-1 結晶沉澱嚴重度評分標準：

採用Nelde所使用的一種「主觀式半定量給分方法」[20]。依照顯微鏡視野範圍內的結晶嚴重程度，依序給予0到3+的分數。

0分代表無(none)結晶，1+ 代表少數(few)結晶，2+ 代表一些(several)結晶，3+ 代表很多(many)結晶。給分標準之範例圖片，如圖3.3 所示 [13]。圖3.1.A 代表1+，圖3.1.B 代表2+，圖3.1.C 代表3+。

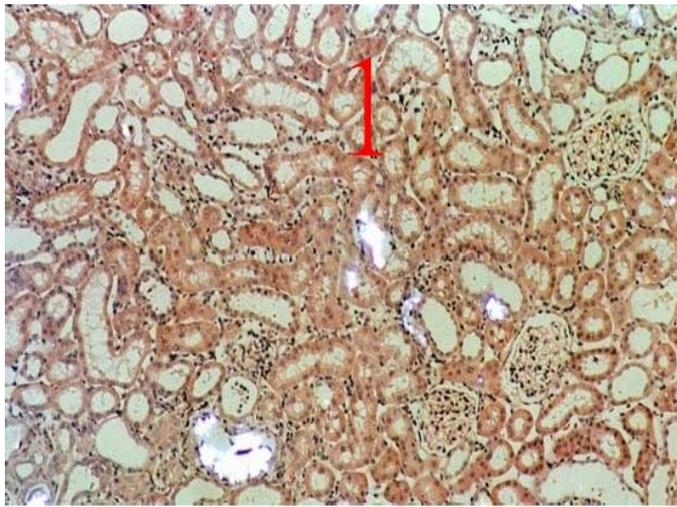


圖3.3.A 給分標準 1+

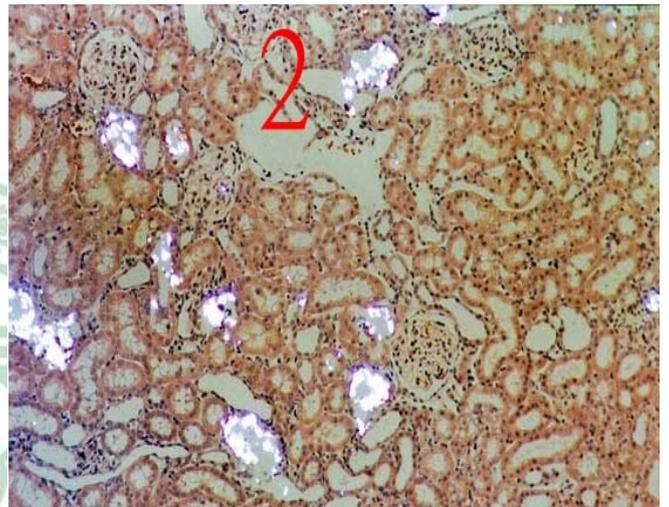


圖3.3.B 給分標準 2+

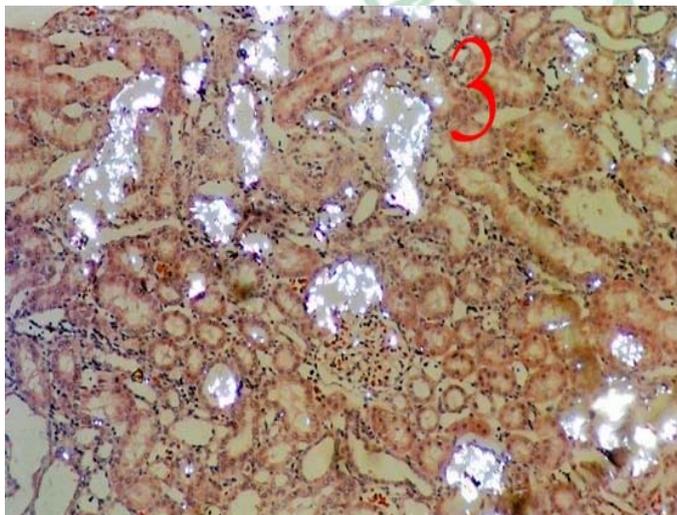


圖3.3.C 給分標準 3+

3-8-2 腎臟切片拍攝成數位化圖片

將鼠腎切片置於40倍偏光顯微鏡下，先大略瀏覽，並調整偏光。再轉換成100倍，以四條虛擬線將腎臟切片(sagittal section)平分成八個區域，如圖 3.4所示。每一區域隨機挑選一個視野，拍攝並存成數位圖片(JPEG格式, 4080 x 3072 pixels)。

全部鼠腎切片總共拍攝成328張圖片，儲存燒錄成DVD光碟片。

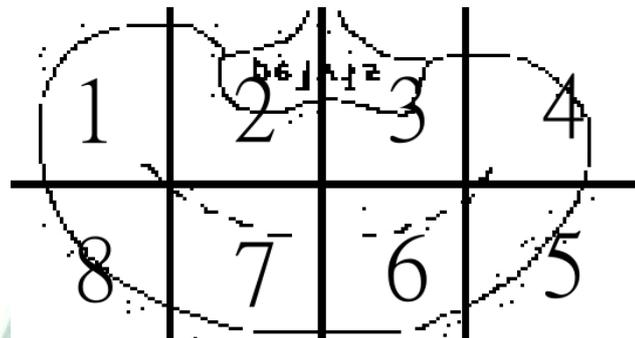


圖 3.4 腎臟切片分區示意圖。以四條虛擬線將腎臟切片平分成八個區域。

3-8-3 成石率計算方式

成石率 = 該組內罹患結石大鼠數目 / 該組大鼠總數目

3-9 圖片瀏覽評分輔助程式

為了增進評分的客觀性，我們自行研發出一個圖片瀏覽輔助軟體，名為：*ImageScoring*，當做輔助，操作界面如圖3.5所示。此軟體可以隨機、匿名方式選出圖片，提供評分者評分，並且繼續自動執行，直至圖片全部評分完畢。程式開發採用*Borland Delphi*[®] version 6.0 (Borland software Co., California)程式語言，資料庫格式採用*dBASEIII*[®]，圖檔格式採用 *jpeg* 格式。

評分員評完所有圖片後，程式可依照評分員姓名、時間將其結果儲存成個人檔案，避免混淆。最後，匯集所有評分檔進行統計分析。

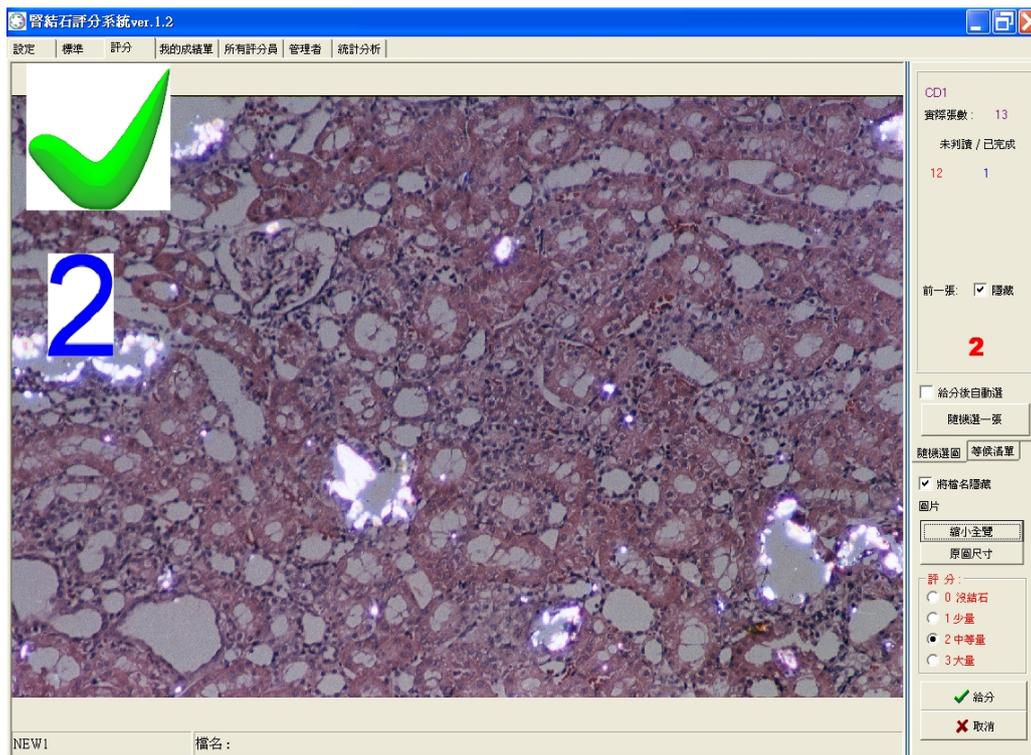


圖 3.5 圖片瀏覽輔助軟體 (ImageScoring) 評分執行畫面

3-10 資料統計分析

體重、血液、尿液等檢驗數據以mean ± S.D.方式表示，使用one-way ANOVA test分析。結晶嚴重度分數之統計分析，各組差異採用 non-parametric Kruskal-Wallis test，兩組間差異採用 Wilcoxon rank sum test (Mann-Whitney U)。p value <0.05視為統計上顯著。

統計軟體採用SPSS® (release 15.0, SPSS Inc., Chicago, Illinois)。

3-11 蛋白質體學研究流程

左側鼠腎經製備後，進行蛋白質體學研究，流程如圖 3.6 所示。

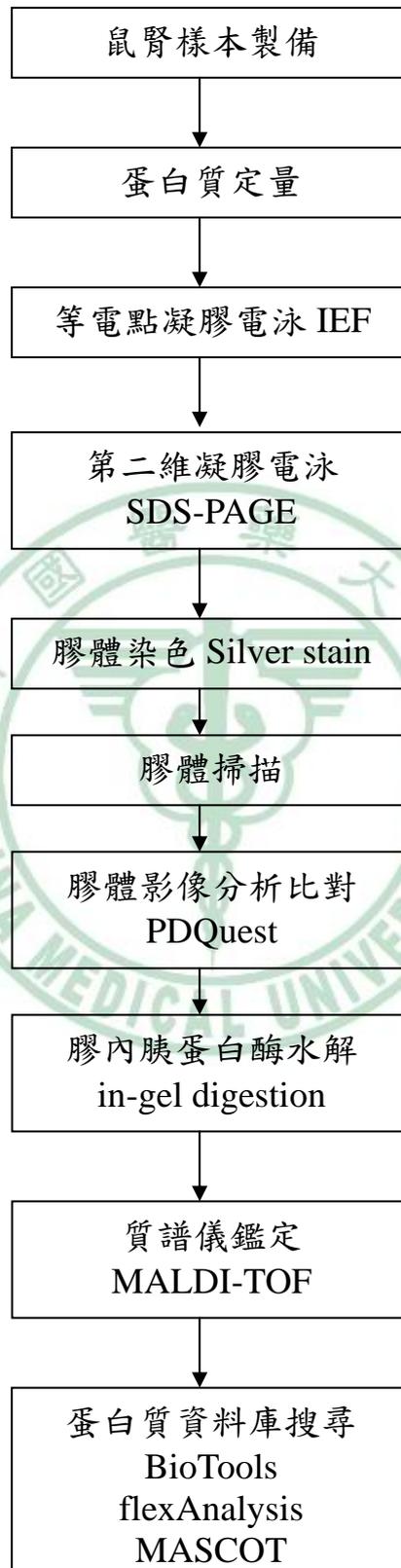


圖 3.6 蛋白質體學研究流程

3-12 鼠腎樣本製備

3-12-1 鼠腎樣本挑選

本研究欲了解實驗組與對照組之間蛋白質體學變化情形，我們挑選各組具有代表性之鼠腎樣本，進行蛋白質體學之研究，樣本之組別歸屬如表3.3所示。

表 3.3 進行蛋白質體學研究之鼠腎樣本

大鼠編號	分組名稱(組別)	結晶分數(平均值)
6	五苓低劑量組(3)	0.05
12	五苓高劑量組(4)	0.05
34	澱粉組(2)	2.15
37	澱粉組(2)	0.70
39	澱粉組(2)	2.75
49	對照組(1)	0.00

3-12-2 組織研磨

1. 將保存於液態氮內的大鼠腎臟取出，切取樣本約全腎四分之一大小。
2. 使用 Phosphate Buffered Saline(PBS)將鼠腎樣本清洗三次，儘量洗去血液及其他干擾雜質。
3. 樣本放入已滅菌研鉢內，加入液態氮與 20 μ l 的蛋白酶抑制劑 (Protease inhibitor cocktail; SIGMA[®]) 研磨至粉末狀，中途可補充液態氮或放冰上磨，以避免組織蛋白變性。
4. 加入 500 ml buffer A ^{註 1}。
5. 離心，4°C，13000 rpm，15 分鐘。
6. 倒出上清液，放置於-80°C 保存。

^{註1} 試劑Buffer A泡製方法：取8M Urea 24 g，加4% CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate $C_{32}H_{58}N_2O_7S$) 2 g，加0.02% 溴酚藍(Bromophenol blue)100 μ l，加二次水至50ml。

3-12-3 丙酮(Acetone)沉澱

1. 取出上一步驟完成之上清液，加入三倍量的 Acetone，置放於冰上操作，此時會有雲霧狀沉澱產生。如果上清液少於 0.5ml 則加入 1.5ml Acetone。
2. 置放於液態氮中，至少 4 小時。
3. 離心，4°C，13000 rpm，15 分鐘。
4. 加入 200 μ l 的 Buffer A 試劑。
5. 進行濃度定量。

3-13 蛋白質定量步驟

儀器：分光光度計 Spectrophotometer Beckman DU 650

定量方法：

本實驗所採用之蛋白質濃度定量方式，是Bradford dye-binding method [101, 102]。樣本液加入Dye reagent (CASNr 7664-38-2 Phosphoric acid, CASNr 67-56-1 Methanol; Bio-RadTM)，使用波長595nm測其吸光值。

以BSA(bovine serum albumin)當標準品，製作不同濃度的測試點，畫出校正線，並以內插法算出樣本液的蛋白質濃度。最後將樣本液調製成濃度：200 μ g 於 350 μ l中，儲存於-80°C下備用。

3-14 等電點聚焦凝膠電泳

所謂的等電點(isoelectric point)，就是一個分子其所帶的淨電荷為零時的pH值，當蛋白質處於等電點時，在電泳時會停止移動，利用此原理達到分離蛋白質之目的。我們先採用等電點聚焦電泳(Isoelectric Focusing; IEF)，進行第一次元橫向的蛋白質分離。

電泳儀：Protean IEF cell (Bio-Rad)如圖3.7。膠條：IPG strips (immobilized pH gradient gel, Bio-Rad readyStrip™, PH 3-10, non-linear, 17 cm)。樣本量：200 μ g in 350 μ l



圖 3.7 Bio-Rad Protean IEF cell 電泳儀

電泳儀之條件參數設定，見表 3.4。

Rehydration 條件設定 active、50V、溫度 20°C。

Conditioning Step(S1)設定 250 V、15 分鐘，此階段使用較低的電壓伏特數來移除鹽類離子與電荷等干擾物質。

Voltage Ramping(S2)設定為 Rapid、HRS:MIN：10000V、hours：03:00。

Final Focusing(S3)選用搭配 17cm 膠條的 10,000 V。

Hold step(S4)設定維持在 500V。Method：RAPID Δ V。

LIMIT / GEL 設為 50 μ A。電泳時間需隔夜。

表 3.4 IEF 電泳儀條件設定 (Preset method for 17 cm strip)

R-Rehydration	Active at 50 V , temp. 20°C
S1-Conditioning Step	250 V for 15 minutes
S2-Voltage Ramping	Rapid HRS:MIN : 10000V vhours : 03:00
S3-Final Focusing	10,000 V →60,000
S4-Hold step	500 V/HOLD

後續處理步驟：

1. 調配試劑(IEF balance buffer^{註1})備用。
2. 等電點聚焦電泳完成後，用夾子將膠條夾起，直立於拭鏡紙上，滴掉上面的礦物油。
3. 將膠條置放於 IEF holder 內，加入 9ml IEF balance buffer，0.18g DTE (Dithioerythritol)，室溫下，混合均勻 15 分鐘。
4. 將膠條夾起，更換至另一個新的 IEF holder 內，加入 9ml IEF balance buffer，0.225g IAA (Iodoacetamide)，室溫下，混合均勻 15 分鐘。混合均勻。

^{註1} IEF balance buffer：

50mM pH 8.8 Tris-HCL 3.3ml, 6M Urea 36g, 30% Glycerol 30ml, 2% SDS (sodium dodecyl sulfated) 2g 加二次水至100ml。

3-15 SDS-PAGE 第二次元電泳

第二次元縱向電泳，採用Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)方式進行，依分子大小再進一步將蛋白質分離。

3-15-1 SDS 膠片調配方法

製備 12 % Tris-glycine SDS Polyacrylamide 膠片 (50 ml/gel)，以供第二次元電泳使用，使用的試劑如表 3.5 所示。

表 3.5 SDS-PAGE gel 配製方法 (50 ml/gel) 12%

試 劑	組 成 份	廠 牌	劑 量 (ml)
H ₂ O			21.50
40% acrylamide mix	CASNr 79-06-1 Acrylamide CASNr 110-26-9 N,N'-methylene-bis-acrylamide	Bio-Rad	15.00
1.5 M Tris (PH8.8)	C ₄ H ₁₁ NO ₃	Amresco	12.50
10% SDS	Sodium dodecyl sulfate	Bio Basic inc.	0.50
10% APS	ammonium persulfate		0.50

3-15-2 第二次元電泳過程

1. 架設電泳膠台，倒入少量75%酒精，檢視是否滲漏。
2. 倒掉酒精，加入50 ml已配妥之12% SDS-PAGE gel (見表3.4)。
3. 加入0.02 ml TEMED(tetramethylenediamine; Amresco)，混合均勻。
4. 加入3-5 ml 75%酒精，將氣泡排擠出來。
5. 待凝固後，將酒精倒掉，以二次水清洗，並將水倒乾。
6. 用夾子，將IEF膠條放置於SDS-PAGE gel上層，放置時避免膠面碰

觸玻璃。

7. 吸20 μ l protein marker放入正極側。
8. 加入0.5% Agarose solution^{註1}，覆蓋於膠條上，勿超出膠台上緣。
9. 待其凝固後，上機，開始電泳。

^{註1} Agarose solution：

取0.5% Agarose 0.5 g溶解，溫度控制在45~50°C，加入電泳緩衝液 (TG-SDS buffer：Tris 0.025 M, Glycin 0.192 M, SDS 0.1 %)，及指示劑(Bromphenol blue) 1 ml。

3-15-3 第二次元電泳條件設定

第二次元電泳儀器採用 BIO-RAD 二維電泳系統(Protein II cell)，條件設定為兩片膠，32mA，time 選 / v-hour，step 1 time：00:30，Step2 constart：60mA，time / v-hour，電泳時間設 99:99，可電泳至隔夜。

3-16 膠體染色

SDS-PAGE電泳完成後，進行膠體染色，試劑採用奇異公司(General Electric Company，GE)的Silver stain kit (PlusOne Silver Staining Kit, Protein)。

膠體染色步驟

1. Fixing：加 30% Ethanol 75 ml，Glacial acetic acid 25 ml，加二次水至 250ml，置於 Lab Rotator (DigiSystem Industrial Inc.) 50 rpm，均勻搖晃 120 分鐘。
2. Sensitizing：倒掉前步驟之溶液，加 Ethanol 75 ml，Sodium thiosulphate 10 ml，Sodium acetate 17 g，加二次水至 250 ml，再加入 1.25 ml glutardialdehyde，置於 Lab Rotator 50 rpm，均勻搖晃 120 分鐘。

3. Silver stain：倒出前步驟之溶液，加 Silver nitrate solution 25 ml，加二次水至 250 ml，再加入 0.1 ml formaldehyde，置於 Lab Rotator 50 rpm，均勻搖晃 120 分鐘。
4. Developing：倒出前步驟之溶液，加 Sodium carbonate 6.25 g，加二次水至 250 ml，再加入 0.2 ml formaldehyde 置於 Lab Rotator 50 rpm，均勻搖晃 4 分鐘。
5. Stop：倒出前步驟之溶液，加 3.65 g EDTA- $\text{Na}_2\text{H}_2\text{O}$ ，加二次水至 250 ml，置於 Lab Rotator 50 rpm，均勻搖晃 120 分鐘。
6. Washing：倒出前步驟之溶液，以二次水清洗五次，每次五分鐘。

3-17 膠體影像擷取與分析

3-17-1 膠體影像擷取

染色後膠片，使用掃描器 Bio-Rad GS-800 Image Densitometer® (California, USA) 進行掃描(圖3.8)，儲存成預設的gsv影像檔格式。

掃描條件設定：Gel: Silver stain, Filter: White, Light: Transmissive, Resolution: X 63.5, Y 63.5 microns。



圖 3.8 掃描器 Bio-Rad GS-800 Image Densitometer

3-17-2 膠體影像分析與蛋白質點比對

前步驟掃描完成之影像檔，採用比對軟體進行蛋白質點之分析。本研究採用PDQuest 8.0.1 試用版(Bio-Rad)(圖3.9)，藉由其experiment wizard之輔助，normalization參數選擇：local regression method。

經比對後，若發現蛋白質點之quantity ratio超出2倍者，視為有差異，則將其列入等待研究之蛋白質點，進行後續的挖膠、蛋白酶水解、質譜儀分析等程序。



圖 3.9 PDQuest 2-D Analysis Software

3-18 膠體內蛋白酶水解

膠體內蛋白酶水解(in-gel digestion)步驟是遵循 Bruker Daltonics™ 公司提供的 Proteomic protocols for mass spectrometry (2008 版本)[103-105]。使用試劑如表 3.6 所示。

(一)、切割蛋白質膠塊

1. 使用二次水清洗膠體兩次，每次 10 鐘。
2. 使用 pipet tip，把蛋白質點從膠體挖出。
3. 取 1.5 ml 的 Eppendoff 試管，使用 100%ACN^{註1} 清洗，風乾。
4. 將膠塊放入 Eppeddoff 試管內。

(二)、膠塊清洗

1. 使用 100 μ l 的 wash buffer^{註2} 清洗膠塊，15 分鐘，每 5 分鐘振盪一次。
2. 移去殘留液體，加入 200 μ l 的去銀染脫色液(Silver destain solution)^{註3}。
3. 脫色時間，不可超過五分鐘。
4. 移除脫色液，以 200 μ l 的 25 mM ammonium bicarbonate buffer^{註4} 清洗膠塊，重覆此步驟兩次，清除染色直至膠塊透明無色。
5. 移去殘留液體，並加入 100 μ l 的 ACN 覆蓋膠塊。
6. 待膠塊縮小後，移去 ACN。
7. 使用真空離心機將膠塊乾燥或任其風乾(air dry)。

(三)、膠內蛋白酶分解(Trypsin)

1. 加入 3 μ l 新鮮配製的酵素溶液(20 ng/ μ l trypsin, in 25 mM NH_4HCO_3)覆蓋膠塊。
2. 4°C，反應 60 分鐘。
3. 加入 3 μ l 的 25 mM NH_4HCO_3 溶液，放置隔夜，並保持濕潤，注意勿加太多溶液。
4. 37°C 下反應，放置隔夜。

(四)、萃取蛋白質胜肽

1. 確認管內是否還有大約 $3\ \mu\text{l}$ 的液體。
2. 加入 $2\ \mu\text{l}$ 的 100% ACN 與 1% TFA^{註5}。
3. 超音波震盪 (sonication) 10 分鐘。
4. 吸出上清液，進行質譜儀分析。

表 3.6 蛋白酶水解使用試劑

試劑名稱	組成份或要求等級
^{註1} ACN (Acetonitrile) 50%	CH ₃ CN (HPLC 等級)
^{註2} wash buffer	2.5 mM NH ₄ HCO ₃ , 50% ACN
^{註3} 脫色液 Silver destain solution	0.1 g Potassium ferricyanide, 0.15 g Sodium thiosulfate in 10 ml Milli Q water
^{註4} Ammonium bicarbonate buffer	NH ₄ HCO ₃
^{註5} TFA 1%	Trifluoroacetic acid
Trypsin solution	20ng/ μl trypsin (sequencing 等級) in 10mM NH ₄ HCO ₃ , pH 8

3-19 質譜儀分析

本研究採用：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 Mass Spectrometer, MALDI-TOF MS)，進行胜肽質量分析。

儀器：Brucker ultraflex III™ mass spectrometer，如圖3.10所示。

Matrix： α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA)。

取前步驟萃取完成之上清液，滴置於質譜儀樣本盤上，滴上matrix (CHCA)覆於其上，待風乾後，送入質譜儀內，進行分析。

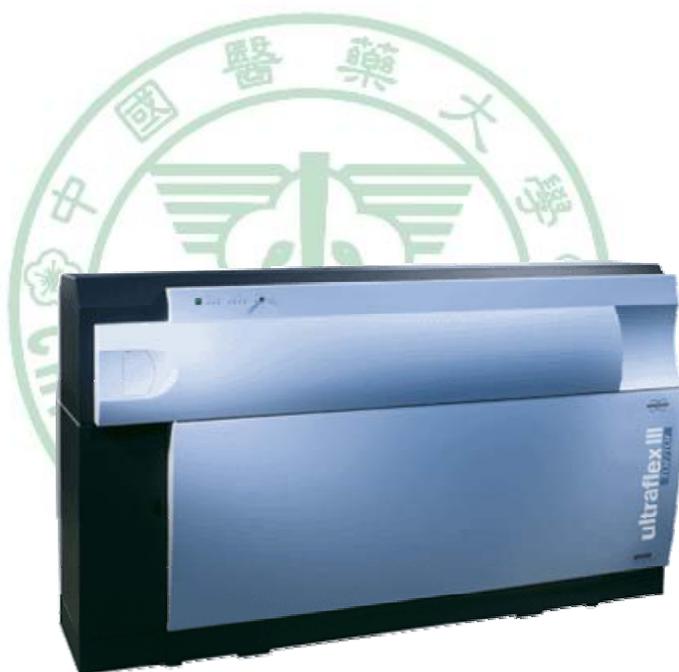


圖 3.10 Bruker ultraflex III mass spectrometer

3-20 蛋白質身份鑑定--網路資料庫比對

本研究同時使用多種工具程式，鑑定比對蛋白質身份。

首先，將質譜儀偵測所得肽數據資料，委由本校貴重儀器中心之蛋白質序列資料庫伺服器比對搜尋，產生鑑定報告。我們再採用 Bruker 公司提供的比對軟體 BioTools™ v.3.0 及 flexAnalysis™ v.3.0 確認比對，並連結上 MASCOT 蛋白質序列資料庫網站搜尋確認，並檢視該蛋白之相關資訊。

MASCOT 網路資料庫搜尋界面，是由 Matrix Science 公司所維護。使用者把質譜儀產生的肽數據，依特定的檔案格式，先經由其搜尋界面(圖 3.11)設定搜尋條件，再透過網際網路(The Internet)傳送給資料庫伺服器，經過內部程式運算，將肽的質量、強度等數據與既有的蛋白質資料庫互相配對比較，並採用一種名為『機率基礎的分子量搜尋計分演算法』(probability-based MOWSE scoring algorithm)計算配對成功的機率[106]。此項分數越高，代表正確配對的機率越高。

MASCOT Peptide Mass Fingerprint

Your name	<input type="text"/>	Email	<input type="text"/>
Search title	20070601_A4.txt, C:\MyPHD\Meeting20070627\ProteinID\20070601_A		
Database	SwissProt		
Taxonomy	All entries		
Enzyme	Trypsin	Allow up to	1 missed cleavages
Fixed modifications	Biotin (N-term) Carbamidomethyl (C) Carbamyl (K) Carbamyl (N-term) Carboxymethyl (C)	Variable modifications	Methyl (DE) Methylthio (C) NIPCAM (C) Oxidation (HW) Oxidation (M)
Protein mass	<input type="text"/> kDa	Peptide tol. ±	100 ppm
Mass values	<input checked="" type="radio"/> MH ⁺ <input type="radio"/> M _r <input type="radio"/> M-H ⁻	Monoisotopic	<input checked="" type="radio"/> Average <input type="radio"/>
Data file	<input type="text"/>		
Query	837.528000 861.062000 877.032000 893.005000 916.563000 945.544000		
Decoy	<input type="checkbox"/>	Report top	AUTO hits

圖 3.11 MASCOT 網路資料庫搜尋界面

本實驗所使用 MALDI-TOF 質譜儀，其產生的胜肽片段(peptide fragment)以質量(mass value)與強度(intensity)為主，因此配對方式以 PMF(peptide mass fingerprint)為主，與序列資料庫 NCBIInr，SwissProt，MSDB 等進行配對。

實驗結果，如果配對分數超出顯著水準者，我們稱之為「有效配對」(亦即 significant match)，則將其列為尋獲的蛋白質，並進一步探討其可能之作用機轉。搜尋條件設定如下：Type of search (Peptide Mass Fingerprint), Enzyme (Trypsin), Global modification (Carboxymethyl (C)), Variable modifications (Oxidation (M)), Mass values (MH+; Monoisotopic), Protein Mass (Unrestricted), Peptide Mass Tolerance (± 100 ppm), Peptide Charge State (1+), Max Missed Cleavages (1)。

除此之外，我們也採用簡易版的 Mascot 搜尋界面逐一比對。Mascot 提供一個簡易版的伺服器界面，名為 Mascot Wizard (圖 3.12) ，讓無法建構完整伺服器的使用者，也能從家中個人電腦完成比對工作。不過使用前必須先自行將胜肽片段質量數據(mass value)，轉換成文字檔格式 (txt)，再將此檔拖弋進入 Mascot Wizard 執行畫面，即可連線上網比對，而其結果將會以網路瀏覽器格式傳回給使用者。

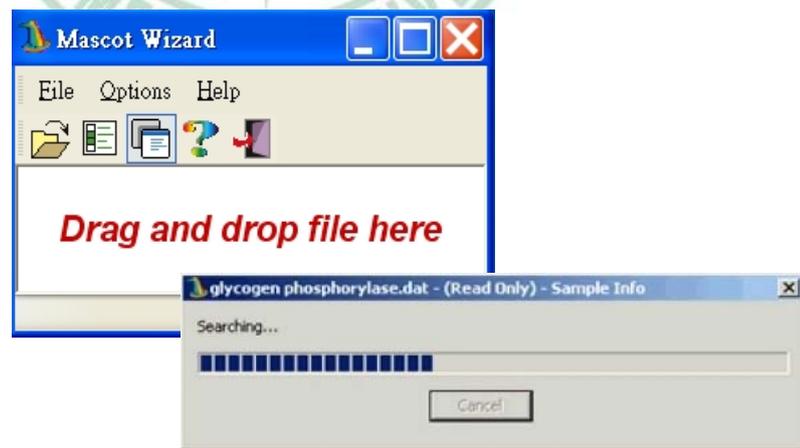


圖 3.12 Mascot Wizard 簡易版搜尋界面

為了簡化檔案轉換的前置處理作業，筆者自行撰寫一個轉換程式做為輔助，名為 PIDwizard，見圖 3.13。

本實驗中每一個樣本點分析後產生的質譜數據檔案之中，有一名為 peaklist.xml 的檔案，此檔記錄著質量、強度等數據；此程式可先行搜尋檔案資料夾，將此檔找出，再將此 xml (extensive markup language) 檔案解析(parsing)，並取出 mass value 及 intensity 數據，存成 txt 文字檔格式，即可進入 Mascot Wizard 逐一執行比對。

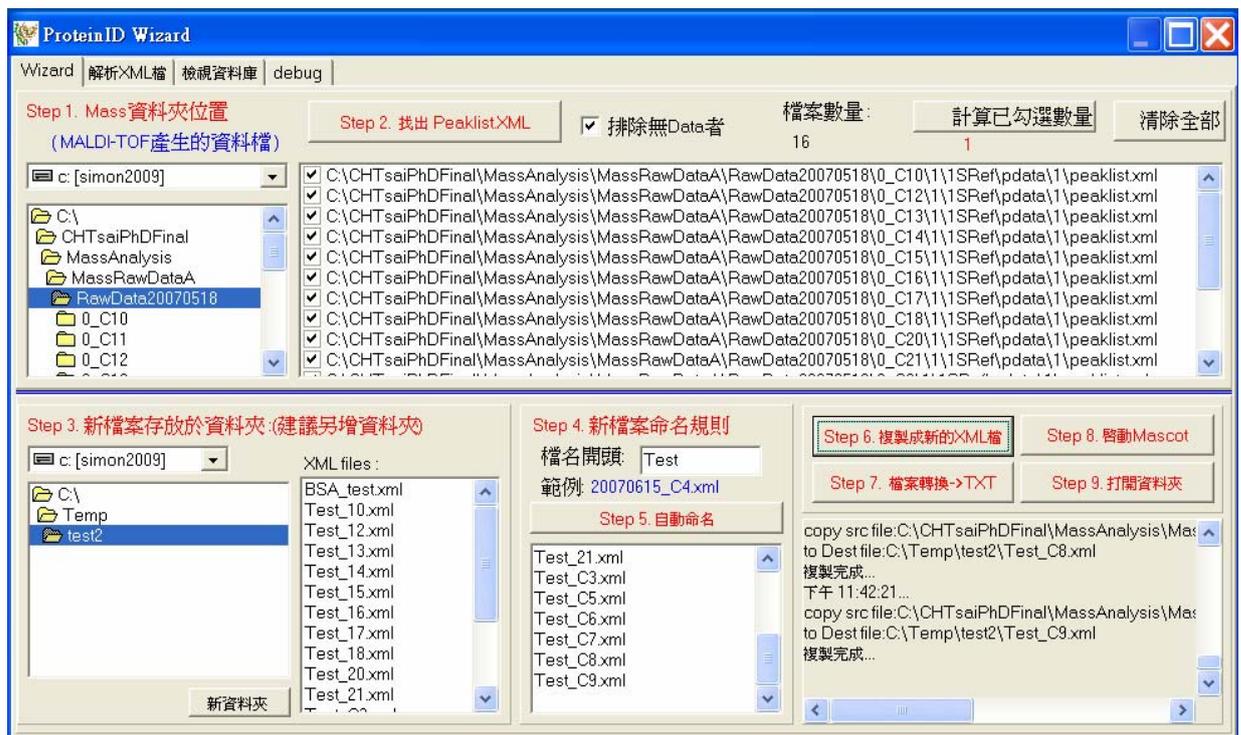


圖 3.13 PIDWizard 執行畫面

兩程式的搭配整合示意圖，如圖 3.14 所示。為了測試轉檔的正確性，我們使用原廠提供的樣本檔案(Bovine serum albumin)經 PIDWizard 轉換後，交由 MascotWizard 進行搜尋比對，其結果見圖 3.15，可見其正確配對結果。

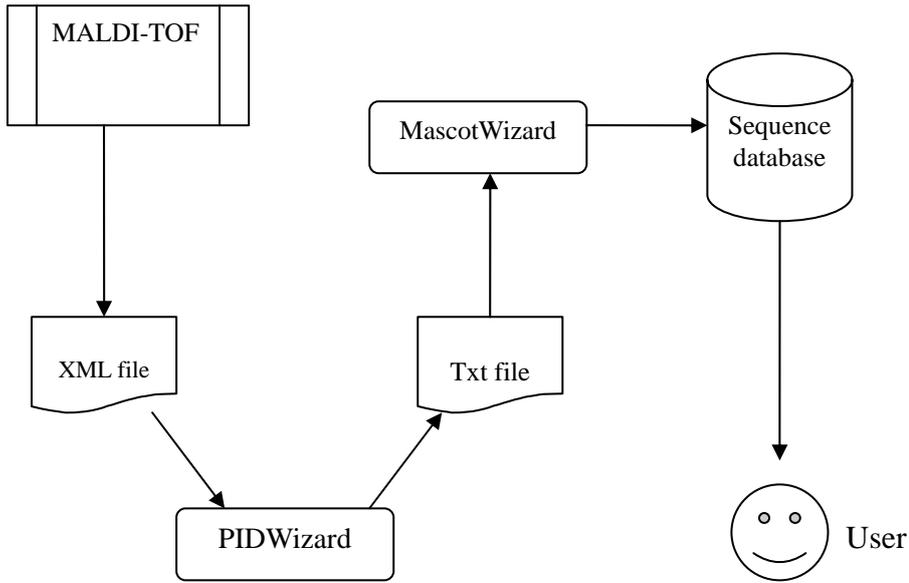


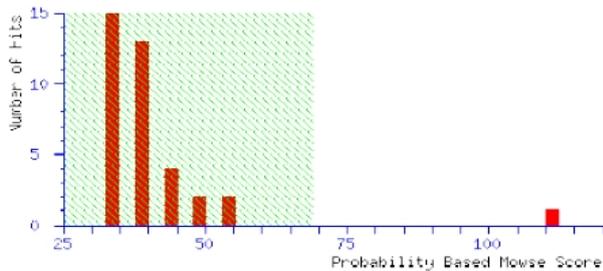
圖 3.14 MascotWizard 與 PIDWizard 整合示意圖

```

User      : Mascot Wizard
Email     : ivy.uro@msa.hinet.net
Search title : BSA_test.txt, C:\Temp\test2\BSA_test.txt submitted from Mascot Wizard on SIMON2009
Database  : SwissProt 57.0 (428650 sequences; 154416236 residues)
Timestamp : 18 Apr 2009 at 15:40:23 GMT
Top Score : 111 for ALBU_BOVIN, Serum albumin OS=Bos taurus GN=ALB PE=1 SV=4
  
```

Probability Based Mowse Score

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 69 are significant ($p < 0.05$).



Concise Protein Summary Report

[Help](#)

Significance threshold $p < 0.05$ | Max. number of hits 5

```

1. ALBU\_BOVIN   Mass: 71279   Score: 111   Expect: 3.4e-06   Queries matched: 14
   Serum albumin OS=Bos taurus GN=ALB PE=1 SV=4
  
```

圖 3.15 PIDWizard 搜尋 Bovine serum albumin 之傳回結果

第四章 結果 Results

4-1 實驗前後的血液、尿液數據變化

實驗開始前，各組大鼠的血液、尿液基本數據，並無明顯差異(表 4.1)。這些數據包括尿磷(urine phosphorus)，尿游離鈣(urine free calcium)，尿液酸鹼值(urine pH value)，血鈣(serum calcium)以及血磷(serum phosphorous)等，並無顯著不同。

表 4.1 實驗開始前大鼠的血液生化尿液數據

Baseline Data	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
	Normal control	EG + Starch (placebo)	EG + WLS (low dose)	EG + WLS (high dose)
Urine Phosphorus (mg/dl)	22.16 ± 0.84	22.64 ± 0.40	21.90 ± 0.45	22.07 ± 0.60
Urine free Calcium (mmol/L)	0.79 ± 0.39	1.05 ± 0.40	0.84 ± 0.24	0.62 ± 0.31
Urine pH	6.48 ± 0.53	6.50 ± 0.24	6.50 ± 0.14	6.53 ± 0.45
Serum Calcium (mg/dl)	6.92 ± 1.41	6.88 ± 1.14	7.01 ± 1.12	6.73 ± 3.32
Serum Phosphorus (mg/dl)	21.96 ± 2.08	21.43 ± 2.03	22.26 ± 5.40	20.77 ± 1.46

EG: 乙二醇 WLS: 五苓散

數據以平均值±標準差(Mean ± S.D.)表示。統計方法使用one-way ANOVA test。
實驗開始前，四組大鼠的尿液血液等生化數據並無顯著差異。

實驗後數據詳見表4.2。比較四組尿液中游離鈣濃度，安慰劑組(EG+starch)濃度最低(0.19 ± 0.06 mmol/L)，但是未達統計上顯著($p=0.059$)。血清游離鈣濃度，在接受五苓散餵食的兩組(第3組與第4組)明顯地低於安慰劑組($p=0.001$)，第3組(低劑量組)是 0.91 ± 0.07 mmol/L，第4組(高劑量組)是 0.94 ± 0.17 mmol/L，而安慰劑組(第2組)則是 1.10 ± 0.06 mmol/L。安慰劑組的血磷值是 9.45 ± 2.26 mg/dl，明顯低於正常對照組的 12.54 ± 1.25 mg/dl ($p=0.015$)。除此之外，兩組餵食五苓散大鼠的血液酸鹼值(pH)也顯著地低於安慰劑組，分別是第3組的 6.96 ± 0.07 ，第4組的 6.96 ± 0.17 ，而安慰劑組是 7.13 ± 0.09 ($p=0.006$)。五苓散高劑量組(第四組)大鼠的尿磷值是 19.36 ± 2.59 mg/dl，明顯地低於正常對照組的 20.98 ± 1.12 mg/dl ($p=0.021$)。其他數據如：尿游離鈣、尿酸鹼值以及血清鈣值在四組之中都沒有不同。

表 4.2 實驗後大鼠的血液生化尿液數據變化

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
	Normal control	EG + Starch (placebo)	EG + WLS (low dose)	EG + WLS (high dose)
Urine Phosphorus (mg/dl)	20.98 ± 1.12	19.52 ± 0.68	20.40 ± 0.82	19.36 ± 1.59 ^a
Urine free Calcium (mmol/L)	0.35 ± 0.21	0.19 ± 0.06	0.40 ± 0.12	0.28 ± 0.08
Urine pH	6.92 ± 0.45	6.74 ± 0.32	6.46 ± 0.36	6.57 ± 0.12
Serum Calcium (mg/dl)	11.24 ± 0.26	10.69 ± 0.59	11.11 ± 0.92	10.69 ± 0.59
Serum Phosphorus (mg/dl)	12.54 ± 1.25	9.45 ± 2.26 ^a	10.84 ± 1.68	11.10 ± 1.66
Serum free Calcium (mmol/L)	1.09 ± 0.07	1.10 ± 0.06	0.91 ± 0.07 ^{ab}	0.94 ± 0.17 ^{ab}
Serum pH	7.11 ± 0.16	7.13 ± 0.09	6.96 ± 0.07 ^b	6.96 ± 0.17 ^b

EG: 乙二醇 WLS: 五苓散 Starch: 澱粉

數據以平均值±標準差(Mean ± S.D.)表示。統計方法使用one-way ANOVA test。

a 代表與正常對照組比較後有顯著差異者。*b* 代表與安慰劑組比較後有顯著差異者。

4-2 實驗前後大鼠的體重變化

大鼠的體重，在實驗開始之前，各組之間並無顯著不同(表4.3)。實驗結束後，我們發現安慰劑組(group 2)大鼠的體重增加情形明顯地減緩($p=0.007$)，該組在實驗期間平均體重僅增加 $130.63 \pm 23.06g$ ，相較於正常對照組(Group 1)的體重增加平均值 $179.63 \pm 13.41g$ ，明顯的偏低。但是，餵食五苓散的第3及第4組，卻可以有效地逆轉這種體重增加遲緩的現象，第3組的體重增加平均值是 158.13 公克，而第4組的體重增加平均值是 $156.25g$ ；相較之下，餵食安慰劑的大鼠體重增加平均值只有 $130.63g$ 。腎臟重量，各組間並無差異。

表 4.3 五苓散對於大鼠體重及腎臟重量的影響

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
	Normal control	EG + Starch (placebo)	EG + WLS (low dose)	EG + WLS (high dose)
體重增加值 Body-weight-gain (gm)	179.63 ± 13.41	130.63 ± 23.06 ^a	158.13 ± 30.58	156.25 ± 37.77
Kidney weight, left (gm)	1.83 ± 0.34	1.83 ± 0.33	1.64 ± 0.47	1.68 ± 0.07
Kidney weight, right(gm)	1.91 ± 0.50	1.74 ± 0.21	1.73 ± 0.49	1.66 ± 0.18

EG: 乙二醇 WLS: 五苓散 Starch: 澱粉

數據以平均值±標準差(Mean ± S.D.)表示。統計方法使用one-way ANOVA test。

^a 代表與正常對照組比較後有顯著差異者。

體重增加值(body-weight-gain)的計算方式是每隻大鼠實驗後的體重減去實驗前的體重。結果顯示：與對照組比較之下，安慰劑組大鼠的體重增加值明顯地減少($p=0.007$)。

4-3 腎臟病理變化

檢視腎臟組織切片發現，正常對照組的大鼠腎臟都沒有鈣化結晶現象。但是，飲用含有乙二醇添加水的其它三組大鼠，在它們的腎皮質或腎髓質部位，都可以發現程度不等的結晶沉積現象。使用光學偏光顯微鏡檢視之下，此種結晶呈現出特殊的雙折射特徵(birefringent appearance)，有如圖4.1所示。同時也發現多項病理變化：腎小管內結晶、結晶塊阻塞集尿管腔、腎管上皮細胞損傷、組織間質發炎反應以及巨噬細胞吞食結晶等現象(圖4.2~圖4.4)。

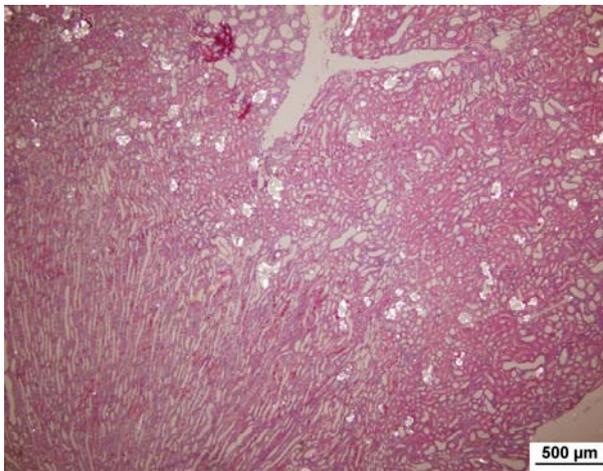


圖 4.1 草酸鈣結晶呈現雙折射特徵

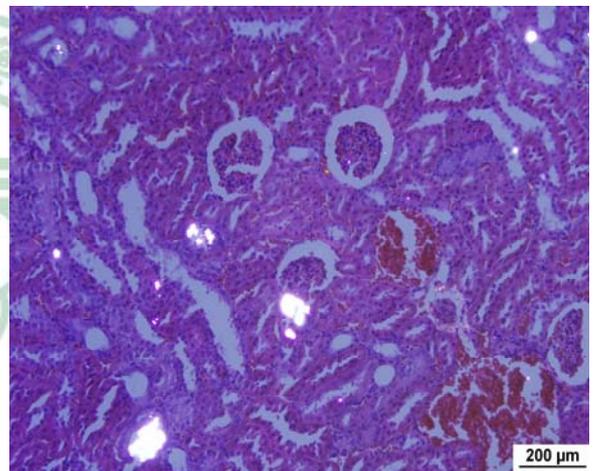


圖 4.2 結晶阻塞腎小管

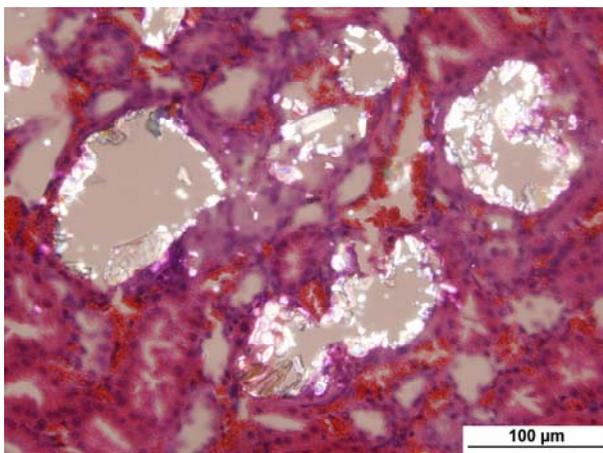


圖 4.3 腎小管上皮細胞損傷發炎

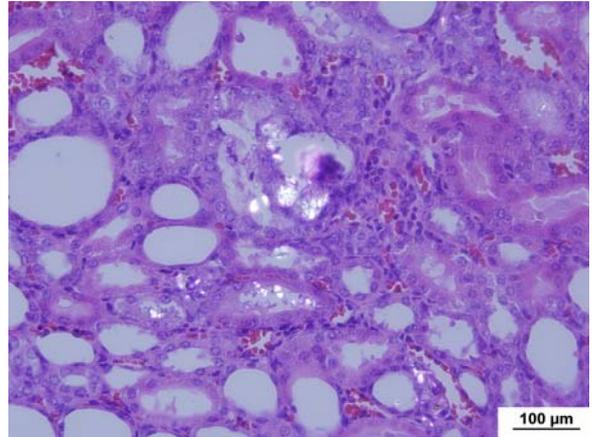


圖 4.4 吞噬細胞包圍結晶體

4-4 腎結晶嚴重度評分結果

結晶沉澱嚴重度評分的分析結果顯示，餵食五苓散的兩組(第3組與第4組)大鼠的腎結晶程度，顯著地低於安慰組($p=0.034$)，如表4.4所示。

安慰劑組的嚴重度平均分數是1.40，低劑量組是0.46，而高劑量組是0.45。使用Kruskal-Wallis test統計方法分析，顯示出此三組的「腎結晶嚴重度分數」具有顯著性的差異($p=0.034$)。代表餵食五苓散的確可以有有效的抑制腎內草酸鈣的結晶沉積。

再以Mann-Whitney U test，分別比較各實驗組與安慰劑組的差異，顯示第3組($p=0.019$)與第4組($p=0.035$)的「腎結晶嚴重度分數」，都顯著地低於安慰劑組。

表 4.4 腎結晶嚴重度評分結果

組別	動物數量	餵食方式	結晶分數 (平均值±標準差)	P value
Group 2	11	EG + Starch	1.40 ± 1.20	
Group 3	11	EG + WLS(low dose)	0.46 ± 0.72 *	0.019 *
Group 4	11	EG + WLS(high dose)	0.45 ± 0.88 *	0.035 *

結晶分數以平均值±標準差(Mean ± S.D.)表示之。

使用 Kruskal-Wallis test 比較三組之差異， $p=0.034$ 。

* 代表使用 Mann-Whitney U test 分析，各實驗組與安慰劑組之間有顯著性差異者。

4-5 結石發生率與相對危險性分析

各組的「結石發生率」計算方法是：該組有結晶的大鼠數量除以該組大鼠的總數量。表4.5呈現出各組的結石發生率與相對危險性(relative risk)的結果，從此表可看出，安慰劑組(group 2)的結石發生率高達90.9%，而餵食低劑量五苓散組(group 3)的結石發生率降到81.8%，餵食高劑量五苓散組(group 4)的結石發生率降到72.7%。此一結果表示餵食五苓散可以有效的減少大鼠腎結石的發生機率。

同時，與安慰劑組相較之下，餵食五苓散的兩組大鼠其罹患腎結石的相對危險性(relative risk)也比較低：低劑量組是0.90，而高劑量組是0.80。

表 4.5 大鼠腎結石發生率與相對危險性分析

組別	有結石的大鼠數量	無結石的大鼠數量	該組大鼠總數	結石發生率	Relative risk	95%信賴區間
1. Normal	0	8	8	0 %		
2. Placebo	10	1	11	90.9 %	1.00	
3. Low dose	9	2	11	81.8 %	0.90	0.0347 ~ 5.8437
4. High dose	8	3	11	72.7 %	0.80	0.0231 ~ 3.0801

相對危險比(relative risk)：第 3、4 組分別與安慰劑組(第 2 組)比較。

4-6 蛋白質比對結果

Mascot 網路資料庫的搜尋法則，係採用 probability based Mowse scoring 演算法[106]。此項分數越高，代表正確配對成功的機率越高。我們把分數超出顯著水準(significant level < 5%)的蛋白質比對結果，列為本研究所尋獲之蛋白質，分別列示於表 4.6 至表 4.8。

在安慰劑組中發現的蛋白質 AGT2 (丙氨酸乙醛酸轉氨酶; Alanine-glyoxylate aminotransferase 2; EC 2.6.1.44)，其功能是藉由 Cofactor: pyridoxal 5'-phosphate 的輔助，催化 L-alanine 與 glyoxylate 作用，產生 pyruvate 與 glycine；此酵素與解毒有關。從網路資料庫比對結果出此一蛋白質，呈現於圖 4.5。從圖 4.6 與圖 4.7，可看出 AGT2 在膠片上的相關位置。

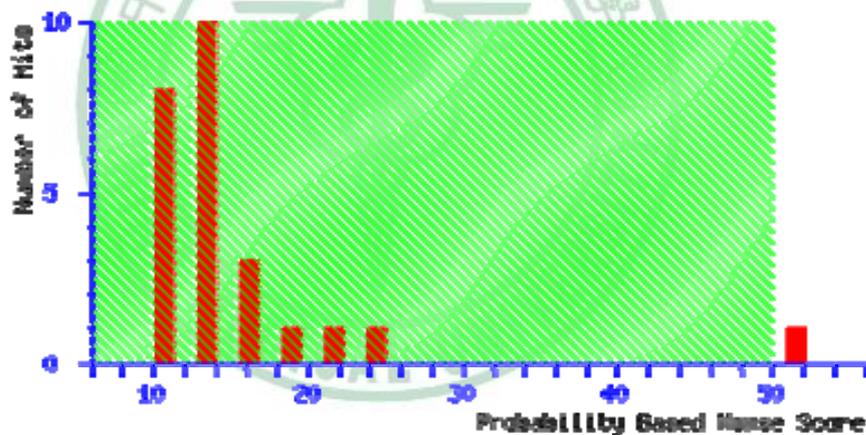


圖 4.5 AGT2 網路資料庫比對結果

AGT2; Alanine-glyoxylate aminotransferase 2, mitochondrial precursor - *Rattus norvegicus* (Rat)

Score: Probability Based Mowse Score 52

Nominal mass (M_r): 57164; Calculated pI value: 8.33

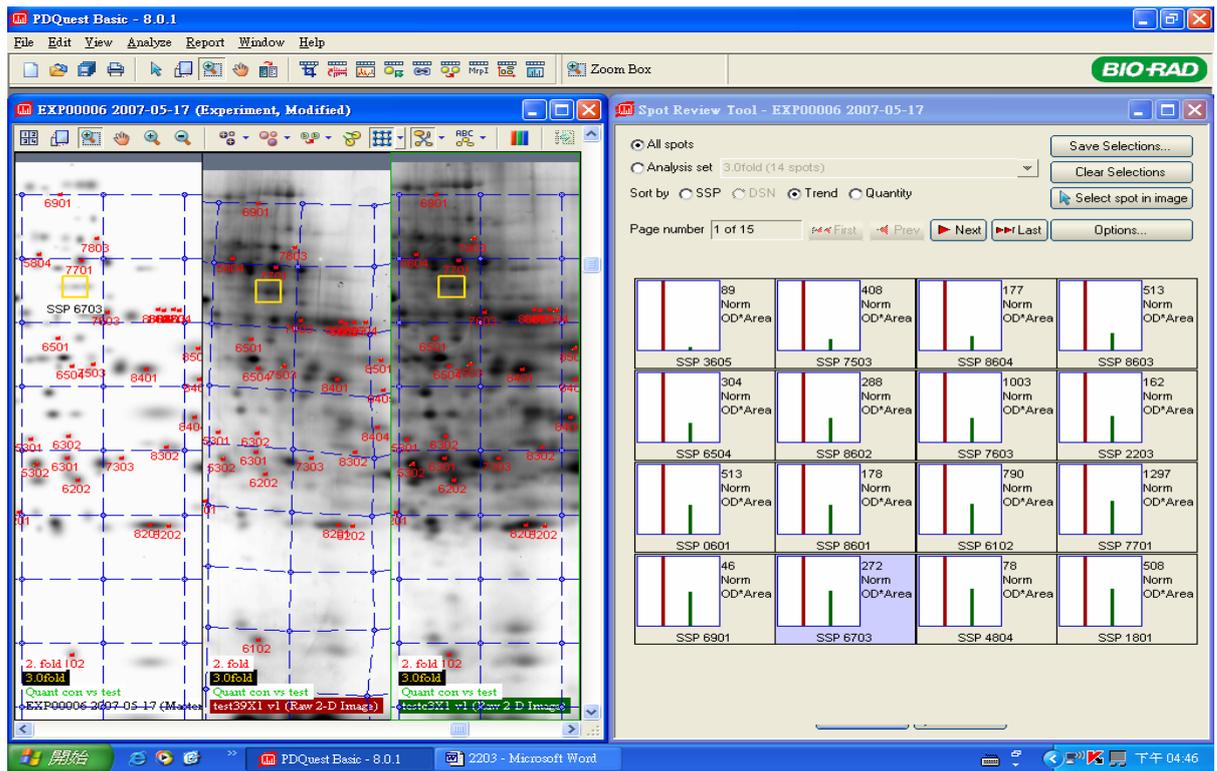


圖 4.6 AGT2 膠片比對圖。AGT2 係由中間膠片編號 6703 蛋白質挖出。中間膠片是安慰組，右側膠片是對照組。

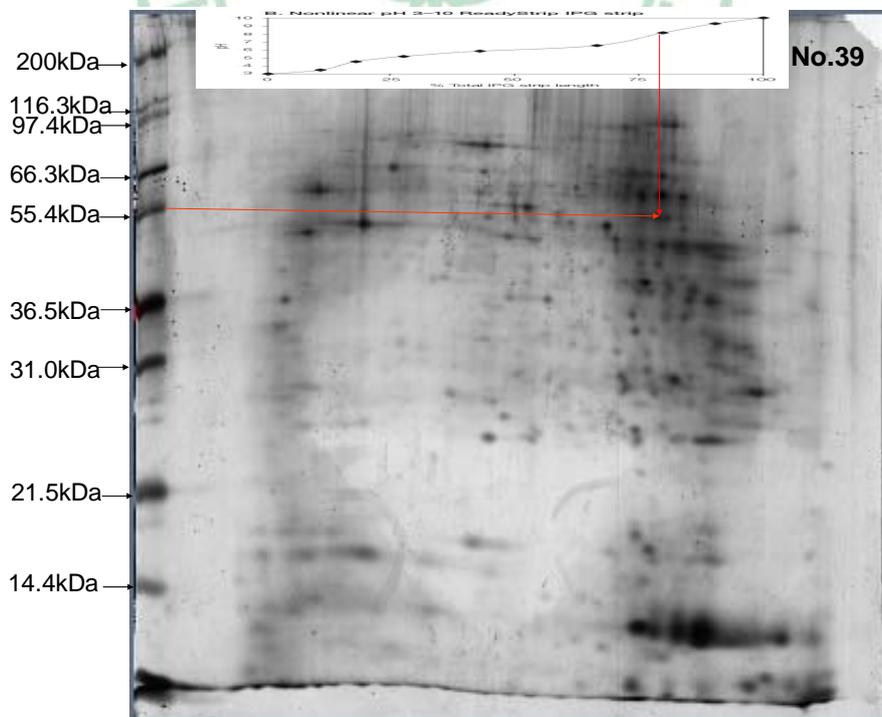


圖 4.7 AGT2 在膠片上位置

萃取對照組與安慰劑組腎組織的RNA，並施行反轉錄(reverse transcription)(使用引子primer 5'-ctt ctg tgg cca cgt caa t-3' forward, 5'-cgt cat cca tgg cga act-3' reverse)，再進行定量聚合酶連鎖反應(quantitative real-time PCR)比較兩組之表現量差異。發現腎結石組鼠腎AGT2的 mRNA表現量明顯地高於正常組，達2.69倍($p < 0.05$)，如圖4.8所示。

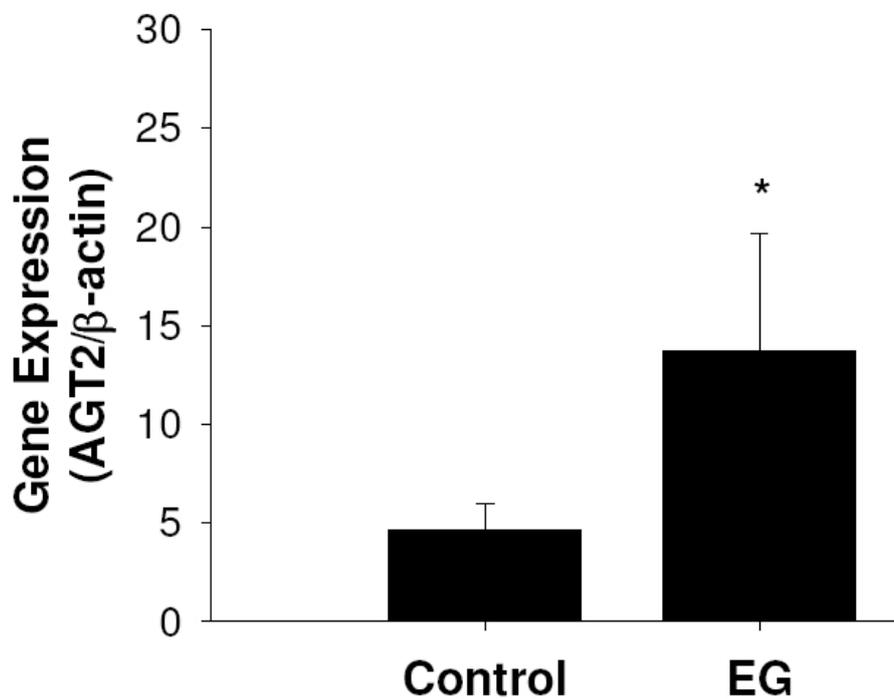


圖 4.8 正常組與安慰劑組腎臟 AGT2 的 mRNA 定量比較圖。安慰劑組的 mRNA 表現量高於正常組的 2.69 倍 ($p < 0.05$)

表 4.6 蛋白質鑑定結果 (對照組)

G	R	Cp	protein ID	Tx	RecName	AltName	Accession	Sc	Cv	MW	Id	Md
1	42	B13	aldo-keto reductase family1,member A1(NADPH2, aldehyde reductase)	R	aldo-keto reductase family1, member A1 (NADPH2, aldehyde reductase)	Aldehyde reductase; Akr1A1	gi 13591894	107	21	36715	I	
1	42	B14	G3P_Rat, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)	R	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.12)	GAPDH	gi 62318276	100	39	36095	I	
1	42	B15	ETFA_Rat, electron transferring flavoprotein, alpha polypeptide	R		ETFA	gi 57527204	117	44	35277	I	
1	42	B17	G3P_Rat, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)	R	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.12)	GAPDH	gi 62318276	102	41	36095	I	
1	43	A04	ACT_HYDAT, Actin non-muscle 6.2	H	Actin non-muscle 6.2			102	35	42002	I	
1	43	B08	aldo-keto reductase family1,member A1(NADPH2, aldehyde reductase)	R	aldo-keto reductase family1, member A1 (NADPH2, aldehyde reductase)	Aldehyde reductase; Akr1A1	gi 13591894	97	12	36715	I	
1	43	B08	AK1R1_Rat, Alcohol dehydrogenase [NADP+]	R	aldo-keto reductase family1,member A1	Aldehyde reductase; Akr1A1	gi 13591894	76	31	36715	I	

欄位說明：

G:組別 R:大鼠編號 Cp: Chip Position Tx: Taxonomy RecName: 正式名稱 AltName: 簡稱

Sc: Mascot Score Cv: Mass peptide Coverage (%) MW: Protein Molecular weight Id: identity status Md: match method

Group: 1 control 2 EG+Starch 3 低劑量 WLS+EG 4 高劑量 WLS+EG

Taxonomy (R: Rattus norvegicus, H: Hyda vulgaris, M: Mus musculus, S: Homo sapiens)

identity status : I: identified, U: uncertain Method (T100: tryptic map 100 ppm , T150: tryptic map 150 ppm)

表 4.7 蛋白質鑑定結果 (第二組 安慰劑+EG)

G	R	Cp	protein ID	Tx	RecName	AltName	Accession	Sc	Cv	MW	Id	M
2	39	C07	SMC1A_RAT, Structural maintenance of chromosomes protein 1A	R	Structural maintenance of chromosomes protein 1A	SMC-protein		59	24	143116	I	
2	39	C08	GRB14_RAT, Growth factor receptor-bound protein 14	R	Growth factor receptor-bound protein 14	GRB 14 adapter protein		53	26	60554	I	
2	39	C08	SLMAP_RAT, Sarcolemmal membrane-associated protein	R	Sarcolemmal membrane-associated protein	SLMAP		53	17	99033	I	
2	39	C09	ZFP90_RAT, Zinc finger protein 90	R	Zinc finger protein 90	Zfp-90		51	34	72392	I	
2	39	C12	LMNA_RAT, Lamin-A	R	Lamin-A	Lmn 1		57	35	74569	I	
2	39	C12	SMC1A_RAT, Structural maintenance of chromosomes protein 1A	R	Structural maintenance of chromosomes protein 1A	SMC-protein		60	28	143116	I	
2	39	C15	AGT2_RAT, Alanine--glyoxylate aminotransferase 2, mitochondrial precursor	R	Alanine--glyoxylate aminotransferase 2, mitochondria	AGT 2	EC2.6.1.44	52	12	57164	I	
2	34	H04	unnamed protein product	R				79	26	70670	U	T150

欄位說明：

G:組別 R:大鼠編號 Cp: Chip Position Tx: Taxonomy Sc: Mascot Score Cv: Mass peptide Coverage (%)

RecName: 正式名稱 AltName: 簡稱 MW: Protein Molecular weight Id: identity status Md: match method

Group: 1 control 2 EG+Starch 3 低劑量 WLS+EG 4 高劑量 WLS+EG

Taxonomy (R: Rattus norvegicus, H: Hyda vulgaris, M: Mus musculus, S: Homo sapiens)

identity status : I: identified, U: uncertain Method (T100: tryptic map 100 ppm , T150: tryptic map 150 ppm)

表 4.8 蛋白質鑑定結果 (五苓散+EG 組)

G	R	Cp	protein ID	Tx	RecName	AltName	Accession	Sc	Cv	MW	Id	M
4	12	G16	carbohydrate (N-acetylglucosamine 6-O) sulfotransferase 5	R				59	16	47285	U	T150
4	12	G18	potassium voltage-gated channel, Isk-related subfamily, gene	R				61	22	1437	U	T150
4	12	G19	rCG24972	R				55	80	4571	U	T150
4	12	G22	electron-transfer-flavoprotein, beta polypeptide	R				67	30	27898	I	T150

欄位說明：

G:組別 R:大鼠編號 Cp: Chip Position Tx: Taxonomy Sc: Mascot Score Cv: Mass peptide Coverage (%)
 RecName: 正式名稱 AltName: 簡稱 MW: Protein Molecular weight Id: identity status Md: match method
 Group: 1 control 2 EG+Starch 3 低劑量 WLS+EG 4 高劑量 WLS+EG
 Taxonomy (R: Rattus norvegicus, H: Hyda vulgaris, M: Mus musculus, S: Homo sapiens)
 identity status : I: identified, U: uncertain Method (T100: tryptic map 100 ppm , T150: tryptic map 150 ppm)

第五章 討 論

5-1 五苓散治療腎結石的機轉探討

我們的先期研究，已經證實五苓散在體外，可以有效抑制草酸鈣的三項成石過程：成核(nucleation)，結晶(crystallization)，以及聚集(aggregation)現象，從該研究中發現，五苓散萃取液可藉由抑制草酸鈣結晶核心形成，以及抑制晶體彼此聚集的作用機轉，來達到抑制作用[12, 13]。經由分光光度計分析結果發現，五苓散萃取液濃度達到6.25mg/ml以上時，即可明顯抑制結晶之成核作用(nucleation)，並呈現劑量正相關效應(dose-dependent)。而在其濃度達到3.125mg/ml以上時，也可以明顯抑制晶體之聚集現象(aggregation)，同樣也存在著劑量正相關的效應關係(dose-dependent)。

中醫方劑的發明具有悠久的歷史淵源，我們的祖先們在對抗疾病的過程中，發現了能夠治病的藥草，歷經千百年來不斷的臨床實驗，更把多種藥草組合運用，進化成為所謂的「方劑」[107, 108]。方劑的發明約在夏商時代，方劑的療效優於單味藥草，其組成又有「君臣佐使」之別，此為古代醫者臨症治療之辨症構思。

五苓散此方，自從東漢《傷寒論》一書記載以來，延用迄今已超過兩千年仍未被淘汰，可見其具備臨床療效[14]。明清醫家運用此方治療「石淋」之症，更可讓砂石從病患尿液中排出。五苓散的組成藥物，有多種已被證實確實具有治療結石的功效[15-18]。但是，從我們先期研究也發現到，個別的組成藥物在體外實驗中的結晶抑制效果，卻不如五苓散複方來得好。

從中醫觀點，腎結石的辨證分型可分為：「濕熱夾雜、瘀血內阻、陰虛火旺、脾腎氣虛」等類型。木通、化石草、車前子、藕節、蒲黃、五靈脂、山藥、扁豆、黃耆等都是常用的治療藥材。有些臨床中醫師認為「石淋」多為濕熱蘊結，尿液煎熬，氣化不利所致，是故投與桂枝茯苓丸以通陽化氣、化瘀扶正，達到排石效果[109]。

五苓散預防結石的確實機轉，目前尚未明瞭，其中可能涉及蛋白質

的表現。從文獻上也有不少例證，五苓散的組成藥物：澤瀉(*Alisma orientalis*)和茯苓(*Poria Cocos Wolf*)，經證實都具有抑制結石形成的作用。Suzuki的體外實驗指出：澤瀉可以強力抑制草酸鈣結晶過程的每一步驟[29]。尹氏等報導指出：在體外實驗，澤瀉可以抑制草酸鈣結晶的成長與聚集，而經餵食澤瀉的大鼠腎臟的鈣含量也降低[110]。王氏等研究證實：在經由glyoxylic acid誘發的鼠腎結石模式中，澤瀉可以降低「骨橋蛋白」(Osteopontin)的mRNA表現量[111]。此外，多項研究也發現「澤瀉」的確可以減少結石形成，並且能夠調降inter-alpha-trypsin inhibitor，bikunin和Osteopontin的表現量[15, 112]。

Hattori研究指出，茯苓萃取物(*Poria Cocos Wolf*)可以有效治療實驗大鼠的腎臟炎(original-type anti-GBM nephritis)，並推測其機轉是藉由抑制腎絲球內的C3沉積而達成的[17]。除此之外，對於其它類的腎結石，例如餵食高磷食物大鼠所產生的hydroxylapatite腎結石，五苓散也具有抑制作用[16]。

在本研究之中，我們證實五苓散在動物體內可以有效的抑制草酸鈣腎結石。從腎切片的結晶沉澱嚴重度評分，結果顯示：餵食五苓散的大鼠腎結晶程度，明顯的低於只餵食安慰劑的大鼠($p=0.034$)(表4.4)。此外，從結石發生率、相對危險比等觀點，結果看出：餵食五苓散可以有效的減少大鼠腎結石發生率(高劑量組72.7%，低劑量組81.8%，安慰劑組90.9%)(表4.5)。

同時，與安慰劑組對比之下，餵食五苓散的兩組大鼠其罹患腎結石的相對危險性(relative risk)也比較低：低劑量組是0.90，而高劑量組則是0.80。總結上述，五苓散的確是一個預防腎結石的有效方劑。

5-2 蛋白質扮演的角色

5-2-1 本研究發現的蛋白質

本研究從安慰劑組中發現蛋白質 AGT2 (丙氨酸乙醛酸轉氨酶; Alanine-glyoxylate aminotransferase 2; EC 2.6.1.44)，其功能是藉由 Cofactor: pyridoxal 5'-phosphate 的輔助，催化 L-alanine 與 glyoxylate 作用，產生 pyruvate 與 glycine(圖 5.1)。此酵素與解毒有關。

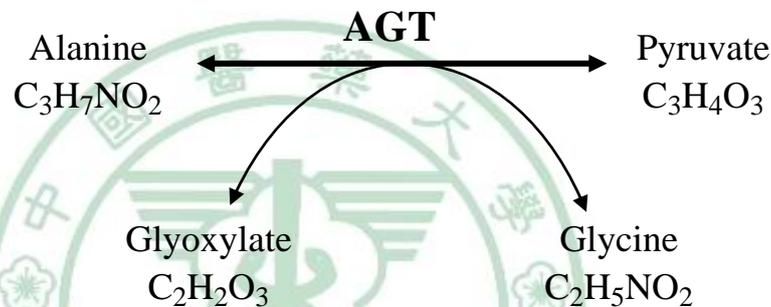


圖 5.1 AGT 催化反應

Alanine-glyoxylate aminotransferase 在酵素分類上屬於轉氨酶家族，可轉移含氮基團，常用名稱包括：L-alanine-glyoxylate aminotransferase, L-alanine-glycine transaminase, AGT 等。此酵素參與 alanine-aspartate 代謝以及 glycine-serine-threonine 代謝反應。

AGT 反應過程需要維他命 B6 的輔助。Nishijima 的研究藉由餵食大鼠維他命 B6 缺乏飲食來探討尿液中草酸等含量，發現肝內酵素 AGT 與維他命 B6，對於動物體內的草酸代謝具有重大的影響[113]。他發現飲食中缺乏維他命 B6 的大鼠，尿中草酸含量會增高，而草酸廓清率 (oxalate-to-creatinine ratio) 也比較差，同時也發現肝內的 AGT 活性降低，而 AGT 的 mRNA 表現量也較低。因此，他認為缺乏維他命 B6 不只會降低 AGT 活性，也會藉由調降肝細胞的 AGT 基因表達，因而造成高草酸尿症。所以，維他命 B6 是 glyoxylate 轉換成 glycine 過程中，幫助 AGT 的一個重要輔酶。

另外，Lee等研究指出，AGT2是一個pyridoxal 5'-phosphate dependent的粒線體酵素，在大鼠腎臟內可偵測出高表現量[114]。從氨基酸序列的相似度比較，發現鼠腎的AGT2序列與人類肝臟的過氧化物酶體(Peroxisome)內的AGT1或鼠肝臟的AGT1序列都不太相像，這意味著它們的功能可能不盡相同。

本研究中，我們讓大鼠飲用乙二醇(ethylene glycol; C₂H₄(OH)₂)，乙二醇進入大鼠體內後代謝成為具有細胞毒性的glyoxylic acid，而我們又在腎臟內發現此一解毒酵素AGT2的存在，代表著中毒大鼠正積極啟動此一解毒機轉，加速此一毒素glyoxylate的轉換清除工作。

5-2-2 蛋白質與腎結石關聯探討

Robertson觀察發現，含鈣結石患者其尿中排出的草酸和鈣遠高於常人[84, 85]。但是，大多數人尿液中都存在著結晶，可是卻沒有產生結石，因此，所謂的「超飽和結晶理論」並無法完整的解釋結石的發生機轉。

多位學者提出質疑認為：多數人尿液中都有結晶體的存在，也就是常常處在所謂的「超飽和」狀態，可是他們並不會因此產生結石。所以推測，尿液裡面應該存在著某些物質，可以造成這些重大的影響[4]。這些人的尿液中應該存在著抑制結晶形成的物質，因此避免了結石的生成。

目前，研究者已經找到多種影響物質，可分類為抑制物(inhibitors)、複合物(complexors)或促進物(promoters)等數種。藉著分子生物學新技術幫助，目前已發現對於結石形成具有重大影響的物質，包括有：citrate, pyrophosphate、glycosaminoglycans、RNA fragments、nephrocalcin及Tamm-Horsfall protein等多種[63, 115, 116]。

導因於蛋白質代謝異常而造成腎結石的實例，目前瞭解較多的是：原發性高草酸尿症(Primary hyperoxaluria)。第一型原發性高草酸尿症(PH1)是一種罕見的自體隱性遺傳代謝疾病(autosomal-recessive inborn error of metabolism)，發生率約百萬分之一，較常見於某些地中海國家(如

Tunisia)。病理變化表現出腎內鈣化(nephrocalcinosis)、組織沉積草酸(oxalosis)、尿中oxalic、glycolic及glyoxylic acid排泄量都增加，此類病患如果沒有治療，將於20歲前死於腎衰竭[4, 75, 76]。

發病年齡(age of onset of symptoms)在 1 歲至 25 歲之間，百分之 80~90 的病人在青少年時期就表現出臨床症狀，另外 10% 的案例在 4~6 個月齡時，表現出嚴重的症狀；而有 10% 的成年人則是反覆地發生尿路結石[117]。

在正常人的肝臟內，AGT 可以催化轉氨作用(transamination)將 glyoxylate 轉變成 glycine，此一步驟只能在過氧化物酶體(peroxisome)內進行，然而缺乏此酶的患者卻無法完成此一步驟，因此過剩的 glyoxylate 進入細胞質內，轉而被氧化成為草酸，形成大量不溶解的草酸鈣結晶，沉積在腎臟與尿路之內，進一步造成腎結石、腎損傷甚至發生腎衰竭，其機轉如圖 2.1 所示[73, 118]。另外有些 PH1 病患(約佔三分之一)，他們雖然可以合成有活性的 AGT 酵素，但是卻不是在正常位置的過氧化物酶體(peroxisome)內，而是錯誤地發生在粒線體(mitochondria)之內，這種情況也導致尿中草酸升高。

Danpure 與 Jennings 在 1988 年證實此病是導因於某種肝臟酵素：AGT (alanine-glyoxylate aminotransferase)的缺損所造成的，他們更在 1990 年完成調控此一蛋白質的基因：AGXT 的定序工作[73, 74]。AGXT 基因位在第二號染色體上(Chromosomal locus: 2q36-q37)，目前在 AGXT 基因發現的突變型已經超過 50 種以上，其中 G170R，33_34insC，F152I 和 I244T 四種突變型案例合計超過百分之五十[117, 119]。

原發性第一型高草酸尿症的治療方式，包括：降低草酸鈣結晶的超飽和狀態(大量飲水，服用 thiazides 及 potassium citrate)、減少草酸的合成(服用維生素 B6)、血液或腹膜透析、肝臟或腎臟移植等。另外，目前也有多種新療法正進行實驗評估，有如：分解草酸的細菌(oxalate-degrading bacteria)、肝細胞移植、基因療法、藥品 pyridoxamine 以及 chemical chaperons 等[117, 120-122]。Danpure 提出看法認為，新藥物的設計可以從改善 AGT 構型的不穩定性(有如：錯誤的摺疊、構型等)新方向來著手[73, 123, 124]。從此病的致病機轉與治療，可供研究者找

出治療草酸鈣結石病患的新方向。

5-3 五苓散讓大鼠體重增加維持正常

從表4.3實驗後數據，可以發現飲用乙二醇水的大鼠體重增加較為緩慢。比較四組的體重增加平均值，正常對照組(第1組)增加最多(179.63 ± 13.41 g)，而餵食五苓散的兩組較少，第3組體重平均增加158.13 g，第4組體重平均增加156.25 g。而平均體重增加最少的是飲用乙二醇水而餵食澱粉的安慰劑組，其平均體重只增加130.63公克，明顯地低於對照組($p=0.007$)。推測此種體重增加緩慢情況，應該是乙二醇代謝物造成動物中毒和肝腎損傷所引起的。

然而，反觀餵食五苓散的大鼠卻仍然能夠維持正常的成長。從實驗中發現，兩組餵食五苓散的大鼠體重增加情況與正常對照組比較，並無明顯差異。推測五苓散可能是藉由減少草酸鈣結晶，因而減輕腎臟損傷，讓大鼠能夠維持正常成長。

5-4 五苓散對於大鼠血液、尿液的影響

從實驗後生化數據(表4.2)分析發現，血液酸鹼值(pH)，五苓散兩組都顯著地低於安慰劑組，分別是第3組的 6.96 ± 0.07 ，第4組的 6.96 ± 0.17 ，而安慰劑組是 7.13 ± 0.09 ($p=0.006$)。

血清中游離鈣的濃度，在接受五苓散餵食的兩組(第3組與第4組)，明顯地低於安慰劑組($p=0.001$)，第3組(低劑量組)是 0.91 ± 0.07 mmol/L，第4組(高劑量組)是 0.94 ± 0.17 mmol/L。而安慰劑組(第2組)的血清游離鈣則是 1.10 ± 0.06 mmol/L，與正常對照組無差異。

至於尿液中游離鈣濃度，在安慰劑組(EG+starch)濃度最低(0.19 ± 0.06 mmol/L)，但是未達到統計上顯著($p=0.059$)。這可能意味著，大部份的鈣離子都與草酸結合形成結晶，因此尿中游離型態的鈣離子就減少了。而且，餵食五苓散的兩組大鼠尿中游離鈣濃度還維持正常，或許也意味著它們的草酸鈣結晶比較少。

血磷值，在安慰劑組是 9.45 ± 2.26 mg/dl，明顯低於正常對照組的 12.54 ± 1.25 mg/dl ($p=0.015$)。尿磷值，在五苓散高劑量組(第四組)是 19.36 ± 2.59 mg/dl，明顯地低於正常對照組的 20.98 ± 1.12 mg/dl ($p=0.021$)。尿液酸鹼值(pH)，在飲用乙二醇的第2, 3, 4組都略偏酸性，但是和對照組比較後，並未達到統計上顯著。

將我們的電解質變化結果和其他研究者比較後，可發現如下異同點。

血液酸鹼值(pH)的變化，Green使用0.75%乙二醇誘發大鼠的草酸鈣結石實驗，他們檢測大鼠動脈血(Arterial blood-gases analysis)發現到，飲用乙二醇並沒有造成代謝性酸中毒的現象，亦即血液酸鹼值(pH)與重碳酸鹽濃度(bicarbonate)並沒有差異，因此他們結論認為乙二醇並不會造成酸鹼失衡[125]。此點和我們的結果略有不同，相同的是，我們飲用乙二醇的三組大鼠血液酸鹼值(pH)和正常對照組也沒有差異。但是飲用乙二醇並餵食五苓散的兩組大鼠血液酸鹼值(pH)卻顯著地低於安慰劑組，分別是第3組的 6.96 ± 0.07 ，第4組的 6.96 ± 0.17 ，對比於安慰劑組的 7.13 ± 0.09 ($p=0.006$)。此一現象，因為我們沒有檢測Arterial blood-gases analysis，所以無法驟下結論。

實驗中，我們並沒有提供高鈣飲食，因此四組大鼠的血清鈣濃度並沒有不同。不過，值得注意的是，灌食五苓散的兩組大鼠其血清游離鈣濃度(serum free-calcium)，卻明顯的比對照組及安慰組還低(表4.2)，這現象是否意味著：五苓散藉由加速骨頭儲存鈣離子的機轉，來減少草酸與鈣的結合，此點尚待進一步的研究釐清。

至於尿中鈣濃度的變化，從Green實驗發現高草酸尿症大鼠的尿中鈣濃度，較正常對照組稍低，但是未達統計顯著，此點也和我們的實驗結果一致；而李瀛輝的研究也有相同的結論[95]。另外，Green也注意到尿磷濃度在飲用乙二醇者並無不同，這點也和我們一樣，而我們的高劑量五苓散組還表現出顯著的尿磷濃度降低現象，推測應該和健全的腎臟功能有關。

5-5 動物實驗模式探討

回顧文獻得知，目前最常見的腎結石動物模式是實驗性誘發大鼠產生高草酸尿症(hyperoxaluria)，並進而形成腎結石。經由餵食草酸前驅物，例如：ethylene glycol，hydroxyl-L-proline 或 glycolic acid 等，較長期、多次、低劑量的投與，將會誘發產生高草酸尿症。從這些實驗中，我們發現使用 0.75% 乙二醇添加於飲水，飼養 4 至 8 週，成石率較穩定，而且動物死亡率也比較低[19, 21, 126]。但是，此模式的缺點，也最為人詬病的理由是，乙二醇代謝物會造成動物嚴重的酸中毒副作用。不過，也有其它學者提出不同看法，他們認為如果腎臟功能還維持在正常情況下，並不見得會發生代謝性酸中毒[125]。

在本研究中，我們所採用的大鼠飲用水添加乙二醇模式，已經成功誘發腎臟內的草酸鈣結晶沉積，而且在實驗過程中沒有大鼠因此而死亡，表示 0.75% 乙二醇可以有效達成目的，同時也不致於毒殺動物。

探究乙二醇的安全劑量，從文獻中發現，飲用 100% 乙二醇的致死劑量是 1.4 ml/kg [100]。倘若依此計算，一位 60 kg 體重的成人飲用 84 ml 的 100% 乙二醇，就足以致死。本實驗所用大鼠平均體重約 320 gm，如果飲用 100% 乙二醇只要 0.448 ml 就足以致死，如果稀釋成 0.75%，則其致死劑量大約是 60 ml。不過，對於此項劑量效應關係，因為本實驗中並未限制大鼠飲用乙二醇水的多寡，因此無從得知。

5-6 圖片瀏覽程式可有效簡化統計分析工作

對於大量的圖片，如果只使用人工方式瀏覽評分，勢必會是一項龐雜而且容易出錯的工作。本研究使用自行研發的評分程式 (ImageScoring)，經證實的確可以正確有效的完成評分工作。隨機、匿名、雙盲的圖片顯示方式，讓評分者獨立給分。同時，也逐一記錄每位評分員的評分檔案，讓我們的評分工作更客觀而正確。

5-7 檢討改進與未來展望

動物實驗方面的改進，藥物灌食量不應該太多，因為大鼠胃容量並不大，最好每次少於 3 cc，可方便操作。實驗中期應該再加收一次尿液，藉以評估利尿作用。血液尿液生化數據可再加測草酸成份。

因為本實驗模式的動物死亡率不高，因此可將實驗期間再延長至八週以上，借以觀察較長期的腎臟變化。另外，乙二醇大多從肝臟代謝，所以應再加收肝臟樣本，以利相關蛋白質的探討。結石結晶之確認，除了使用偏光顯微鏡之外，可再使用紅外線或 X 光繞射等技術，確認客觀證據。

本研究結果已整理成兩篇論文，並順利發表於國際性刊物，足以證明中藥方劑研究若能嚴謹、科學化，仍然可被國際學術界所接受[127, 128]。本研究之方劑都經過指紋圖譜確認，並檢測重金屬成份含量，借此補足中藥之科學證據，更期盼日後研究者也能參考此方法。



第六章 結論

在本研究中，我們在飲用水中添加乙二醇，藉由增加攝取此種草酸前驅物，我們已經成功地誘發大鼠腎臟內的草酸鈣結晶沉積，並進而形成腎結石。而本實驗過程中並沒有大鼠因此死亡，表示使用此模式可以有效地達成目的。

實驗後的生化尿液數據變化，可能與五苓散的作用有關，尚待進一步證實。研究期間我們自行研發的圖片瀏覽程式，的確可以有效地簡化統計分析工作。

灌食五苓散並飲用添加乙二醇水的大鼠，其體重增加情形與對照組無異，推測五苓散可能是藉由減少草酸鈣結晶，因而減輕腎臟損傷，讓大鼠能夠維持正常成長。

Alcohol dehydrogenase具有分解乙二醇的作用，本研究在正常大鼠腎組織中，發現此酵素的蹤跡，意味著腎臟也具有分解乙二醇的功能。我們在飲用乙二醇水的大鼠腎臟內，發現酵素AGT2的存在，代表著中毒大鼠正積極加速glyoxylate此毒素的轉換清除工作。

經由腎切片結晶沉澱嚴重度評分結果，我們發現餵食五苓散的大鼠腎結晶程度，明顯的低於只餵食安慰劑的大鼠。因此，我們證實灌食五苓散可以顯著有效地減輕結晶的嚴重程度，五苓散在動物體內可以有效的抑制草酸鈣腎結石。

而且，餵食五苓散可以有效的減少大鼠腎結石的發生率。同時，與安慰劑組對比之下，餵食五苓散的兩組大鼠其罹患腎結石的相對危險性也比較低。

因此我們可以歸納結論，五苓散的確是一個預防腎結石的有效方劑。雖然，五苓散的抑石機轉尚未明瞭，推測尿液中的蛋白質應該扮演著重要角色，期待日後能進一步深入研究。

參考文獻：

1. 中央健康保險局：
http://210.69.214.131/webdata/AttachFiles/Attach_8327_2_94年CCS統計.pdf. 2005.
2. Ho SZ, Kuo HC: Pathogenesis and epidemiology of urolithiasis. *Tzu Chi Med J* 2002, 14:337-346.
3. Lee YH, Huang WC, TSAI JY: Epidemiological studies on the prevalence of upper urinary calculi in Taiwan. *Urol Int* 2002, 68:172-177.
4. Menon M, Resnick M: Urinary lithiasis: etiology, diagnosis, and medical management. In: *Campbell's Urology* Edited by Walsh PC RA, Vaughan ED, Jr., Wein AJ 8th edn. Philadelphia: WB Saunders; 2002: 3229-3270.
5. Kim HH, Jo MK, Kwak C, Park SK, Yoo KY, Kang D, Lee C: Prevalence and epidemiologic characteristics of urolithiasis in Seoul, Korea. *Urology* 2002, 59:517-521.
6. Yoshida O, Terai A, Ohkawa T, Okada Y: National trend of the incidence of urolithiasis in Japan from 1965 to 1995. *Kidney Int* 1999, 56:1899-1904.
7. Takasaki E, Shimano E, Nagata M: [Sizes of upper urinary tract calculi and methods to remove these calculi (author's transl)]. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi* 1976, 67:1025-1032.
8. Matsushita T: [Statistical observation of urolithiasis at the Hokkaido University Hospital (1959-1975) (author's transl)]. *Hokkaido Igaku Zasshi* 1978, 53:322-327.
9. Wikipedia:
http://en.wikipedia.org/wiki/Taiwan#Environment_and_population. 2007.
10. Wikipedia:
http://en.wikipedia.org/wiki/List_of_countries_by_population_density#_note-cia. 2007.
11. 2005 年全民健康保險統計動向:醫療設備之國際比較
<http://www.doh.gov.tw/statistic/data/全民健康保險統計動向/2005/2005.htm>
12. Chen YC, Ho CY, Chen LD, Hsu SF, Chen WC: Wu-Ling-San formula inhibits the crystallization of calcium oxalate in vitro. *Am J Chin Med* 2007, 35:533-541.
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. 臺中, 台灣: 中國醫藥大學; 2006.
14. 維基百科, 自由的百科全書: 五苓散
<http://zh.wikipedia.org/wiki/%E4%BA%94%E8%8B%93%E6%95>

- A3. In.; 2009.
15. 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(3):295-297.
 16. Liu Q, 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. *Med Electron Microsc* 2001, 34:103-114.
 17. Hattori T, Hayashi K, Nagao T: Studies on antinephritic effects of plant components(3): effect of pachyman, a main component of *Poria cocos* Wolf on original-type anti-GBM nephritis in rats and its mechanisms. *Jpn J Pharmacol* 1992, 59(1):89-96.
 18. Bensky D, Barolet R: *Chinese herbal medicine: Formulas & Strategies*. Seattle, Washington: Eastland; 1990.
 19. Lee Y, Huang W, Chiang H: Determinant role of testosterone in the pathogenesis of urolithiasis in rats. *J Urol* 1992, 147:1134-1138.
 20. Nelde H, Bichler K, Strohmaier W: Nephrocalcinosis in the Kidney of the Rat on Atherogenic Diet and the Effect of Calcium Antagonists (Nifedipine). In: *Nephrocalcinosis calcium antagonists and kidney*. Edited by Bichler K, Strohmaier W. Berlin: Springer-Verlag 1988: 113-125.
 21. Lee Y, Chang L, Chen M: Characterization of ethylene glycol induced urolithiasis model in rats. *J Urol ROC* 1991, 2:518-524.
 22. 桃胶的功效介绍
http://www.poptool.net/health/dir_cndrug/f_8/dir_203/zhongyao_4056.html
 23. 張仲景: 重刊桂林古本傷寒雜病論; 1986.
 24. 行政院衛生署中醫藥委員會 中醫藥資訊網
<http://www.ccmp.gov.tw/public/public.asp?selno=494&relno=494&level=C>
 25. Atmani F, Khan SR: Effects of an extract from *herniaria hirsuta* on calcium oxalate crystallization in vitro. *BJU International* 2000, 85:621-625.
 26. Joshi VS, Parekh BB, Joshi MJ, Vaidya AD: Inhibition of the growth of urinary calcium hydrogen phosphate dihydrate crystals with aqueous extracts of *Tribulus terrestris* and *Bergenia ligulata*. *Urol Res* 2005, 33:80-86.
 27. Das I, Gupta S, Ansari S, Pandey V, Rastogi R: In vitro inhibition and dissolution of calcium oxalate by edible plant *Trianthema monogyna* and pulse *Macrotyloma uniflorum* extracts. *Journal of Crystal Growth* 2005, 273:546-554.
 28. Nishiura JL, Campos AH, Boim MA, Heilberg IP, Schor N:

- Phyllanthus niruri normalizes elevated urinary calcium levels in calcium stone forming (CSF) patients. *Urol Res* 2004, 32:362-366.
29. Suzuki K, Kawamura K, Tsugawa R: Formation and growth inhibition of calcium oxalate crystals by takusha(*Alismatis rhizoma*). *Scanning Microscopy* 1999, 13:183-189.
 30. Utsunomiya M, Koide T, Yamaguchi S, Yoshioka T, Sonoda T, Sugiyama K: The effect of kanpou medicine on the growth and aggregation of calcium oxalate crystals in vitro. *Hinyokika Kyo* 1991, 37:1097-1101.
 31. Koide T, Yamaguchi S, Utsunomiya M, Yoshioka T, Sugiyama K: The inhibitory effect of kampou extracts on in vitro calcium oxalate crystallization and in vivo stone formation in an animal model. *Int J Urol* 1995, 2(2):81-86.
 32. Uribarri J, Oh MS, Carroll HJ: The first kidney stone. *Ann Intern Med* 1989, 111:1006-1009.
 33. Curhan GC, Willett WC, Rimm EB, Stampfer MJ: A prospective study of dietary calcium and other nutrients and the risk of symptomatic kidney stones. *N Engl J Med* 1993, 328:833-838.
 34. 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.
 35. Fan J, Chandhoke PS, Gramsas SA: Role of sex hormones in experimental calcium oxalate nephrolithiasis. *J Am Soc Nephrol* 1999, 10 Suppl 14:S376-380.
 36. Fan J, Glass MA, Chandhoke PS: Effect of castration and finasteride on urinary oxalate excretion in male rats. *Urol Res* 1998, 26:71-75.
 37. Lee YH, Huang WC, Huang JK, Chang LS: Testosterone enhances whereas estrogen inhibits calcium oxalate stone formation in ethylene glycol treated rats. *J Urol* 1996, 156:502-505.
 38. Prince CL, Scardino PL, Wolan CT: The effect of temperature, humidity and dehydration on the formation of renal calculi. *J Urol* 1956, 75:209-215.
 39. Bateson EM: Renal tract calculi and climate. *Med J Aust* 1973, 2:111-113.
 40. Sallis JD, Parry NF, Meehan JD, Kamperman H, Anderson ME: Controlling influence of phosphocitrate in vitro and in vivo on calcium oxalate crystal formation and growth. *Scanning Microsc* 1995, 9:127-135; discussion 135-126.
 41. Wilson DM: Clinical and laboratory approaches for evaluation of nephrolithiasis. *J Urol* 1989, 141:770-774.
 42. Daudon M, Donsimoni R, Hennequin C, Fellahi S, Le Moel G, Paris M, Troupel S, Lacour B: Sex- and age-related composition of 10 617 calculi analyzed by infrared spectroscopy. *Urol Res* 1995, 23:319-326.

43. 何淑貞, 郭漢崇: 尿路結石之成因與流行病學. 慈濟醫學雜誌 2002, 14:337-346.
44. Silverman DE, Stamey TA: Management of infection stones: the Stanford experience. *Medicine (Baltimore)* 1983, 62:44-51.
45. 李瀛輝, 陳明村, 張心湜: 尿路結石. 台北: 九州圖書文物有限公司; 1980.
46. 孫光煥, 于大雄: 尿路結石之治療最新發展. 台北: 九州圖書文物有限公司; 1996.
47. 台灣泌尿科醫學會: 尿路結石治療共識準則
http://www.tua.org.tw/administration/index_03.asp. 2008.
48. Burkland CE, Rosenberg M: Survey of urolithiasis in United States. *J Urol* 1955, 73:198-207.
49. Finlayson B: Symposium on renal lithiasis. Renal lithiasis in review. *Urol Clin North Am* 1974, 1:181-212.
50. Wahl C, Hess B: [Kidney calculi--is nutrition a trigger or treatment?]. *Ther Umsch* 2000, 57:138-145.
51. Rosenfeld L: The chemical work of Alexander and Jane Marcet. *Clinical Chemistry* 2001, 47:784-792.
52. Boyce WH: Organic matrix of human urinary concretions. *Am J Med* 1968, 45:673-683.
53. Boyce WH, King JS, Jr.: Present concepts concerning the origin of matrix and stones. *Ann N Y Acad Sci* 1963, 104:563-578.
54. Drach GW, Boyce WH: Nephrocalcinosis as a source for renal stone nuclei. Observations on humans and squirrel monkeys and on hyperparathyroidism in the squirrel monkey. *J Urol* 1972, 107:897-904.
55. Coe FL, Parks JH, Strauss AL: Accelerated calcium nephrolithiasis. *Jama* 1980, 244:809-810.
56. Coe FL, Strauss AL, Tembe V, Le Dun S: Uric acid saturation in calcium nephrolithiasis. *Kidney Int* 1980, 17:662-668.
57. Robertson WG, Peacock M, Marshall RW, Marshall DH, Nordin BE: Saturation-inhibition index as a measure of the risk of calcium oxalate stone formation in the urinary tract. *N Engl J Med* 1976, 294:249-252.
58. Ito H, Coe FL: Acidic peptide and polyribonucleotide crystal growth inhibitors in human urine. *Am J Physiol* 1977, 233:F455-463.
59. 陳文吉: 尿路結石的生物礦化機制探索. 博士論文. 新竹, 臺灣: 國立清華大學; 2001.
60. Khan SR: Interactions between stone-forming calcific crystals and macromolecules. *Urol Int* 1997, 59:59-71.
61. Menon M, Mahle CJ: Oxalate metabolism and renal calculi. *J Urol* 1982, 127:148-151.
62. Coe FL, Parks JH: Pathophysiology of kidney stones and strategies for

- treatment. *Hosp Pract (Off Ed)* 1988, 23:185-189, 193-185, 199-200 passim.
63. Nakagawa Y, Ahmed M, Hall SL, Deganello S, Coe FL: Isolation from human calcium oxalate renal stones of nephrocalcin, a glycoprotein inhibitor of calcium oxalate crystal growth. Evidence that nephrocalcin from patients with calcium oxalate nephrolithiasis is deficient in gamma-carboxyglutamic acid. *J Clin Invest* 1987, 79:1782-1787.
 64. Asplin J, DeGanello S, Nakagawa YN, Coe FL: Evidence that nephrocalcin and urine inhibit nucleation of calcium oxalate monohydrate crystals. *Am J Physiol* 1991, 261:F824-830.
 65. Weber DV, Coe FL, Parks JH, Dunn MS, Tembe V: Urinary saturation measurements in calcium nephrolithiasis. *Ann Intern Med* 1979, 90:180-184.
 66. Coe FL, Parks JH, Moore ES: Familial idiopathic hypercalciuria. *N Engl J Med* 1979, 300:337-340.
 67. 歐陽健明, 姚秀琼, 蘇澤軒: 草酸鈣結石的體外模型. *中國科學(B輯)* 2003, 33(1):14-20.
 68. Parks JH, Coe FL: A urinary calcium-citrate index for the evaluation of nephrolithiasis. *Kidney Int* 1986, 30:85-90.
 69. Parks JH, Coe FL: Urine citrate and calcium in calcium nephrolithiasis. *Adv Exp Med Biol* 1986, 208:445-449.
 70. Robertson WG, Peacock M: The cause of idiopathic calcium stone disease: hypercalciuria or hyperoxaluria? *Nephron* 1980, 26:105-110.
 71. Senekjian HO, Weinman EJ: Oxalate transport by proximal tubule of the rabbit kidney. *Am J Physiol* 1982, 243:F271-275.
 72. Allison MJ, Cook HM, Milne DB, Gallagher S, Clayman RV: Oxalate degradation by gastrointestinal bacteria from humans. *J Nutr* 1986, 116:455-460.
 73. Danpure CJ: Advances in the enzymology and molecular genetics of primary hyperoxaluria type 1. Prospects for gene therapy. *Nephrol Dial Transplant* 1995, 10 Suppl 8:24-29.
 74. Danpure CJ, Jennings PR: Peroxisomal alanine:glyoxylate aminotransferase deficiency in primary hyperoxaluria type I. *FEBS Lett* 1986, 201:20-24.
 75. Williams HE, Johnson GA, Smith LH, Jr.: The renal clearance of oxalate in normal subjects and patients with primary hyperoxaluria. *Clin Sci* 1971, 41:213-218.
 76. Williams HE, Smith LH, Jr.: Disorders of oxalate metabolism. *Am J Med* 1968, 45:715-735.
 77. Hautmann RE: The stomach: a new and powerful oxalate absorption site in man. *J Urol* 1993, 149:1401-1404.
 78. Earnest DL, Johnson G, Williams HE, Admirand WH: Hyperoxaluria

- in patients with ileal resection: an abnormality in dietary oxalate absorption. *Gastroenterology* 1974, 66:1114-1122.
79. DeLuca HF: Vitamin D: revisited 1980. *Clin Endocrinol Metab* 1980, 9:1-26.
 80. DeLuca HF: The control of calcium and phosphorus metabolism by the vitamin D endocrine system. *Ann N Y Acad Sci* 1980, 355:1-17.
 81. Meyer JL, Smith LH: Growth of calcium oxalate crystals. II. Inhibition by natural urinary crystal growth inhibitors. *Invest Urol* 1975, 13:36-39.
 82. Meyer JL, Smith LH: Growth of calcium oxalate crystals. I. A model for urinary stone growth. *Invest Urol* 1975, 13:31-35.
 83. Goldberg H, Grass L, Vogl R, Rapoport A, Oreopoulos DG: Urine citrate and renal stone disease. *Cmaj* 1989, 141:217-221.
 84. Robertson WG, Peacock M: Calcium oxalate crystalluria and inhibitors of crystallization in recurrent renal stone-formers. *Clin Sci* 1972, 43:499-506.
 85. Asplin J, Parks J, Lingeman J, Kahnoski R, Mardis H, Lacey S, Goldfarb D, Grasso M, Coe F: Supersaturation and stone composition in a network of dispersed treatment sites. *J Urol* 1998, 159:1821-1825.
 86. Marangella M, Vitale C, Petrarulo M, Bagnis C, Bruno M, Ramello A: Renal stones: from metabolic to physicochemical abnormalities. How useful are inhibitors? *J Nephrol* 2000, 13 Suppl 3:S51-60.
 87. Ryall RL: Urinary inhibitors of calcium oxalate crystallization and their potential role in stone formation. *World J Urol* 1997, 15:155-164.
 88. Oldberg A, Franzen A, Heinegard D: Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986, 83:8819-8823.
 89. Oldberg A, Ruoslahti E: Evolution of the fibronectin gene. Exon structure of cell attachment domain. *J Biol Chem* 1986, 261:2113-2116.
 90. Moore S, Gowland G: The immunological integrity of matrix substance A and its possible detection and quantitation in urine. *Br J Urol* 1975, 47:489-494.
 91. Khan SR: Animal model of calcium oxalate nephrolithiasis. In: *Calcium oxalate in biological systems*. Edited by Khan SR. BocaRaton: CRC; 1995.
 92. Khan SR, Glenton PA: Deposition of calcium phosphate and calcium oxalate crystals in the kidneys. *J Urol* 1995, 153:811-817.
 93. 鍾玲: 乙二醇法複製腎結石模型給藥途徑和方法的比較. *中國病理生理雜誌* 2000, 16:381-382.
 94. 李文峰: 實驗性大鼠腎草酸鈣結石模型的篩選研究. *上海交通大學學報* 2006, 26:66-68.

95. 李瀛輝: 使用乙烯甘醇誘發大白鼠產生尿路結石動物模式之特性. *J Uro ROC* 1991, 2:518-524.
96. 李瀛輝: 合併使用 30% 高乳糖飲食與 1% 乙烯甘醇: 一種研究尿路結石之動物實驗新模式. *J Uro ROC* 2000, 11:149-154.
97. 王建紅: 豬苓湯抑制腎結石形成的作用機理研究. *湖南中醫藥導報* 2004, 10:80-82.
98. Worcester EM, Chuang M, Laven B, Orvieto M, Coe FL, Evan AP, Gerber GS: A new animal model of hyperoxaluria and nephrolithiasis in rats with small bowel resection. *Urol Res* 2005, 33:380-382.
99. Connor R, Worcester E, Evan A, S SM, Kuznetsov D, Laven B, Sommer A, SB SB, Parks J, Coe F *et al*: Nephrolithiasis and nephrocalcinosis in rats with small bowel resection. *Urol Res* 2005, 33:105-115.
100. Leth PM, Gregersen M: Ethylene glycol poisoning. *Forensic Science International* 2005, 155:179-184.
101. Marshall T, Williams KM: Coomassie blue protein dye-binding assays measure formation of an insoluble protein-dye complex. *Anal Biochem* 1992, 204:107-109.
102. Marshall T, Williams KM: Bradford protein assay and the transition from an insoluble to a soluble dye complex: effects of sodium dodecyl sulphate and other additives. *J Biochem Biophys Methods* 1993, 26:237-240.
103. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M: Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 1996, 68:850-858.
104. Gharahdaghi F, Weinberg C, Meagher D, Imai B, Missche S: Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis* 1999, 20:601-605.
105. Terry D, Edward U, Desiderio D: Optimized sample-processing time and peptide recovery for the mass spectrometric analysis of protein digests. *J Am Soc Mass Spectrom* 2004, 15:784-794.
106. Pappin DJ, Hojrup P, Bleasby AJ: Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr Biol* 1993, 3:327-332.
107. 游士勳, 張錦清: 實用中醫方劑學: 志遠書局; 1989.
108. 南京中醫學院: 中醫方劑學講義. 香港: 醫藥衛生出版社; 1977.
109. 蔡錫英: 桂枝茯苓丸治療石淋及腎積水證 <http://www.apctcm.com>. In.; 2001.
110. Yin C, Liu J, Zhang Y: Effects of *Alisma orientalis* Juzep on calcium oxalate crystallization in vitro and calcium oxalate renal stone in rats. *Acta Univ Med Tongji* 1997, 26(2):99-101.
111. 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(4):294-296.
112. Cao ZG, Liu JH, Zhou SW, Wu W, Yin CP, Wu JZ: [The effects of the active constituents of *Alisma orientalis* on renal stone formation and bikunin expression in rat urolithiasis model]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2004, 84:1276-1279.
 113. Nishijima S, Sugaya K, Morozumi M, Hatano T, Ogawa Y: Hepatic alanine-glyoxylate aminotransferase activity and oxalate metabolism in vitamin B6 deficient rats. *J Urol* 2003, 169:683-686.
 114. Lee IS, Muragaki Y, Ideguchi T, Hase T, Tsuji M, Ooshima A, Okuno E, Kido R: Molecular cloning and sequencing of a cDNA encoding alanine-glyoxylate aminotransferase 2 from rat kidney. *J Biochem* 1995, 117:856-862.
 115. Grover PK, Dogra SC, Davidson BP, Stapleton AM, Ryall RL: The prothrombin gene is expressed in the rat kidney: Implications for urolithiasis research. *Eur J Biochem* 2000, 267:61-67.
 116. Kumar V, Farrell G, Yu S, Harrington S, Fitzpatrick L, Rzewuska E, Miller VM, Lieske JC: Cell biology of pathologic renal calcification: contribution of crystal transcytosis, cell-mediated calcification, and nanoparticles. *J Investig Med* 2006, 54:412-424.
 117. Coulter-Mackie MB, White CT, Hurley RM: Primary Hyperoxaluria Type 1 :<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=ph1>. 2006.
 118. <http://www.ghr.nlm.nih.gov/condition=primaryhyperoxaluria>
 119. Coulter-Mackie MB: Preliminary evidence for ethnic differences in primary hyperoxaluria type 1 genotype. *Am J Nephrol* 2005, 25:264-268.
 120. Koul S, Johnson T, Pramanik S, Koul H: Cellular transfection to deliver alanine-glyoxylate aminotransferase to hepatocytes: a rational gene therapy for primary hyperoxaluria-1 (PH-1). *Am J Nephrol* 2005, 25:176-182.
 121. Leiper JM, Danpure CJ: A unique molecular basis for enzyme mistargeting in primary hyperoxaluria type 1. *Clin Chim Acta* 1997, 266:39-50.
 122. Leiper JM, Oatey PB, Danpure CJ: Inhibition of alanine:glyoxylate aminotransferase 1 dimerization is a prerequisite for its peroxisome-to-mitochondrion mistargeting in primary hyperoxaluria type 1. *J Cell Biol* 1996, 135:939-951.
 123. Danpure CJ: Molecular etiology of primary hyperoxaluria type 1: new directions for treatment. *Am J Nephrol* 2005, 25:303-310.
 124. Danpure CJ: Primary hyperoxaluria: from gene defects to designer drugs? *Nephrol Dial Transplant* 2005, 20:1525-1529.

125. Green M, Hatch M, Freel R: Ethylene glycol induces hyperoxaluria without metabolic acidosis in rats. *AM J Physiol Renal Physiol* 2005, 289:F536-F543.
126. 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, 11:149-154.
127. 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. *Urol Res* 2008, 36:17-24.
128. Tsai C, Pan T-C, Lai M-T, Lee S-C, Chen M-L, Jheng J-R, Chen W-C: Prophylaxis of experimentally induced calcium oxalate nephrolithiasis rats by Zhulingtand, a traditional Chinese herbal formula. *Urol Int* 2009, 82:464-471.



Studies of antilithic effects of Wulingsan on calcium oxalate stones – an experimental induced-nephrocalcinosis rat model and proteomics research

Institute : Graduate Institute of Chinese Medical
Science, China Medical University

Professor : Wen-Chi Chen
Fuu-Jen Tsai

Student : Chou-huang Tsai

Abstract

Urolithiasis is a common disease in Taiwan, and the medical expenditure is quite huge. The purposes of this study are to explore the mechanism of nephrocalcinosis using molecular technologies and to evaluate the antilithic abilities of a Traditional Chinese herbal formula, Wulingsan (WLS), by an ethylene glycol-induced nephrocalcinosis rat model. Forty one male Sprague-Dawley rats were divided into four groups. Eight rats were fed with normal chaw and water served as the normal control, and the others received 0.75% ethylene glycol-added water as a stone inducer. The placebo group (11 rats) received a daily gastric gavage of starch, the low-dose group (11 rats) received WLS (375mg/kg), and the high-dose group (11 rats) received WLS (1125mg/kg) in stead. Four weeks later, animals were killed. The kidneys had harvested and the changes of body weight were measured. The biochemical data of urine and serum were obtained and analyzed. The kidney specimens were examined by a polarized light microscopy and the pictures were taken by a digital camera. The severity of crystal deposits in rat kidneys were evaluated by a semi-quantitative scoring method assisted with a self-composed picture browsing software named *ImageScoring*. Using this software, pictures were randomly and anonymously displayed allowing the investigators making scores. Six investigators had employed to

accomplish their scoring works independently; finally those data were collected and analyzed.

Representative samples of rat kidneys were selected from each group. Isoelectric focusing gel electrophoresis (IEF) and Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) were used to separate the protein extracts. The PDQuest software was applied for gel comparisons. The interest proteins were digested with trypsin and sent to mass spectrometry (MALDI-TOF) for peptide analysis. The peptid fragments were matched by MASCOT web interface from several sequence databases.

Our results revealed that the rats of placebo group gained the least body weights; on the contrary, the rats of WLS-fed groups could normally grow just the same as control group did. The placebo group exhibited lower levels of urine-free calcium ($p=0.059$) and significantly lower serum phosphorus ($p=0.015$) than WLS-fed rats. Histological findings of kidneys revealed tubular destruction, damage and inflammatory reactions in the EG-water rats. The crystal deposit scores dropped significantly in the WLS groups, from 1.40 to 0.46 in the low-dose group and from 1.40 to 0.45 in the high-dose group. Overall, WLS effectively inhibited the deposition of calcium oxalate crystal and lowered the incidence of stones ($p=0.034$, Kruskal-Wallis test).

The serum levels of calcium were no difference in four groups. Bu the free calcium level in the WLS-fed groups(group 3 and 4) were significantly lower than the placebo group, the low-dose group is 0.91 ± 0.07 mmol/L and the high-dose group is 0.94 ± 0.17 mmol/L, compared with the placebo group is 1.10 ± 0.06 mmol/L ($p=0.001$). The serum levels of phosphorus of placebo group is 9.45 ± 2.26 mg/dl, this is much lower than the control group(12.54 ± 1.25 mg/dl) ($p=0.015$) . The serum pH levels of WLS-fed rats were significantly lower than the placebo rats, the low-dose group is 6.96 ± 0.07 , the high-dose group is 6.96 ± 0.17 , and the placebo group is 7.13 ± 0.09 ($p=0.006$).

We found the existence of AGT2 protein (alanine-glyoxylate

aminotransferase 2; EC 2.6.1.44) from the kidney of ethylene-glycol-fed rats, and the mRNA expression is significantly higher than normal rats (2.69 fold, $p < 0.05$). We concluded that WLS significantly reduced the severity of calcium oxalate (CaOx) crystal deposits in rat kidneys, indicating that Wulingsan may be an effective antilithic herbal formula. Although the definite mechanism of antilithic effect induced by WLS is still undetermined, the proteins may play important roles. The existence of AGT2 may be related to the detoxic effects of ethylene glycol.



Keywords:

Urolithiasis, Calcium oxalate, Wulingsan, Ethylene glycol, Proteomics

謝詞

本研究由行政院國家科學委員會經費補助。
(案號 NSC 95-2314-B-039-016)

感謝過去、現在、未來，所有幫忙我的人。
因為有你，演化又邁進了一步。

I'd like to say thank you, to whom helping me in the past, at the present and
in the future.

Because of you, the evolution progressed forward.

