

中國醫藥大學中國醫學研究所碩士論文

編號：G1CMS-304

指導教授：許昇峰 助理教授

共同指導教授：陳汶吉 副教授

論文題目

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

Wu-Ling-San Formula Inhibits the Crystallization
of Calcium Oxalate in vitro and in rats

研究生：陳育正

中華民國九十五年六月十九日

目 錄

第一章 前言

第一節 尿路結石的臨床症狀	1
第二節 尿路結石的流行病學	2
第三節 淋證	3
第四節 小結	6

第二章 文獻探討

第一節 尿路結石的形成原因	7
第二節 尿路結石的促進和抑制因子	9
第三節 尿路結石的種類及組成成分	10
第四節 尿路結石的手術治療和內科治療	11
第五節 尿路結石的形成過程和物理化學基礎	12
第六節 草藥治療及預防尿路結石的文獻回顧	15
第七節 五苓散的歷史源流	17
第八節 文獻探討小結	19
第九節 研究動機與目的	20

第三章 材料與方法

第一節 概述	22
第二節 儀器設備	22
第三節 實驗試劑	22
第四節 製備五苓散萃取液的實驗方法	23
第五節 結晶三大步驟的實驗方法	24
第六節 動物實驗的步驟	27
第七節 資料分析	29

第四章 結果

第一節 概述	30
--------------	----

第二節 結晶三大步驟的實驗結果·····	30
第三節 動物實驗的結果·····	41
第五章 討論	
第一節 五苓散對於體外草酸鈣結石模型的抑制作用·····	43
第二節 五苓散對於大鼠草酸鈣結石模型的抑制作用·····	47
第三節 結論·····	49
參考文獻·····	50
附錄·····	58
英文摘要·····	60
謝辭·····	61



圖目錄

Figure 1	30
Figure 2	31
Figure 3	31
Figure 4	32
Figure 5	32
Figure 6	33
Figure 7	33
Figure 8	34
Figure 9	34
Figure 10	35
Figure 11	35
Figure 12	36
Figure 13	36
Figure 14	37
Figure 15	37
Figure 16	38
Figure 17	38
Figure 18	39
Figure 19	44
Figure 20	46

表 目 錄

Table 1.....	39
Table 2.....	40
Table 3.....	40
Table 4.....	42
Table 5.....	42



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

研究生：陳育正

指導教授：許昇峰

中國醫藥大學中國醫學研究所

尿路結石是一個普遍和復發率高的疾病。目前尚未有理想的內科藥物用來預防尿路結石的復發。因此，發展有效的預防性內科藥物是一個值得研究的議題。本研究的目的是在於使用結晶成核、成長和聚集的三大步驟實驗方法來研究體外五苓散對於草酸鈣結晶形成的作用。然後再進行動物實驗以研究五苓散對於乙二醇誘發腎臟結石大鼠的效用。結晶實驗的結果指出五苓散萃取液有抑制草酸鈣結晶形成的效用，是經由抑制結晶的成核以及結晶的聚集這兩個步驟。動物實驗的結果顯示五苓散能有效地抑制以乙二醇飼養的大鼠腎臟小管中草酸鈣結晶的沉積。因此，五苓散有潛在的能力可以預防草酸鈣結石的發生，這結果可由進一步的臨床試驗來證實。

關鍵詞：尿路結石、五苓散、草酸鈣

第一章、前言

第一節、尿路結石的臨床症狀

尿路結石是泌尿系統疾病中最常見的三大疾病之一(其他兩者分別是尿路感染與前列腺疾病)。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。

尿路結石常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，感覺是一種深部的頓痛(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、尿頻、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。尿路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，最後需要血液透

析的治療。

此外，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。4~5mm 的結石有 40%~50% 的機率可以自然排出。若大於 6mm 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 [1]。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 4mm 為 80%，4 至 6mm 為 59%，大於 6mm 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 5mm 時，近端的自行排出率從 71%到 98%，而遠端則是 29% 至 98% [2]。

第二節、尿路結石的流行病學

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，證明尿路結石困擾人類已有久遠的歷史。直到現在此病並沒有因為科學、醫學的發達而減少，盛行率反而有逐漸增加的趨勢 [3]。

尿路結石的盛行率(prevalence)和發生率(incidence)會隨著年齡、種族、飲食習慣、區域環境、氣候和性別而有所差異。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%。在美國可以發現尿路結石的盛行率有區域性的差異，位於東南方的州有最高的盛行率。另外，白種人較黑人容易罹患尿路結石；男性較女性容易罹患；有尿路結石家族史者，患病機率較一般人高；經濟愈發展的國家，其人民罹患率愈高 [4]。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。

尿路結石是一個普遍的疾病。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 [2]。在美國一年有一百萬人次罹患尿路結石

的疾病，約有 8%至 15% 的盛行率；在台灣，則有 9.6% 的盛行率，在男性為 14.5%，在女性則為 4.3% [5]。如果沒有積極的預防和治療，其第一年的復發率為 14%，五年為 35%，十年為 52% [6]，二十五年則為 98% [7]。

在李瀛輝教授的研究中，上尿路結石的病人，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，較容易罹患上尿路結石。女性則在 50至59 歲較容易罹患上尿路結石。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 1.5:1。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 [8]。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尿路結石 [9]。

面對尿路結石的高發生率和高復發率，許多國家都需要花費大量金錢治療此疾病，對於經濟著實產生一定衝擊。在美國，每年需要花費18.3億美元來治療尿路結石 [10]。在英國，每年需要花費11.13億英鎊 [11]。在德國，每年需要花費5.4億歐元 [12]。倘若能使用有效的預防性藥物來治療，是可以節省龐大的醫療費用。

第三節 淋證

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。所以在開始尿路結石的研究前，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」。此外，《內經》中尚有淋、淋洩等名稱。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。

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全身性的病證，又提出淋證有分冷、熱、氣、勞、膏、砂、虛、實八種，為淋證臨床分類之先河。其中，對於熱淋、氣淋、膏淋、砂淋臨床特徵和成因亦有詳盡的描述。

(2) 隋唐時期：

隋·巢元方在《諸病源候論·淋病諸侯》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。

另外，巢元方所著《諸病源候論》將淋證分為石、勞、氣、血、膏、寒、熱七種，而以「諸淋」統之。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」。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」。

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。」

(3) 金元時期：

金·劉河間根據《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。

元·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。

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。」

(4) 明清時期：

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，止從末流胞中之熱施治，未為善也。」

明·張景岳在《景岳全書·淋濁》提出，淋證與熱毒積蘊有關，並把病程的長短作為辨證的內容，謂：「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。」

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。而古代醫家認識到腎虛和熱邪、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 [13, 14]。

第四節 小結

尿路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，最後需要血液透析治療。

在台灣，尿路結石有高達 9.6% 的盛行率，男女的比例為 2.32:1。如果沒有積極的預防和治療，其復發率很高。對於尿路結石的預防實在是一個很重要的健康議題。

尿路結石是個古老的疾病。直到醫學發達的現代，尿路結石仍然存在著，而且盛行率有越來越高的趨勢。在中國醫學中，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寶庫，可以作為臨床上治療尿路結石和預防復發的指導原則，也可以從中利用科學研究來證實其療效。

第二章、文獻探討

第一節、尿路結石的形成原因

尿路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：

白種人較黑人容易罹患尿路結石。在南非，15%的白人族群罹患尿路結石，然而只有1%的黑人族群罹患尿路結石；在美國的黑人族群同樣有較低的盛行率。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。種族之間有如此大差異的確實原因仍然尚未明了。

2. 氣候因素：

炎熱的氣候會使得尿量減少，而增加尿中草酸鈣的濃度，這是造成尿路結石的重要原因之一。諸如沙烏地阿拉、美國東南部（包括佛羅里達州、喬治亞州、南、北卡羅來納州）這些炎熱的區域盛行率都較高。

3. 職業因素：

從事某些職業的人，罹患尿路結石的機會較高，尤其是需要長時間坐著的工作，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 [15]。

第二部分：生理生化因素

1. 尿液中的鈣離子：

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的草酸鈣超飽和現象，草酸根離子的飽和能力是鈣離子的15倍。因此，正確地說，尿液中的草酸根離子才是草酸鈣結石形成的決定因子 [16]。

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 [18]。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oxalate-degrading bacteria (particularly *Oxalobacter formigenes*) [15]。

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 [18]。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 [19]。

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 [15]。

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 [15]。

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 [20]。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 [20]。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1200mg 的鈣 [21]。

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尿路結石的機率。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尿路結石的機率。此外，足夠水分的攝取也可以降低尿路結石的罹患機率，建議美每天水分攝取量為2.5至3 公升，維持排尿量每天為2公升 [1, 15]。

第二節、尿路結石的促進和抑制因子

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 [22]。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 [23]。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。文獻中所報告的尿路

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 [4]。

第三節、尿路結石的種類及組成成分

尿路結石的種類是依照所含結晶物質來做分類，以下為各種結石的分類、組成成分及所佔百分比 [24]：

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. 胱胺酸結石 (Cystine stone) 和其他結石：2%。

含鈣結石是最常見的尿路結石類型，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。Struvite stone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。胱胺酸結石症是一個自體隱性遺傳的先天性代謝疾病 [25]。

第四節、尿路結石的手術治療和內科治療

在體外震波碎石術以及內視鏡碎石手術發明之前，治療尿路結石最常用的方式是開刀手術治療。即使體外震波碎石術以及內視鏡碎石手術目前已經可以處理九成以上的尿路結石，但是傳統的開刀手術治療對於某些適應症仍有其重要性，例如腎臟鹿角狀結石、巨大膀胱結石等。

內視鏡碎石術是利用內視鏡在泌尿道內進行碎石治療，依據結石所在位置，所使用的內視鏡可分為腎臟鏡和輸尿管鏡。經皮腎造瘻截石手術(PCNL)適用於大於 2.5 cm 以上的腎結石和上端輸尿管結石。輸尿管鏡截石手術適用於輸尿管中下段結石和輸尿管上段結石大於 1.0 cm 以上，可以合併超音波、水電波、雷射或氣震式碎石機把結石擊碎，配合結石網或鉗把結石取出。

自從一九八〇年 Dr. Chaussy [26]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，體外震波碎石術已經成為治療尿路結石的第一首選方式，目前百分之九十以上的尿路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 [1, 25, 27]。

在內科藥物治療方面，草酸鈣結石並沒有有效口服藥物可以溶解結石；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。

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 [25]：

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, 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，然而如此一來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尿路結石。citrate 類的藥物包括有 potassium citrate, sodium potassium citrate, calcium citrate, calcium sodium citrate 和 potassium-magnesium citrate 等 [15]，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。

第五節、尿路結石的形成過程和物理化學基礎

尿路結石的形成是一個複雜的過程，它由許多步驟構成。首先，尿液必須要達到鹽類的超飽和濃度 (supersaturation)，接下來結晶核心才會形成 (nucleation)，再來晶體的生長 (growth) 和聚集

(aggregation) 接續發生，形成較大的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 [28]。

在人體內草酸鈣結石的形成途徑是相當複雜的，但是在體外草酸鈣晶體的形成是過飽溶液中晶體析出的一連串過程，這個過程是符合熱力學的理論，主要包括兩種物理化學現象：一是熱力學的(thermodynamic)過飽和現象，會造成微小晶體核心的形成；二是動態的(kinetic)晶體成核、生長、聚集和相態轉換。

這四個動態步驟的速率會決定晶體形成時的相態、形狀、大小和數目，以下介紹晶體成形時的成核、生長、聚集的物理化學原則 [29]：

過飽和 (supersaturation)

過飽和現象代表有過多的自由能，即是結晶形成所必須的熱力學的驅動力(thermodynamic driving force)，如果用 ΔG 表示自由能，則過飽和可以用 $\Delta G=RT\ln(A_i/A_0)$ 的公式來表示， R 是空氣常數， T 是溫度， A_i 或 A_0 是非游離鹽在溶液中的活動產物， A_i 代表任何狀態， A_0 則是代表平衡狀態時的活性， A_i/A_0 是指相對過飽和度(relative supersaturation, RS)，在 $RS>1$ 時，溶液才可稱作過飽和，此時晶體才會開始形成，所以過飽和現象無疑是尿路結石的必要因子。然而人類尿液中的草酸鈣濃度常常是過飽和的，但也不一定能形成尿路結石，所以過飽和本身是不足以完全解釋尿路結石形成的原因。

結晶成核 (crystal nucleation)

為了把過多的自由能排除，過飽和溶液中過多的鹽類會沉積成固相來達成平衡狀態，這個將液相轉成固相的初始動力學步驟叫做成核。這過程開始是從溶液中的結石鹽成分轉成鬆散的晶體叢集(cluster)，如果加入新的成分進入溶液中則此叢集會開始長大；起初，叢集並不會形成高度有序的內部結構，但是一旦時間足夠，內部的溶液鍵就會被離子鍵所取代而形成規則的內部結構，叢集逐漸形成晶胚。也就是說叢集的內部構造受溶液的條件的影響會愈來愈少，而慢慢變成規則的結晶晶格構造。

結晶成長 (crystal growth)

一旦晶核長到臨界大小而且相對飽和度保持高於一，持續加入新的結晶成分到晶核上會使得總體自由能減少，此過程稱為結晶成長。其驅動力源自於形成新的晶格鍵合力與晶格本身或溶液中的結晶成分溶解所需能量，兩者之間的淨差值。使結晶物質嵌於晶格之上是一連串繁複的過程，如特定化(speciation)、質塊擴散(bulk diffusion)、介面形成(interface)及吸附(absorption)等，單一聚合體最後到達嵌入晶格的晶面位置。單一聚合體附著於晶面之上以後，可以停留在其上、越過表面或因溶解而再度離開晶面。停在其上和越過表面能階上是相同的，只有因溶解而再度離開晶面才有能量閾值，也就是說溶解這個過程需要較多的能量來打破離子與晶格間的作用力。由質塊擴散或晶體溶液間介面或兩者綜合來決定生長的速度，會因顆粒大小而有所不同，像草酸鈣這種難溶的鹽類介面的直徑大約在 $10\ \mu\text{m}$ ，而擴散直徑可超過 $100\ \mu\text{m}$ ，人類尿液中的草酸鈣晶體直徑都小於 $10\ \mu\text{m}$ 。因此晶體成長大部分是介面控制的，但是復發的結石患者常常分泌大的結晶顆粒，所以擴散與介面同等重要。

總之，結晶成長是結石形成過程中一個不可或缺的步驟。對於最常見的草酸鈣結石而言，結晶成長可能不是最重要的決定因素。因為草酸鈣結晶成長的速率緩慢，但是尿液通過腎臟只須要幾分鐘，如果僅僅依靠結晶成長，單一晶體要達到病理上有意義的大小，其機率是微乎其微的。

晶體聚集 (crystal aggregation or agglomeration)

晶體在溶液中相互粘連在一起而形成較大顆粒的過程稱為聚集。這個過程在能階上是易於進行的，並且是自然發生的過程。雖然聚集的速率可以受到液的飽和狀態所影響，但是聚集本身可以在任何飽和狀態下發生，即過飽和、飽和與未飽和狀態下。聚集是很快的步驟，可以在幾秒鐘內形成較大的顆粒。此外，離子擴散、表面反應、溫度和酸鹼值均會影響結晶的相變(phase transformation)，即聚集的反應。

晶體聚集在溶液中同時受到聚集和分開的幾種基本力量所影響。當兩個

晶體顆粒間的距離非常接近時，凡德瓦力 (van der Waals force) 大大增強，可以使晶體顆粒容易聚集。外來複合物的黏結可以進一步促進聚集的強度，例如異常的自我聚集 Tamm-Horsfall 蛋白或是一些巨大分子，這些複合物可以附著在晶體表面使得晶體間互相粘著，粘著鍵合力的大小視複合物分子的特性而定，它可以大到足以克服分離晶體的電位 (Zeta potential)。一旦聚集形成，它可以被固體橋 (solid bridge) 或稱作沉澱橋 (precipitation bridge) 所穩定，也就是說兩個晶體顆粒由結晶物質所連接，固體橋可以是陷在兩晶體顆粒間的晶體或鄰近的兩個晶格重新排列所形成。

第六節、草藥治療及預防尿路結石的文獻回顧

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、降低腎功能、增加結石復發率等風險 [30, 31]。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 [32]，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 [33]。

因為尚無有效而且副作用低的內科藥物，可用來預防或治療尿路結石。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尿路結石的長久歷史，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尿路結石上。以下介紹一些文獻研究的成果：

Herniaria hirsute 是一種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。在體外實驗中顯示，*Herniaria*

hirsute 的萃取液可以促進草酸鈣結晶的成核作用 (nucleation)，是經由增加晶體的數目，但是減少晶體的大小來達成。它也促進雙水草酸鈣 (CaOx dihydrate) 結晶的形成，但是減少單水草酸鈣 (CaOx monohydrate) 結晶的形成。最後，它可以明顯地抑制草酸鈣結晶的聚集作用 (aggregation) [34]。在大鼠的實驗中，用 *Herniaria hirsute* 來治療的組別，尿液中鈣離子和草酸離子可以保持恆定；尿液中大部分的草酸鈣結晶為小的雙水草酸鈣結晶；腎臟切片中發現較少的草酸鈣結晶沉澱 [35]。

Tribulus terrestris 和 *Bergenia ligulata* 這二種草藥，在印度普遍被使用來治療尿路結石。Joshi 等人利用 double diffusion gel growth technique 的技術測定單水草酸鈣的形成抑制作用，發現兩者皆有良好的抑制作用，*Bergenia ligulata* 的抑制作用較 *Tribulus terrestris* 為佳 [36]。

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 [37]。

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 [38]。

日本學者對於中草藥抗尿路結石有較多和深入研究。日本 Suzuki 等學者研究澤瀉 (Takusha, *Alismatis Rhizoma*)，發現對於草酸鈣結晶的形成、生長、聚集皆有明顯的抑制作用 [39]。在動物實驗中，也證實澤瀉能有效抑制腎臟草酸鈣結石的生成，並可以降低結石相關蛋白 osteopontin 的表現 [40]。

Utsunomiya 發現澤瀉 (Takusha) 和夏枯草 (Kagosou) 能明顯的抑制草酸鈣結晶的生長、聚集 [41]。Koide 也證實了上述的結果，但是在接續的動物實驗中，澤瀉可以抑制腎臟草酸鈣結晶的形成，但夏枯草則無此作用；又使用豬苓湯 (Chorei-to) 來進行動物實驗，使用低劑量

的豬苓湯相當於人一天服用的劑量，展現出明顯的抑制結石作用。相反的，在高劑量下並無此抑制作用 [42]。

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，收集服用前和服用後二十四小時的尿液，分析其中的變量，有鈣離子、磷離子、鎂離子、尿酸、草酸、檸檬酸；也測量尿液對於草酸鈣結晶的抑制作用。結果顯示服用豬苓湯前和服用後，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 [43]。

Liu 等學者用高磷食物 (含有1.5% P) 飼養大鼠，造成鼠腎 hydroxyapatite (Ca and P) 的沉積。實驗分成七組，飼養兩星期：分別是對照組 (高磷食物，含有1.5% P)、飼養五苓散組 (0.5 g/kg body weight) 和各別飼養五苓散的五種單味藥組 (0.5 g/kg body weight)。結果發現飼養五苓散的組別，腎臟中的鈣化沉積較對照組輕微；飼養五種單味藥的五個組別，腎臟中的鈣化沉積與對照組無明顯差異 [44]。*Phyllanthus niruri* (珍珠草) 在巴西是一種民間常使用來治療尿路結石的草藥。在體外實驗中，珍珠草萃取液並不能抑制草酸鈣結晶的生成，而且產生更多比對照組體積小的結晶。但是在結晶的聚集方式有顯著的抑制作用 [45]。在臨床實驗方面，在為期三個月的實驗中，發現珍珠草使得高尿鈣尿路結石病人的尿鈣有明顯下降的現象 [46]。

第七節、五苓散的歷史源流

五苓散出自於漢代張仲景《傷寒論》和《金匱要略》書中。其原書中組成與用法如下：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，搗為散，以白酒和服方寸匕，日三服，多飲暖水，汗出愈，如法將息。

要了解五苓散的功效以及主治的病證，先從《傷寒論》和《金匱要略》中有關五苓散的條文來做解析，原條文如下：

一、《傷寒論·辨太陽病脈證並治中》：

1. 太陽病，發汗后，大汗出，胃中乾，煩躁不得眠，欲得飲水者，少少與飲之，令胃氣和則愈。若脈浮，小便不利，微熱消渴者，五苓散主之。(71 條)
2. 發汗已，脈浮數，煩渴者，五苓散主之。(72 條)
3. 傷寒，汗出而渴者，五苓散主之；不渴者，茯苓甘草湯主之。(73 條)
4. 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。(74 條)

二、《傷寒論·辨太陽病脈證並治下》：

1. 病在陽，應以汗解之，反以冷水瀝之，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。(141 條)
2. 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。(150 條)

三、《傷寒論·辨陽明病脈證並治》：

1. 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，大便必硬，不更衣十日，無所苦也。渴欲飲水，少少與之，但以法救之。渴者，宜五苓散。(244 條)

四、《傷寒論·辨霍亂脈脈證並治》：

1. 霍亂，頭痛發熱，身疼痛，熱多欲飲水者，五苓散主之。(386 條)

五、《金匱·痰飲篇》：

1. 假令瘦人，臍下有悸，吐涎沫而顛眩，此水也，五苓散主之。

歸納以上條文，仲景使用五苓散治療病證有，一為太陽蓄水證；二為水逆證；三為太陽病誤治，用水療法或下法後產生的停水證，有口渴，小便不利症狀出現時；四為霍亂。五為治顛眩的水氣病。

仲景以降的歷代醫家也大量廣泛的使用五苓散治療各種病證。又以五苓散為基礎，化裁出許多有名的方劑。《千金方》用以治時行熱病，狂言煩躁不安。《三因方》用以治伏暑飲熱，壅溢發衄。《傷寒百問經絡圖》用以治瘴氣、溫瘧、黃疸。《濟生方》用加味五苓散治伏暑熱二氣，及胃濕泄瀉注下。其他有名的化裁方劑有《金匱要略》中茵陳五苓散，治濕熱發黃。《丹溪心法》中胃苓湯治傷濕食滯，脘腹脹痛泄瀉，小便短少。《明醫指掌》中四苓散治濕傷脾胃，便溏尿少。《溫病條辨·中焦篇寒濕》中治太陰脾家寒濕，以五苓散去桂加厚朴、秦皮，或加木瓜、草果。

到了現代，各醫家使用五苓散的治療範圍更廣泛，遍佈各科，諸如胸腔積液、心臟衰竭、胃腸炎、肝炎、眩暈、腎炎、水腫、泌尿系統感染、結石、腦積水、婦產科及皮膚科等多種疾病 [47]。

五苓散自張仲景以降，已經有兩千年的使用歷史，歷代醫家亦不斷擴充其臨床的治療範圍，為其建立完備的理論基礎和豐富的臨床實踐經驗，在古代醫書中有許多使用五苓散在淋證或小便不利的記載 [13]，在現代亦常常使用在泌尿系統感染、結石的問題上。

第八節、文獻探討小結

尿路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 [28]。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，可用來預防或治療尿路結石。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尿路結石的長久歷史，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。

五苓散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，溫陽化氣。古代經典中有使用在淋證或小便不利的記載 [13]，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五苓散或其中單味藥的研究。所以，五苓散在各方面的療效及作用是值得深入探討的，本研究著重於五苓散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。

第九節 研究動機與目的

臨床上，尿路結石的治療方式以體外震波碎石術或是內視鏡碎石術為主，治療已經到達安全、方便、副作用小的一個程度，但是復發率仍然居高不下。在利用藥物預防復發方面，目前並沒有確切有效的藥物來預防尿路結石。如此一來，尿路結石的高復發率對於病人的健康造成很大的威脅，同時也耗費了龐大的醫療資源。因此，發展有效的預防性內科藥物是一個值得積極研究的議題。

縱觀許多學者的研究 [34-46]，發現中草藥可能有卓越的預防尿路結石的功效，因此這是一個很好的發展預防性抗結石藥物的範疇。其中五苓散亦有文獻提出其抗結石的功效。從 Yoshimura 等學者的研究中 [43]，發現五苓散能使得健康男性尿液中的鎂離子明顯增加以及尿液對於草酸鈣結晶亦顯示明顯抑制作用，其中的作用機轉尚未明了，這是我們必須要研究明白的。

五苓散在中國已經有兩千年的臨床運用歷史。古籍記載有使用在治療石淋和砂淋，現代亦常使用在尿路結石的問題上。在長期的臨床實踐經驗中，並沒有嚴重的副作用被觀察到，顯示五苓散是一個安全的治療方劑。又依照中國醫學的理論基礎，主要是以複方來治療疾病，這樣一方面可以加強療效，一方面可以減少副作用發生。所以，研究複方較研究單方符合臨床的應用。因此，本研究先選用五苓散為研究對象而非其中的五種單一藥物。

從Liu等學者的研究中 [44]，了解五苓散能有效抑制腎臟中磷酸鈣沉積。但是Liu利用的動物模型是以餵養高磷食物來誘發鼠腎磷酸鈣的沉積。然而，臨床上以草酸鈣結石最為常見。因此，為了預防大部分的尿路結石，應該從草酸鈣結石著手。所以，本研究以餵養乙二醇來誘發鼠腎草酸鈣的沉積來做為動物模型，如此較能符合臨床的真實情況。

本研究透過體外和動物實驗來研究五苓散對於草酸鈣結晶的抑制作用，冀望研究結果將來可以運用於臨床預防結石的復發上。此外，也希望透過本研究建立良好的實驗平台和動物模式來篩選具抗結石功效的中草藥。

第三章、材料與方法

第一節、概述

在實驗方法中，分成兩部份來進行，第一部份是探討五苓散對於體外草酸鈣結晶形成的三個步驟其抑制作用，第二部份是探討五苓散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. Magnetic stirrer : IKA, China。
2. 紅外線光譜儀 : Shimazu IR-7, Tokyo, Japan。
3. Autoclave : Tomin TM-328, Taiwan。
4. 離心機 : HERMLE Z200A, Germany。
5. Drying oven : DENG YNG D045, Japan。
6. Microfilter : Millex-GV 0.22 μ m filter, Millipore, USA。
7. 塑膠比色管 : Semimicro Disposable Cuvette, Ratiolab, Germany。
8. 石英比色管 : Hellma 104.600-QG, Germany。
9. 分光光度計 (Spectrophotometer) : Hitachi U-2001, Japan。
10. 恆溫循環水槽系統 : YIHDER BT-350, Taiwan。
11. 超音波震盪器 : DELTA D150, Taiwan。
12. Sprague-Dawley rat : 國科會, 台灣。

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. 本實驗所用試劑皆從 Sigma (產地: USA) 公司購得，為 analytical grade 的試劑，如氯化鈣、草酸鉀、醋酸鈉等等。
2. 五苓散 : Wu-Li-San, 科達製藥股份有限公司, 台灣台中。
3. 0.75% 乙二醇 : Ethylene glycol, Sigma (E9129), USA。

第四節、製備五苓散萃取液的實驗方法

藥物來源：

五苓散是使用科達 (Koda) 製藥股份有限公司所提供的科學中藥粉末製劑。五苓散的組成為茯苓 (*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，其重量比例為 3:3:3:4:2，其中賦形劑為澱粉 (starch)。

五苓散萃取液的製備流程：

先秤取 100 g 的五苓散粉末，將其倒入 1000 ml 玻璃瓶中，加入 500 ml 的去離子水，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，此時再加入去離子水直至 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。

秤取五苓散萃取液的乾重：

取出 1 ml 製備完成的五苓散萃取液，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 中含五苓散的乾重。實驗重複兩次，取平均值。

製備不同濃度的五苓散萃取液：

在體外結晶三大步驟的實驗中，將藥液製備成五種濃度：3.125 mg/ml、6.25 mg/ml、12.5 mg/ml、25 mg/ml、50 mg/ml。

在動物實驗中，將藥液製備成一種濃度：80 mg/ml。

第五節、結晶三大步驟的實驗方法

首先，要製備好單水草酸鈣晶種待用。然後依照結晶三大步驟的實驗方法操作，包括結晶成核、結晶成長和結晶聚集 [48]。

一、製備草酸鈣晶種

將 100 ml 的 0.25 M 草酸鉀溶液緩緩加入到 100 ml 的 0.25 M 的氯化鈣溶液中，不停的攪拌，將溶液溫度維持在 85 °C，調整此溶液的 pH 值降至 4.0 為止，可以利用 HCL 和 NaOH 滴定至適當 PH 值。之後再攪拌 8 小時，然後靜置整夜。靜置後，把上清酸液緩緩倒掉，再加入去離子水清洗這些晶種，洗到此上清液的 pH 值升至 6.5 為止。製備好之晶種用紅外線光譜儀檢查確定為單水草酸鈣。

二、結晶成核的抑制實驗

1. 對照組：

先分別配好 100 ml 的 8.5 mM 氯化鈣溶液（內含 200 mM 的氯化鈉和 10 mM 的醋酸鈉，pH 5.7 的緩衝溶液）和 100 ml 的 1 mM 草酸鉀溶液（內含 200 mM 的氯化鈉和 10 mM 的醋酸鈉，pH 5.7 的緩衝溶液）。在使用前先用 0.22 μ m 的 Millex-GV 膜過濾此兩溶液，以去除會影響實驗的大分子。

取 1 ml 的 8.5 mM 的氯化鈣溶液加入塑膠比色管中，控制環境在 37 °C，500 rpm 下，再加入 0.1 ml 的去離子水，最後再加入 1 ml 的 1 mM 的草酸鉀溶液，使其均勻的混合，至終濃度為 4.0 mM 以上的鈣離子和 0.47 mM 以上的草酸根離子，用 620 nm 的光源測此混合液的吸光值，測 10 分鐘，每 10 秒測一次 [49]。實驗均進行三次，取平均值為統計之用。

2. 實驗組：

取 1 ml 的 8.5 mM 的氯化鈣溶液加入塑膠比色管中，控制環境在 37

°C，500 rpm 下，再加入 0.1 ml 的五苓散萃取液，最後再加入 1 ml 的 1 mM 的草酸鉀溶液，用 620 nm 的光源測此混合液的吸光值，測 10 分鐘，每 10 秒測一次。實驗均進行三次，取平均值為統計之用。

草酸鈣晶體成核活性抑制的計算方式如下：

比較對照組與各實驗組的誘導時間 (Induction time, T_i)。

T_i 相當於加入草酸鉀溶液直到產生草酸鈣晶核的數量和大小可被分光光度計測量到的一段時間。 T_i 是實驗組吸光值改變量到達對照組最高吸光值改變量的 2.5 % 時所需要的時間。

三、結晶成長的抑制實驗

1. 對照組：

將之前製備好的單水草酸鈣晶種取出使用，將其懸浮在內含 200 mM 的氯化鈉和 10 mM 的醋酸鈉的緩衝溶液中 (pH 5.7)；晶體濃度為 1.5 mg/ml。使用前，利用超音波振盪 30 分鐘，取出後搖晃混合均勻使用。

再把此 3 ml 的單水草酸鈣晶體混合液，加至 27 ml 超穩定 (metastable) 的草酸鈣溶液中；此超穩定溶液中有 0.833 mM 氯化鈣及 0.167 mM 的草酸鈉，俾使晶種的最終濃度維持在 0.15 mg/ml 以上 [50]。

然後取出 2 ml 的晶體生長反應溶液，加入 0.1 ml 的去離子水，溫度維持在 37 °C，讓其反應 40 分鐘。反應後，讓溶液通過 0.22 μ m 孔隙的過濾膜，去掉晶體，濾液加入石英比色管中，再用 214 nm 的光源測此澄清液的吸光值，每 10 秒測一次 [51]。實驗均進行三次，取平均值為統計之用。

2. 實驗組：

加入 0.1 ml 的五苓散萃取液至 2 ml 的晶體生長反應溶液，溫度維持在 37 °C，讓其反應 40 分鐘。反應後，讓溶液通過 0.22 μ m 孔隙的過濾膜，去掉晶體，濾液加入石英比色管中，再用 214 nm 的光源測此澄清液的吸光值，每 10 秒測一次。實驗均進行三次，取平均值為統計

之用。

草酸鈣晶體成長活性抑制的計算方式如下：

$$\text{抑制百分比(\%)} = \frac{A_0 - A_i}{A_0} \times 100 \%$$

A_0 是 400 秒時對照組的吸光值變化， A_i 代表加入五苓散萃取液時的吸光值變化。

四、結晶聚集的抑制實驗：

1. 對照組：

將之前製備好的單水草酸鈣晶種取出使用，將其懸浮在內含 200 mM 的氯化鈉和 10 mM 的醋酸鈉的緩衝溶液中 (pH 5.7)，晶體濃度約 0.8 mg/ml。再將此一懸浮液混合均勻，放在超音波下震盪 60 分鐘，並放置在 37 °C 下至隔天。

要使用之前，須要再一次檢查 pH 值，並放在超音波下再震盪 30 分鐘。然後取出混合均勻的懸浮液 20 ml，再加入 1.0 ml 的去離子水，以 20:1 的比例混合，讓混合液在 37 °C，60 rpm 下，搖動 2 個小時。

2 個小時後，再把此溶液混合均勻，快速的取出 2 ml 至塑膠比色管中，再放入分光光度計中，一開始條件控制在 1100 rpm，37 °C 下，用 620 nm 的光源測至吸光值穩定經過 10 秒之後，再把條件控制在 500 rpm、37 °C 下，用 620 nm 的光源測溶液吸光值經過 180 秒，然後停止攪拌，使單水草酸鈣晶體發生自發性的沉澱，用 620 nm 的光源測溶液吸光值經過 300 秒，吸光值每 10 秒測一次 [52]。實驗均進行三次，取平均值為統計之用。

2. 實驗組：

要使用 0.8 mg/ml 單水草酸鈣晶體懸浮液之前，須要再一次檢查 pH 值，並放在超音波下再震盪 30 分鐘。然後取出混合均勻的懸浮液 20 ml，再加入 1.0 ml 的五苓散萃取液，以 20:1 的比例混合，讓混合液在 37 °C，60 rpm 下，搖動 2 個小時。

2 個小時後，再把此溶液混合均勻，快速的取出 2 ml 至塑膠比色管中，再放入分光光度計中，一開始條件控制在 1100 rpm，37 °C 下，用 620 nm 的光源測至吸光值穩定經過 10 秒之後，再把條件控制在 500 rpm、37 °C 下，用 620 nm 的光源測溶液吸光值經過 180 秒，然後停止攪拌，使單水草酸鈣晶體發生自發性的沉澱，用 620 nm 的光源測溶液吸光值經過 300 秒，吸光值每 10 秒測一次。實驗均進行三次，取平均值為統計之用。

草酸鈣晶體聚集活性抑制的計算方法如下：

$$\text{抑制百分比(\%)} = (S_0 - S_t / S_0) \times 100 \%$$

S_0 是對照組的吸光值下降斜率， S_t 是有加五苓散萃取液的吸光值下降斜率。

第六節、動物實驗的步驟

動物實驗分成兩大組來進行，第一大組飼養三週，第二大組飼養四週。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 [53]。

第一大組：飼養三週

第一大組使用 12 隻雄性 Sprague-Dawley 品系的大白鼠，體重大約為 320 g。以隨機分組的方式分成四個小組，飼養三週。

第一小組 (Group 3.1) 為對照組，以 0.75 % 乙二醇加入食用水中餵養，沒有任何的中藥治療。

第二小組 (Group 3.2) 為低劑量治療組，除了以 0.75 % 乙二醇加入食用水中餵養外，每天用胃管灌食五苓散萃取液 (濃度 80 mg/ml) 1.5 ml 一次。

第三小組 (Group 3.3) 為中劑量治療組，除了以 0.75 % 乙二醇加

入食用水中餵養外，每天用胃管灌食五苓散萃取液（濃度 80 mg/ml）3.0 ml 一次。

第四小組（Group 3.4）為高劑量治療組，除了以 0.75 % 乙二醇加入食用水中餵養外，每天用胃管灌食五苓散萃取液（濃度 80 mg/ml）4.5 ml 一次。

Group 3.2、Group 3.3、Group 3.4 的平均劑量各別為 375 mg/kg、750 mg/kg、1125 mg/kg。

第二大組：飼養四週

第二大組使用 12 隻雄性 Sprague-Dawley 品系的大白鼠，體種大約 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 4.1）為對照組，以 0.75 % 乙二醇加入食用水中餵養，沒有任何的中藥治療。

第二小組（Group 4.2）為低劑量治療組，除了以 0.75 % 乙二醇加入食用水中餵養外，每天用胃管灌食五苓散萃取液（濃度 80 mg/ml）1.5 ml 一次。

第三小組（Group 4.3）為中劑量治療組，除了以 0.75 % 乙二醇加入食用水中餵養外，每天用胃管灌食五苓散萃取液（濃度 80 mg/ml）3.0 ml 一次。

第四小組（Group 4.4）為高劑量治療組，除了以 0.75 % 乙二醇加入食用水中餵養外，每天用胃管灌食五苓散萃取液（濃度 80 mg/ml）4.5 ml 一次。

Group 4.2、Group 4.3、Group 4.4 的平均劑量各別為 375 mg/kg、750 mg/kg、1125 mg/kg。

飼養期間終止後，所有大白鼠用 isoflurane 麻醉，以空氣注射心臟致死，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。

以偏光顯微鏡評估鼠腎切片

如同Nelde所述 [54]，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(-, +, ++, +++)(附錄一)，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)。

評估時，每隻大鼠選取一邊的鼠腎切片，在皮質(cortex)處隨機選取10個視野(field)，每個視野給予一個結晶沉積指數。

第七節、資料分析

在結晶三大步驟的實驗中，資料數值以 mean \pm standard deviation 來表示。將資料以 one-way ANOVA 分析，若 $p < 0.05$ 代表有顯著意義，然後再以 Tukey-Kramer test 做事後檢定，若事後檢定 $p < 0.05$ 代表有顯著意義。本實驗的統計以微軟公司出品的 EXCEL軟體和 SPSS公司出品的 SPSS 10.0 for windows 來進行計算。

在動物實驗中，資料數值以 mean \pm standard deviation 來表示。將資料以 Kruskal-Wallis test 分析，若 $p < 0.05$ 代表有顯著意義，然後再以 Mann-Whitney test 做事後檢定，若事後檢定 $p < 0.0125$ 代表有顯著意義。本實驗的統計以 SPSS公司出品的 SPSS 10.0 for windows 來進行計算 [55, 56]。

第四章、結果

第一節、概述

在實驗結果中分成二部份：一、五苓散萃取液對於結晶三大步驟的實驗結果；二、動物實驗的結果。從此二個方向去探討五苓散在體外和動物實驗上抑制草酸鈣結晶的關係。

第二節、結晶三大步驟的實驗結果

一、結晶成核的抑制實驗：

五苓散萃取液可以明顯抑制草酸鈣晶體成核活性，隨濃度增加，呈現劑量依存性 (dose-dependent)。Table 1. 顯示出對照組和五組實驗組的誘導時間 (T_i , sec)。對照組誘導時間為 30 ± 0.0 秒。除了 3.125 mg/ml 組無統計意義之外，其他四組皆可明顯延長誘導時間 ($p < 0.001$)，抑制作用各別到達 344, 387, 543, 和 943%。Figure 1~6 分別圖示各組吸光值隨著時間的變化：

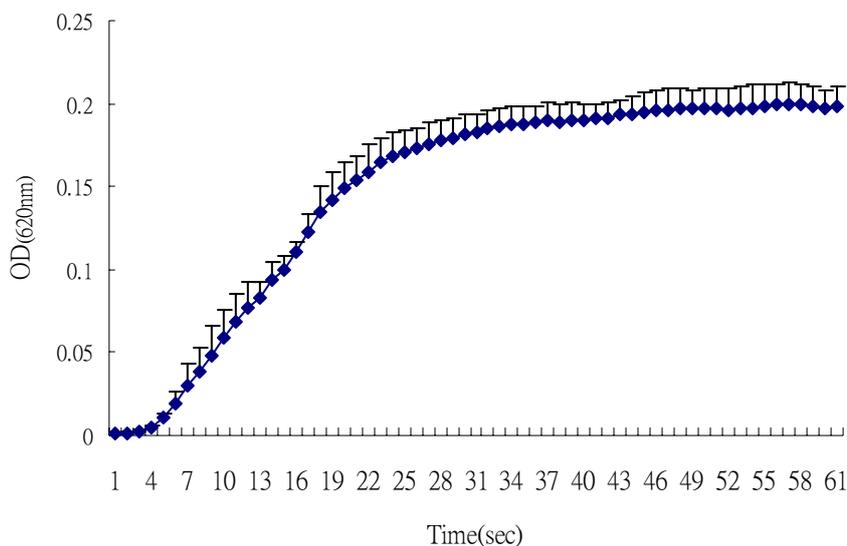


Figure 1. 對照組，實驗進行三次，取 mean \pm SD 做圖

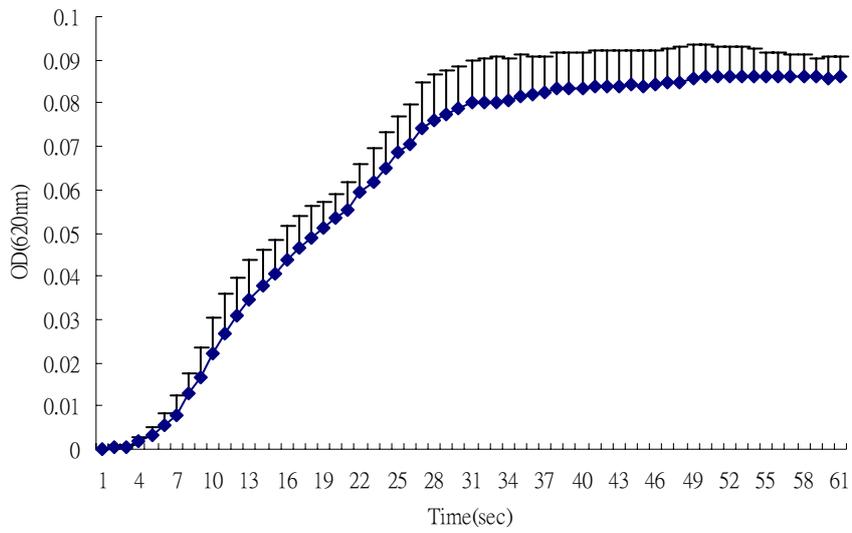


Figure 2. 3.125 mg/ml 組，實驗進行三次，取 mean±SD 做圖

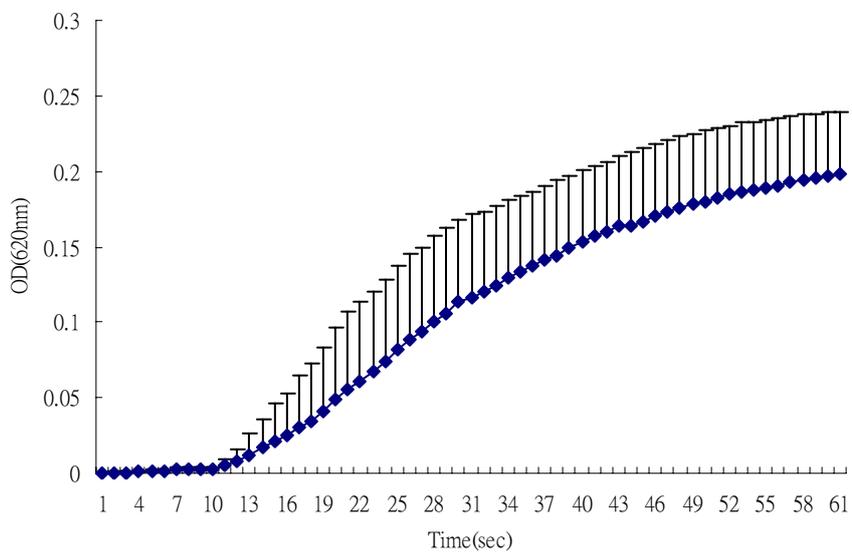


Figure 3. 6.25 mg/ml 組，實驗進行三次，取 mean±SD 做圖

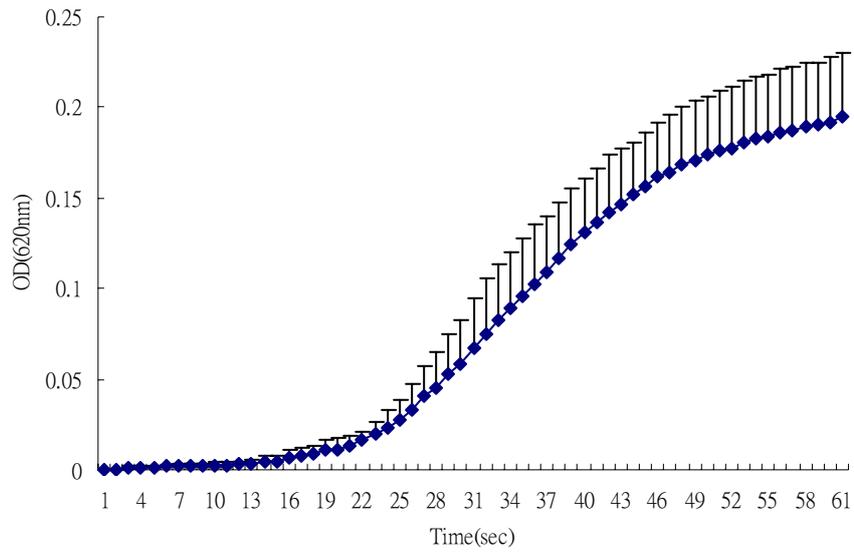


Figure 4. 12.5 mg/ml 組，實驗進行三次，取 mean±SD 做圖

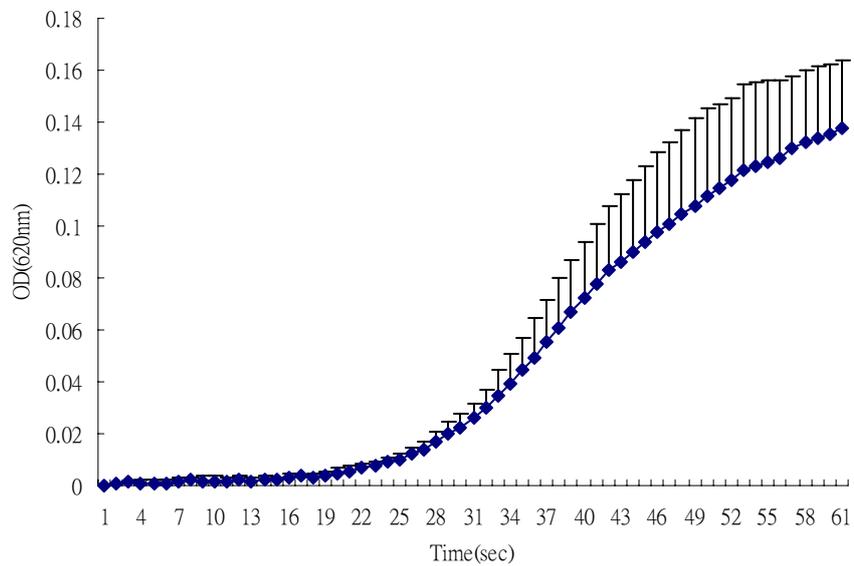


Figure 5. 25 mg/ml 組，實驗進行三次，取 mean±SD 做圖

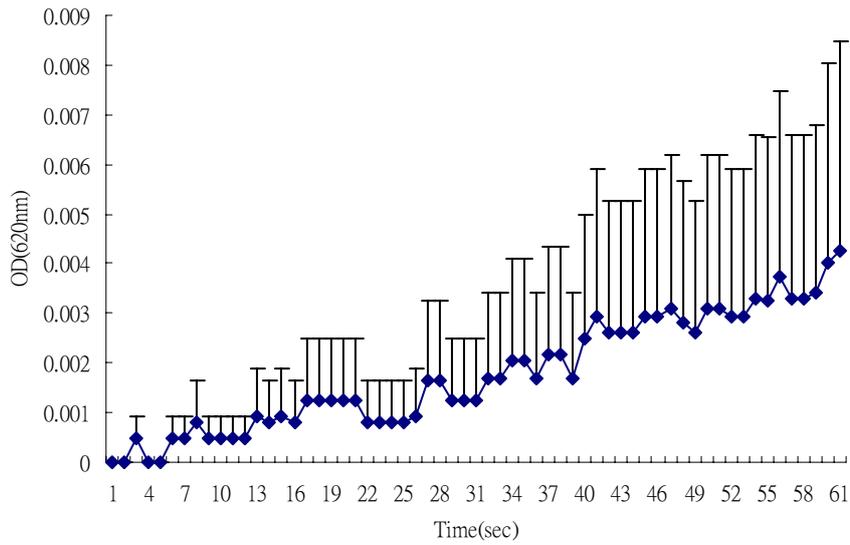


Figure 6. 50 mg/ml 組，實驗進行三次，取 mean±SD 做圖

二、結晶成長的抑制實驗：

如 Table 2. 所顯示，五苓散萃取液在 3.125 和 6.25 mg/ml 的濃度下，可以抑制草酸鈣晶體成長活性分別達到 28.8 % 和 16.46 %，但是沒有統計上的意義。然而在 12.5 mg/ml 的濃度下，卻可以促進草酸鈣晶體成長活性達到 371 % ($p < 0.001$)。在超過 25 mg/ml 以上的濃度，214 nm 的光源會被完全吸收，所以吸光值沒有任何變動。但是因為五苓散萃取液本身的顏色或物質在 214 nm 光源的分析下會影響吸光值的變化 (Fig. 20)，所以本實驗結果不能反應真正的結晶成長抑制作用。

Figure7~12 分別圖示各組吸光值隨著時間的變化：

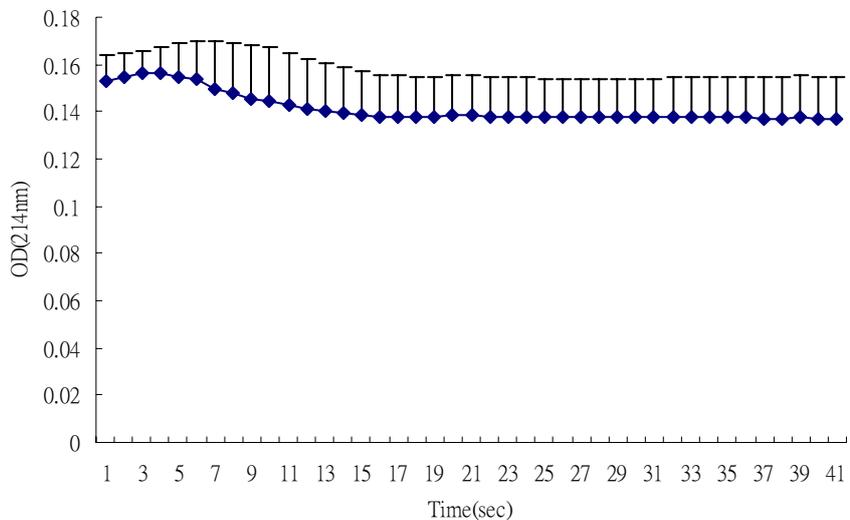


Figure 7. 對照組，實驗進行三次，取 mean±SD 做圖

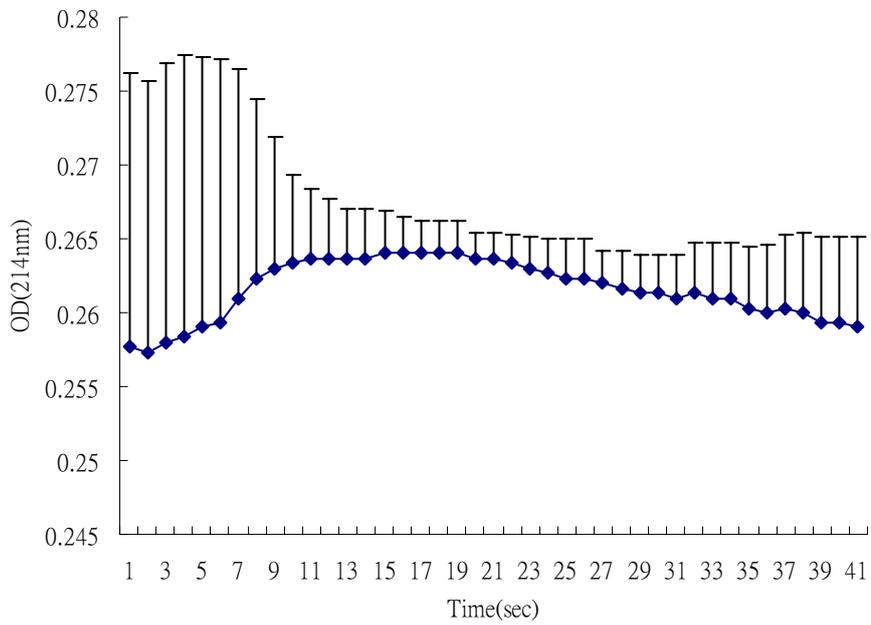


Figure 8. 3.125mg/ml 組，實驗進行三次，取 mean±SD 做圖

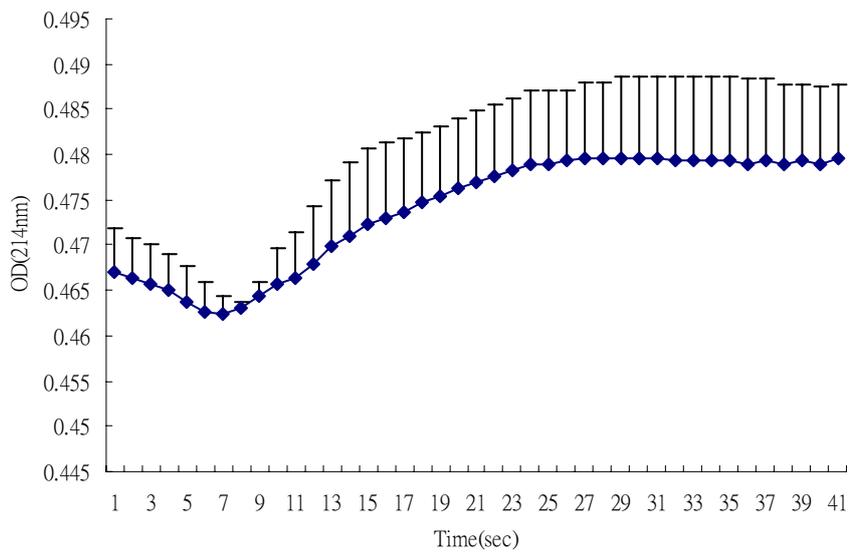


Figure 9. 6.25mg/ml 組，實驗進行三次，取 mean±SD 做圖

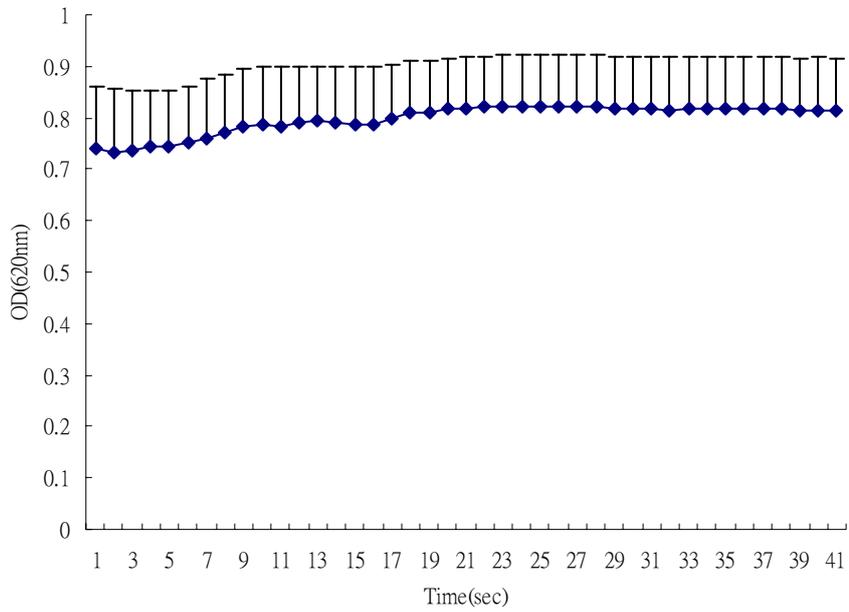


Figure 10. 12.5mg/ml 組，實驗進行三次，取 mean±SD 做圖

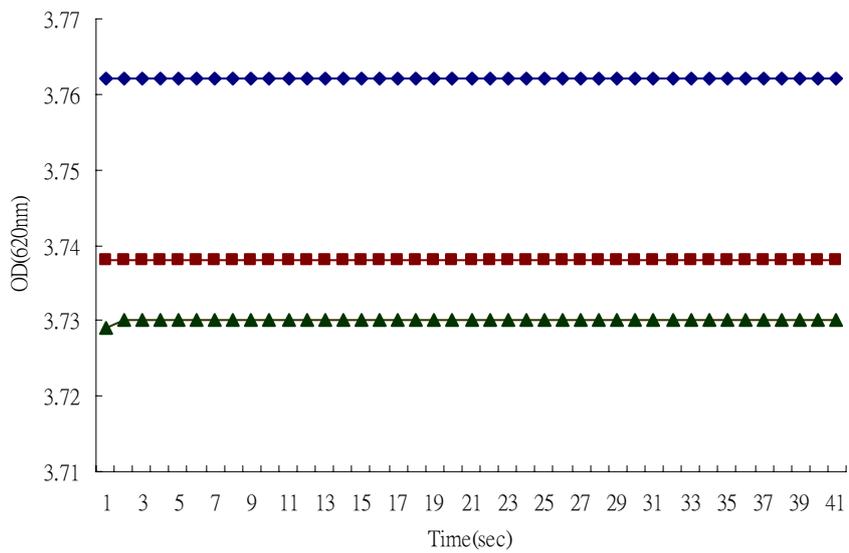


Figure 11. 25mg/ml 組，實驗進行三次，分別做圖

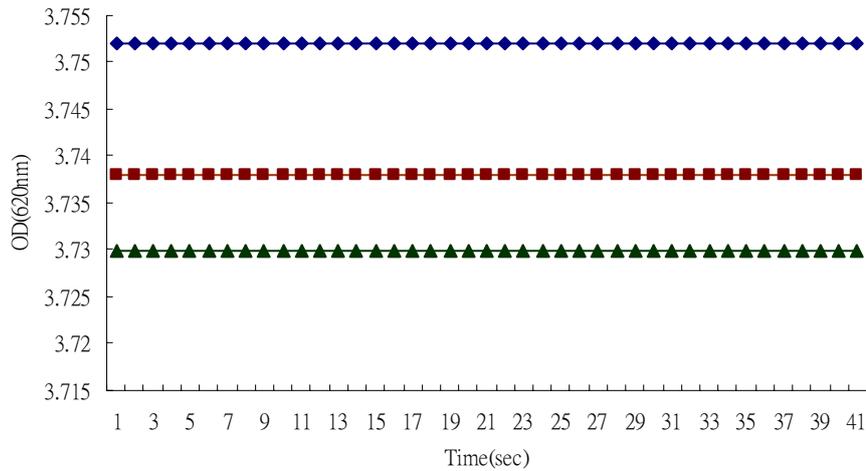


Figure 12. 50mg/ml 組，實驗進行三次，分別做圖

三、結晶聚集的抑制實驗：

五苓散萃取液可以明顯抑制草酸鈣晶體聚集活性，呈現劑量依存性 (dose-dependent)。Table 3. 顯示五組實驗組的抑制百分比。在 3.125 和 6.25 mg/ml 這兩組抑制作用相近，分別為 53.96 % 和 49.29 %。在 12.5 和 25 mg/ml 這兩組抑制作用相近，分別為 74.24 % 和 75.05 %。在 50mg/ml 這組有高達 92.49 % 的抑制百分比。Figure13~18 分別圖示各組吸光值隨著時間的變化：

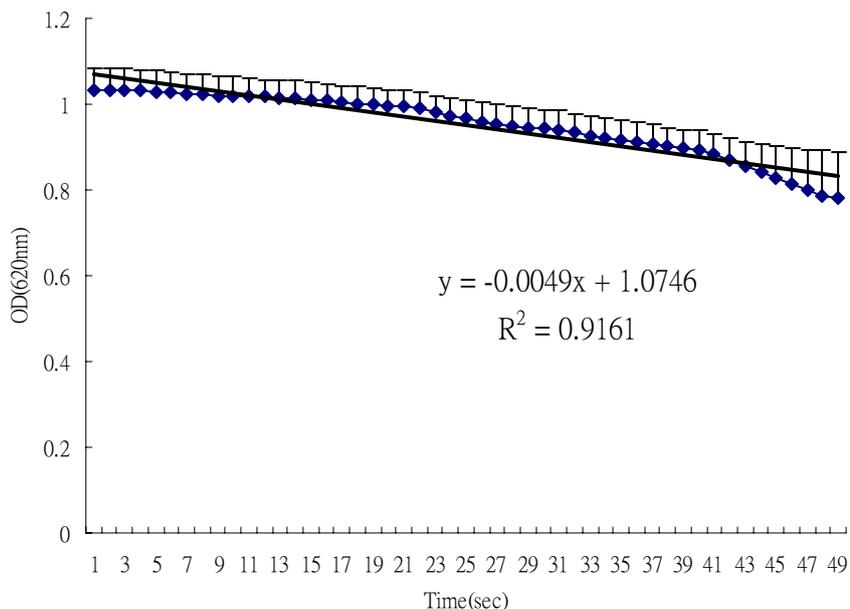


Figure 13. 對照組，實驗進行三次，取 mean±SD 做圖

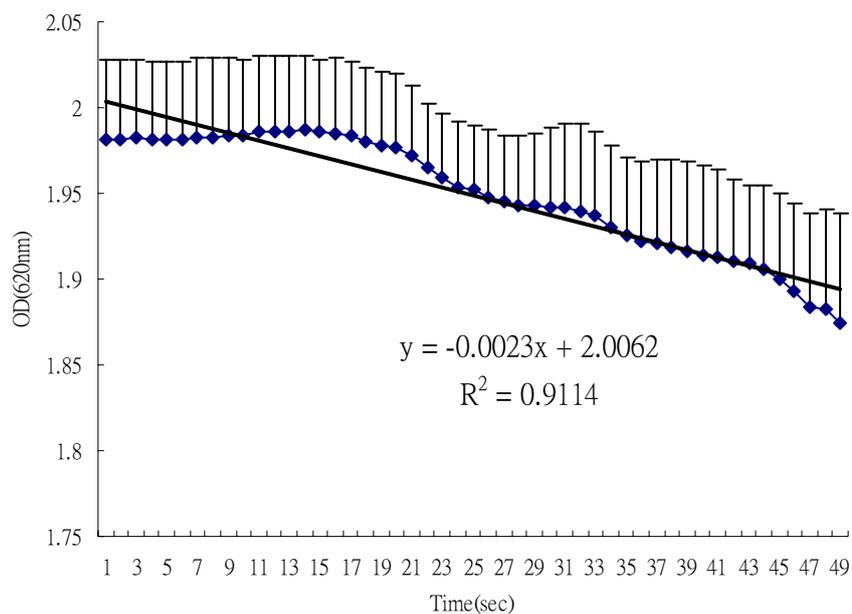


Figure 14. 3.125mg/ml 組，實驗進行三次，取 mean±SD 做圖

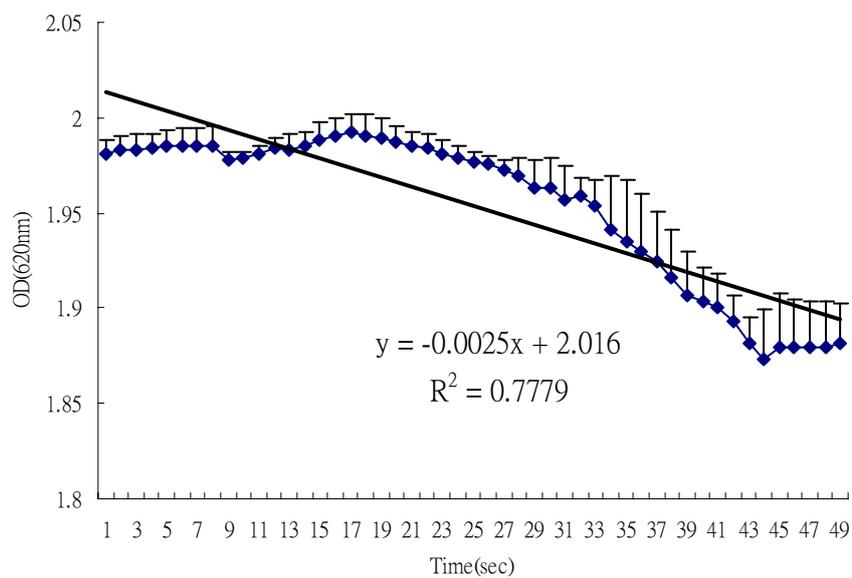


Figure 15. 6.25mg/ml 組，實驗進行三次，取 mean±SD 做圖

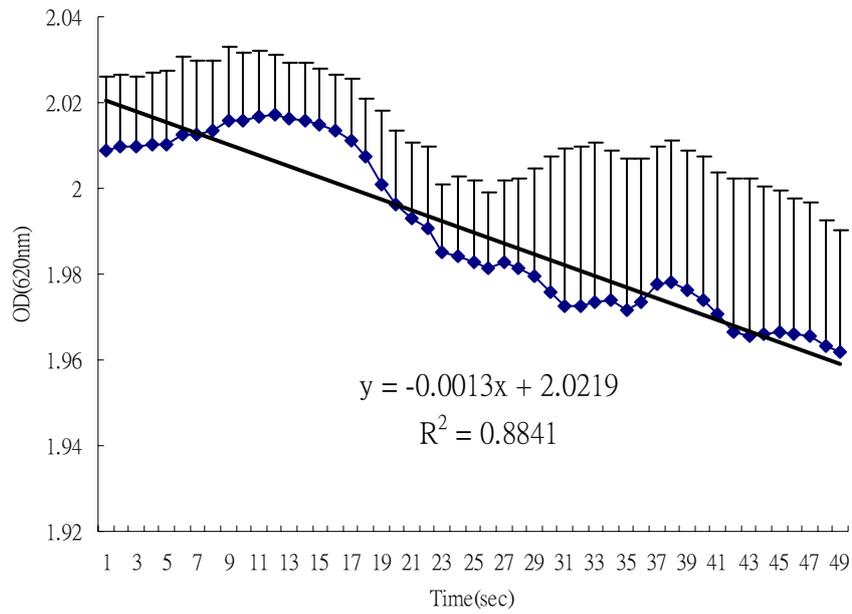


Figure 16. 12.5mg/ml 組，實驗進行三次，取 mean±SD 做圖

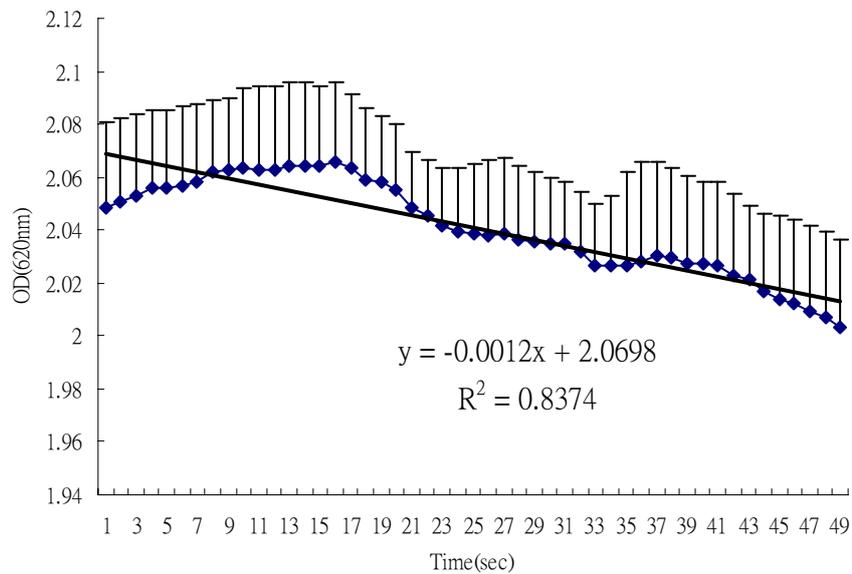


Figure 17. 25mg/ml 組，實驗進行三次，取 mean±SD 做圖

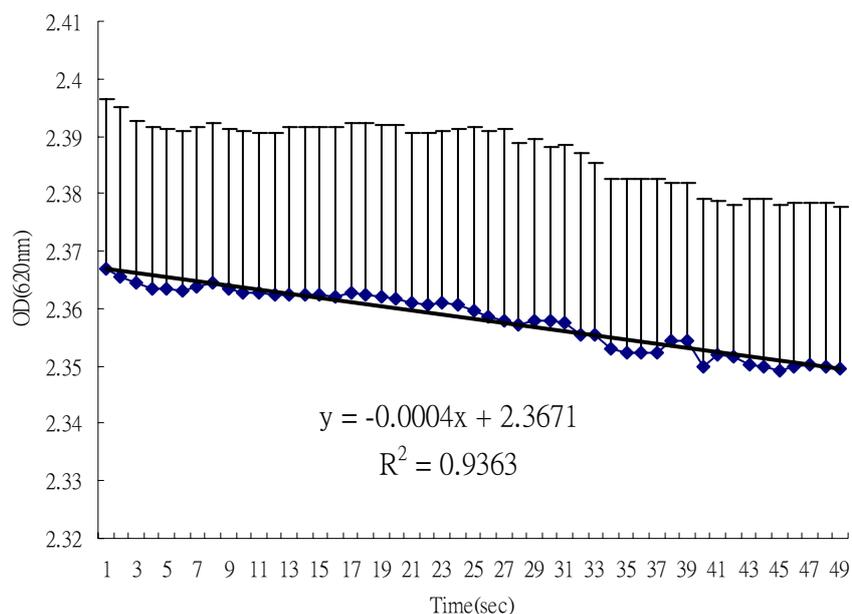


Figure 18. 50mg/ml 組，實驗進行三次，取 mean±SD 做圖

Table 1. 在五種濃度的五苓散萃取液下，結晶成核的誘導時間 (Induction time, T_i , sec)

Experimental condition	Induction time (T_i , sec)	Significance (Turkey test)
control group	30.00 ± 0.00	
WLS 3.125 mg/ml	46.67 ± 9.43	0.991
WLS 6.25 mg/ml	133.33 ± 32.99	0.034
WLS 12.5 mg/ml	146.67 ± 32.99	0.016
WLS 25 mg/ml	193.33 ± 16.99	0.001
WLS 50 mg/ml	313.33 ± 49.22	0.000

Data are expressed as mean ± SD, which present in triplicate experiments.

p value of ANOVA test < 0.05

Turkey test, compared with control group

Table 2. 在五種濃度的五苓散萃取液下，結晶成長的抑制百分比(%)

Experimental condition	Inhibition (%)	Significance (Turkey test)
WLS 3.125 mg/ml	28.80 %	0.989
WLS 6.25 mg/ml	16.46 %	0.998
WLS 12.5 mg/ml	-371. %	0.018
WLS 25 mg/ml	-	-
WLS 50 mg/ml	-	-

Data are present in triplicate experiments.

p value of ANOVA test < 0.05

Turkey test, compared with control group

Table 3. 在五種濃度的五苓散萃取液下，結晶聚集的抑制百分比(%)

Experimental condition	Inhibition (%)	Significance(Turkey test)
WLS 3.125 mg/ml	53.96 %	0.000
WLS 6.25 mg/ml	49.29 %	0.000
WLS 12.5 mg/ml	74.24 %	0.000
WLS 25 mg/ml	75.05 %	0.000
WLS 50 mg/ml	92.49 %	0.000

Data are present in triplicate experiments

p value of ANOVA test < 0.05

Turkey test, compared with control group

第三節、動物實驗的結果

以光學顯微鏡觀察三週及四週對照組的鼠腎切片，發現許多草酸鈣結晶沉積在皮質處的腎小管，但是相對較少的草酸鈣結晶沉積在髓質處的腎小管或是收集小管。在許多小管中，結晶會聚集成較大的微小結石 (mini-stones)。此外，也觀察到有較少量和硬化的腎小球、嚴重的腎小管擴張和破壞、大量的細胞腫脹、大量的纖維化的組織形成以及嚴重的血尿。以結晶的沉積和腎臟組織的破壞而言，四週對照組均較三週對照組嚴重。相對地，三週及四週實驗組的鼠腎切片有較少的草酸鈣結晶沉積，在Group 3.2，一隻大鼠腎臟中有少量草酸鈣結晶沉積，另二隻大鼠腎臟中沒有發現草酸鈣結晶沉積；在Group 3.3，二隻大鼠腎臟中有少量草酸鈣結晶沉積，另一隻大鼠腎臟中沒有發現草酸鈣結晶沉積；在Group 3.4，一隻大鼠腎臟中有少量草酸鈣結晶沉積，另二隻大鼠腎臟中沒有發現草酸鈣結晶沉積。在Group 4.2，一隻大鼠腎臟中有少量草酸鈣結晶沉積，另二隻大鼠腎臟中沒有發現草酸鈣結晶沉積；在Group 4.3，一隻大鼠腎臟中有少量草酸鈣結晶沉積，另二隻大鼠腎臟中有大量草酸鈣結晶沉積；在Group 4.4，一隻大鼠腎臟中有大量草酸鈣結晶沉積，另二隻大鼠腎臟中沒有發現草酸鈣結晶沉積。另外，三週實驗組腎臟組織均保持相當完整，只有在少部分區域有細胞腫脹的現象。

以偏光顯微鏡觀察，評估各組的結晶沉積指數(crystal deposition index)，如 Table 4. 所示，Group 3.1 的平均結晶沉積指數為 2.4 ± 0.14 。在 Group 3.2，Group 3.3，Group 3.4 的平均結晶沉積指數都有明顯的下降 ($p < 0.05$)，而且。如 Table 5. 所示，Group 4.1 的平均結晶沉積指數為 2.73 ± 0.094 。在 Group 4.2，Group 4.3，Group 4.4 的平均結晶沉積指數均有明顯的下降 ($p < 0.05$)。

Table 4. 第一大組中四個小組的平均結晶沉積指數 (crystal deposition index)

組別\隻數	1	2	3	Average (mean±SD)	等級平均數	Significance (Mann-Whitney test)
Group 3.1	2.5	2.5	2.2	2.400±0.14	105.17	
Group 3.2	0.0	0.1	0.0	0.033±0.047	44.57	0.000
Group 3.3	0.1	0.0	0.1	0.067±0.047	46.13	0.000
Group 3.4	0.0	0.2	0.0	0.067±0.094	46.13	0.000

p value of Kruskal-Wallis test < 0.05

Mann-Whitney test, compared with Group 3.1

Table 5. 第二大組中四個小組的平均結晶沉積指數 (crystal deposition index)

組別\隻數	1	2	3	Average (mean±SD)	等級平均數	Significance (Mann-Whitney test)
Group 4.1	2.8	2.8	2.6	2.730±0.094	87.5	
Group 4.2	0.0	0.4	0.0	0.133±0.189	32	0.000
Group 4.3	2.8	0.1	3.0	1.970±1.32	72	0.076
Group 4.4	0.0	3.0	0.0	1.000±1.41	50.5	0.000

p value of Kruskal-Wallis test < 0.05

Mann-Whitney test, compared with Group 4.1

第五章、討論

第一節、五苓散對於體外草酸鈣結石模型的抑制作用

五苓散萃取液可以抑制草酸鈣結晶的形成，其機轉是透過抑制結晶的成核以及結晶的聚集這兩個步驟。成核作用是結晶形成的起始和必要的步驟，而聚集作用是巨大結晶 (macrocrystal) 形成的最主要決定步驟 [29]。換言之，五苓散萃取液抑制草酸鈣結晶核心的形成，並且抑制結晶顆粒間相互的聚集。所以，五苓散萃取液在體外實驗中是可以抑制草酸鈣結晶的發生。

傳統上，許多研究有關巨分子 (macromolecule) 或草藥抑制草酸鈣結晶形成的作用，通常只會探討結晶形成三步驟中的其中一兩個步驟。也因為探討結晶形成三步驟的研究方法沒有一致性，其結果有時會產生差異性 [57]。在本研究中，我們使用探討結晶三個步驟的實驗方式 (three-step crystallization study) 作為研究方法，如此可以獲得一致的結果。但是，最後結果發現五苓散萃取液對於結晶成長實驗步驟中 214 nm 光源的吸收會產生干擾作用。也就是說，五苓散萃取液本身所含的顏色或物質在 214 nm 光源的分析下會影響吸光值的變化 (Fig. 20)，而且濃度愈高，吸光值的變化愈大。在 25 和 50 mg/ml 濃度下，吸光值高達 3 以上，表示受測溶液幾乎完全阻擋 214 nm 光源的穿透，結果在 400 秒內吸光值的變化呈現為零 (Fig. 11, 12)。所以，本實驗結果不能反應真正的結晶成長抑制作用，因此用分光光度儀測量吸光值的變化 (spectrophotometry) 來研究中草藥對於草酸鈣結晶成長的影響是一個不理想的方法。解決之道有二：一方面，在保留有效成分的情況下，去除中草藥萃取液的顏色是一個修改的方法。另一方面，利用其他的研究方法也是一個可行的替代方案，例如：Coulter counter [58]、mixed suspension、mixed product removal MSMPR [59]、Schneider's gel slide method [60]、或是 double diffusion gel growth technique [36]。

吸光值又稱為 optical density (OD)。化學物質在波長 λ 光源下的吸光值 (A_λ , absorbance) 定義為 $A_\lambda = \log(I_0/I)$ ，其為一個無單位的數值。其中 I_0 (incident light density) 為分光光度儀所放出波長 λ 的光束強度； I (transmitted light intensity) 為 I_0 經過溶液及比色管後，所穿透出的光束強度 (Fig. 19)。吸光值亦可以 $OD = \log_{10}(1/T)$ 表示， T 為透明度 (transmittance)。所以，OD 值愈大，透明度愈低。另外，化學物質在波長 λ 光源下的吸光值與兩項因子成正比關係：(1) 化學物質在溶液中的濃度。(2) 所用比色管(cuvette)的寬度。此成正比關係稱為 Beer's law (或 Beer-Lambert law) [61, 62]。

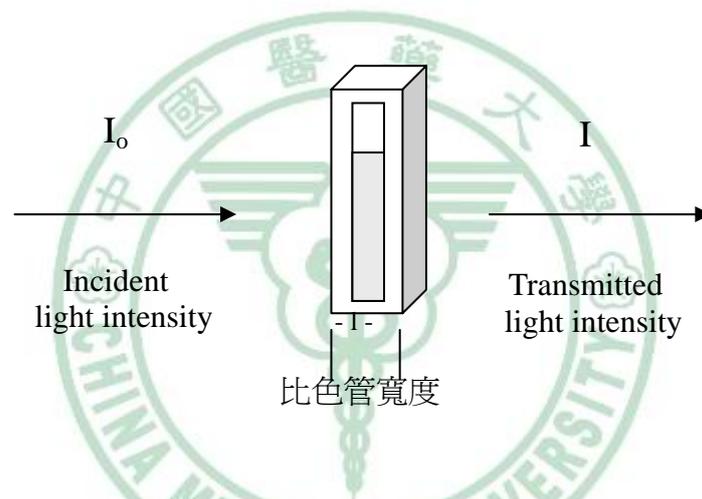


Figure 19. 吸光值 $A_\lambda = \log(I_0/I)$ ，又稱為 optical density (OD) [65]

(圖取自於 <http://brc.se.fju.edu.tw/protein/analysis/enzymeac.htm>)

在結晶成核的抑制方面，五苓散萃取液濃度必須在 6.25 mg/ml 以上，才可以明顯抑制草酸鈣晶體成核活性，而且呈現劑量依存性 (dose-dependent)。但在 3.125 mg/ml 以下並無明顯抑制作用。說明了五苓散萃取液濃度在低劑量 (<3.125 mg/ml) 無明顯抑制作用，要在濃度 6.25 mg/ml 以上才會發揮抑制作用，隨著濃度愈高抑制作用愈大。在結晶聚集的抑制方面，五苓散萃取液在 3.125 mg/ml 以上，就可以明顯抑制草酸鈣晶體聚集活性，且呈現劑量依存性 (dose-dependent)。在 3.125 和 6.25 mg/ml 這兩組抑制作用相近；在 12.5 和 25 mg/ml 這兩組抑制作用相近，呈現兩個階梯式的抑制現象。說明了五苓散萃取液濃度在低劑量 (3.125 mg/ml) 就有明顯的抑制作用，隨著濃度愈高抑

制作用愈大，在 3.125~6.25 mg/ml 和 12.5~25 mg/ml 可視為兩個階段的抑制濃度。

五苓散在中國是一個有名的方劑，它的主要功效為健脾利濕、溫陽益氣；臨床上普遍運用來治療各種症狀和疾病，例如小便困難、水腫、腹瀉、嘔吐、眩暈、短氣、咳嗽等[63]。在長期的臨床實踐中，並沒有文獻提出任何嚴重的副作用發生。除此之外，五苓散的更多新效用亦不斷的被文獻所報導。五苓散可以引誘不能分化的 PC12 突變細胞長出軸突 (neurite) [64]，此功效能夠運用在神經再生方面，治療腦損傷、中風、脊髓損傷等中樞神經傷害或周邊神經傷害之後所產生的後遺症。五苓散加山楂可以經由抑制 neutrophil NADPH oxidase 的活性來改善由 substance P 引起的膀胱過動性反應 [65]，這將可運用在臨床來解決急尿、頻尿、夜尿等膀胱過動症的惱人症狀。基於上述五苓散的許多治療效用，表明它在臨床治療上有許多方面是值得深入研究的。從本研究的結果，五苓散未來有潛力能夠成為治療以及預防尿路結石的復發。

五苓散包含五種藥物，其中含有許多複雜的成分。這五種藥物以及其中的成分對於抑制草酸鈣結晶的形成扮演著重要的角色。Suzuki 等學者研究澤瀉 (Takusha, *Alismatis Rhizoma*，五苓散中的一種藥物)，發現對於草酸鈣結晶的形成、生長、聚集皆有明顯的抑制作用 [39]。在動物實驗中，也證實澤瀉能有效抑制腎臟草酸鈣結晶的生成，並可以降低結石相關蛋白 osteopontin 的表現 [40]。如此，從本研究的結果，五苓散有抑制草酸鈣結晶形成的能力，可以間接證實 Suzuki 等學者的研究成果。然而，仍然須要更多的努力來理解五苓散中單一藥物的抑制作用和藥物間交互作用所產生的抑制作用。此外，根據中國醫學的理論基礎，治病用藥主要是以複方來使用，一方面可以加強療效，一方面可以減低只使用單方所可能產生的副作用。所以，研究複方較研究單方符合臨床的應用。因此，本研究先選用五苓散做為研究對象，而非其中的五種單一藥物，以期將來能夠切合臨床的運用。

從 Yoshimura 等學者的研究中 [43]，發現五苓散能使得健康男性的尿液對於草酸鈣結晶有明顯的抑制作用。從本研究的結果可了解到其機轉應該是五苓散可以透過抑制草酸鈣結晶的成核以及結晶的聚集這

兩個步驟來達成。

本研究的結果為中國數千年來使用五苓散治療尿路結石提供了一個良好的科學理論基礎。此外，本研究的結果說明中醫方劑有預防尿路草酸鈣結石復發的卓越能力。

本研究為一體外試驗，利用此試驗來模擬在泌尿道中草酸鈣結晶的形成。然而，尿路結石的形成是一個複雜的過程，受到許多因子的影響。更多的研究須要繼續進行以證實本研究的結果，譬如其他的研究結晶形成的方法、動物實驗和臨床實驗等。

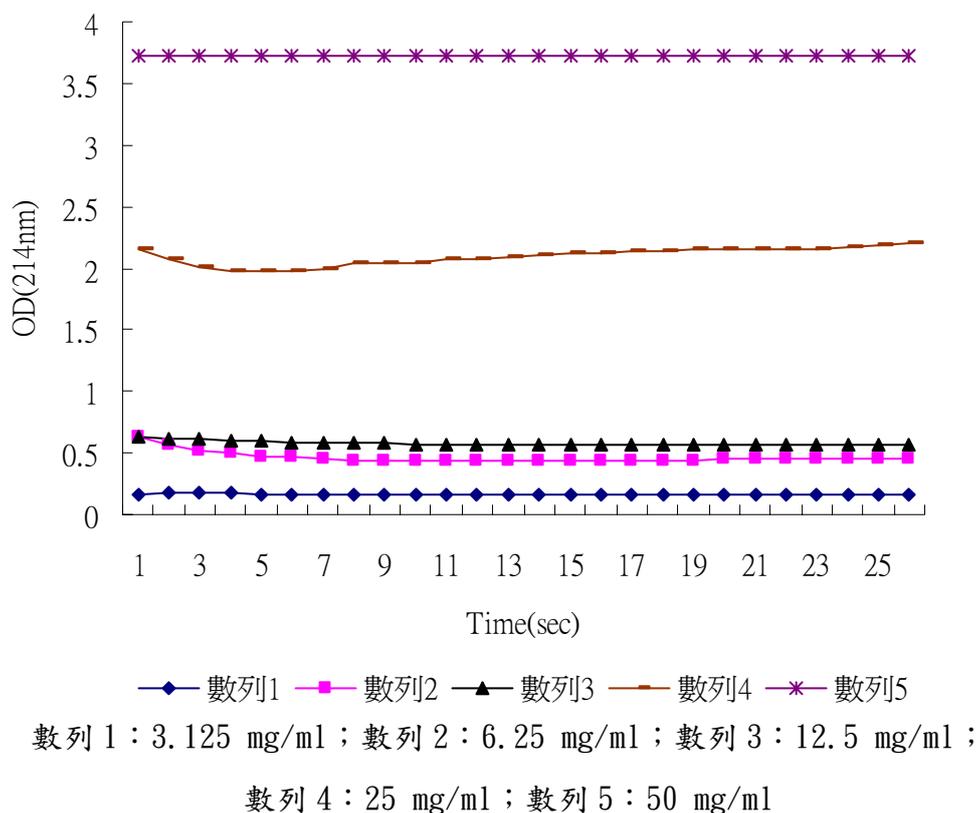


Figure 20. 將 0.1 ml 五種濃度的五苓散萃取液分別加入 2 ml 的去離子水，測量其基礎吸光值。

第二節、五苓散對於大鼠草酸鈣結石模型的抑制作用

從我們之前的體外試驗已經得知五苓散萃取液可以抑制草酸鈣結晶的形成，是經由抑制結晶的成核和聚集這兩個步驟。所以接續之前的體外試驗，本研究利用餵養乙二醇誘發鼠腎草酸鈣結晶的沉積來評估五苓散對鼠腎草酸鈣結晶形成的抑制作用。結果顯示五苓散可以明顯抑制鼠腎小管中草酸鈣結晶的沉積。因此，我們推論在動物體內五苓散亦可經由抑制草酸鈣結晶的成核和聚集，使得草酸鈣結晶在腎小管的沉積減少。本研究的結果也進一步為中國醫學使用五苓散治療尿路結石提供了一個良好的科學理論基礎。

乙二醇 (Ethylene glycol) 在體內會被分解成四種有機酸：glycoaldehyde、glycolic acid、glyoxylic acid 和 oxalic acid。其中 Glycolic acid 會引起嚴重的酸中毒；Oxalate 則以草酸鈣的型式沉積在腎臟或是其他身體組織 [66] (附錄二)。單水草酸鈣的結晶會對腎臟的近端小管細胞造成毒害作用 [67]，使得近端小管細胞壞死 [68]。所以，三週及四週對照組的鼠腎切片有許多草酸鈣結晶沉積在皮質處的腎小管，但是相對較少的草酸鈣結晶沉積在髓質處的腎小管或是收集小管。再者，隨著乙二醇的餵養時間愈久，對腎臟組織的破壞愈嚴重，像是腎小球的硬化和數量減少、腎小管的擴張和破壞、細胞的腫脹程度、組織的纖維化以及草酸鈣結晶的沉積，四週對照組均較三週對照組來的嚴重。

在第一大組中，我們可以發現五苓散可以明顯抑制鼠腎小管中草酸鈣結晶的沉積 (Kruskal-Wallis test, $p < 0.05$)，這作用在三種劑量的五苓散組別均可以觀察到 (Mann-Whitney test, $p < 0.0125$)。而且腎臟組織的破壞較為輕微，像是腎小球的硬化輕微和數量較多、腎小管的擴張和破壞幾乎沒有、細胞的腫脹程度輕微、少量的纖維化組織，這顯示五苓散亦能對腎臟組織有良好的保護作用。

在第二大組中，五苓散亦可以明顯抑制鼠腎小管中草酸鈣結晶的沉積 (Kruskal-Wallis test, $p < 0.05$)。但是在 Group 4.3 中有二隻大鼠結晶沉積指數分別為 2.8 和 3 (Mann-Whitney test, $p = 0.076$)，在

Group 4.4 中有一隻大鼠結晶沉積指數為 3 (Mann-Whitney test, $p = 0.000$)，與 Group 4.1 的結晶沉積指數相當接近。由於出現個體間的差異，推測一方面是由於大量草酸鈣持續長時間傷害腎臟組織，另一方面可能是五苓散對腎臟組織逐漸失去保護作用所引致的結果。

整體來看，Group 4.2 和 Group 4.4 的結晶沉積指數與 Group 4.1 有顯著的差異 ($p < 0.0125$)，但是 Group 4.3 和 Group 4.1 比較卻沒有顯著的差異 ($p > 0.0125$)。這說明低劑量和高劑量的五苓散可以抑制鼠腎小管中草酸鈣結晶沉積，但是中劑量的五苓散卻沒有此抑制作用，其中原因可能是因為每個組別的大鼠個數太少 ($n=3$)，造成統計上的誤差所致，這可由增加每個組別的個數來獲得進一步的解決和證實。

Liu 等學者用高磷食物 (含有 1.5 % P) 飼養大鼠，造成鼠腎 hydroxyapatite (Ca and P) 的沉積。研究五苓散及其五種單味藥對於磷酸鈣沉積的抑制作用。結果發現飼養五苓散的組別，腎臟中的鈣化沉積較對照組輕微；飼養五種單味藥的五個組別，腎臟中的鈣化沉積與對照組同樣嚴重 [44]。這說明五苓散能有效抑制磷酸鈣沉積，但是其五種單味藥並無此功效。Liu 的動物模型是利用飼養高磷食物進而誘發鼠腎磷酸鈣的沉積。然而，臨床上結石種類以草酸鈣結石最為常見，約佔 70~75 %，而磷酸鈣結石只佔一小部分，且與泌尿道感染相關 [69]。為了防治大部分的尿路結石，主要還是必須從最普遍的草酸鈣結石著手，所以，本研究利用飼養乙二醇誘發鼠腎草酸鈣的沉積來探討五苓散對於草酸鈣結石的抑制作用，可以符合臨床的運用，這也是本研究的優勢所在。

然而本研究為一動物試驗，是利用乙二醇誘發腎臟中草酸鈣結晶的形成，這跟人體內草酸鈣結石的形成原因不同，所造成的病理生化現象也不完全相同。將來仍須進一步進行短期和長期的臨床實驗，以了解五苓散在人體內預防結石的效果。另一方面，因為五苓散有長期的臨床使用經驗，並沒有嚴重的副作用被觀察到，所以利用臨床實驗來證實五苓散有抑制草酸鈣結石的效用，是立即可行的。

第三節、結論

在體外試驗中，五苓散萃取液有抑制草酸鈣結晶形成的效用，是經由抑制草酸鈣結晶核心的形成以及抑制結晶顆粒間相互的聚集。在動物試驗中，五苓散能有效抑制鼠腎小管中草酸鈣結晶的沉積。因此，五苓散有潛在的能力可以預防草酸鈣結石的發生，這結果可由進一步的臨床應用來證實。

本研究亦建立了良好的實驗平台和動物模式來篩選具抗結石功效的中草藥，期望為預防尿路結石做出重大的貢獻。



參考文獻

1. Marshall L, Damien M. Urinary stone disease. In: Smith's general urology (15/e), Eds Emil AT and Jack WM, McGraw-Hill Co., Inc., United States of America 2000; pp. 291-320.
2. Mani M, Martin IR. Urinary lithiasis: etiology, diagnosis, and medical management. In: Campbell's Urology (8/e), Eds Patrick CW, Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York 2002; pp. 3229-305.
3. 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 Int.* 2003;63:1817-23.
4. Barbasa C, Garc'iaa A, Saavedraa L, Murosb M. Urinary analysis of nephrolithiasis markers. *J Chromatogr B.* 2002;781:433-55.
5. Lee YH, Huang WC, Tsai JY, Lu CM, Chen WC, Lee MH, Hsu HS, Huang JK, Chang LS. Epidemiological studies on the prevalence of upper urinary calculi in Taiwan. *Urol Int.* 2002;68:172-7.
6. Uribarri J, Man S, Carroll JH. The first kidney stone. *Ann Int Med.* 1989;111:1006-9.
7. Ljungghall S, Danielson BG. A prospective study of renal stone recurrences. *Br J Urol.* 1984;56:122 - 4.
8. 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： 824-30.
9. 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.
10. Chandhoke PS. When is medical prophylaxis cost-effective for recurrent calcium stones? *J Urol.* 2002;168:937-40.
11. Robertson WR. The economics of urinary stone management. In: *Kidney Stones, 8th European Symposium on Urolithiasis*, Eds Borghi L, Meschi T, Briganti A, Schianchi T and Novarini A,

- Editoriale Bios, Parma, Italy 1999; pp. 169-72.
12. Strohmaier WL, Hormann M. Economic aspect of urolithiasis and metaphylaxis in Germany. In: Urolithiasis, Eds Rodgers AL, Hibbert BE, Hess B, Khan SR and Preminger GM, University of Cape Town, Cape Town 2000; pp. 406-9.
 13. 單書健、陳子華：古今名醫臨証金鑒·淋証癰閉卷，中國中醫藥出版社，北京 1999
 14. <http://www.zgxl.net/SLJK/ybjb/miniao/linzheng.htm>
 15. Sonja L, Allen LR. Idiopathic calcium oxalate urolithiasis: risk factors and conservative treatment. Clin Chim Acta. 2004;345:17 - 34.
 16. Robertson WG, Peacock M. The cause of idiopathic calcium stone disease: hypercalciuria or hyperoxaluria? Nephron 1980;26:105-10.
 17. Robertson WG. Mild hyperoxaluria: a critical review and future outlook. In: Kidney Stones, 8th European Symposium on Urolithiasis, Eds Borghi L, Meschi T, Briganti A, Schianchi T and Novarini A, Editoriale Bios, Parma, Italy 1999; pp. 33-42.
 18. Coe FL. Hyperuricosuric calcium oxalate nephrolithiasis. Kidney Int. 1978;13:418-26.
 19. Ettinger B. Allopurinol for treatment of uric acid and calcium calculi. In: Pharmacological Treatment of Endocrinopathies, Eds Pak CYC, Karger, Basel 1991; pp. 16-36.
 20. Curhan GC. A prospective study of dietary calcium and other nutrients and the risk of symptomatic kidney stones. N Engl J Med. 1993;328:833-8.
 21. Wahl C, Hess B. Kidney calculi-is nutrition a trigger or treatment. Rev Ther. 2000;57:138-45.
 22. 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:S51-60.
23. Bihl G, Meyers A. Recurrent renal stone disease—advances in pathogenesis and clinical management. *Lancet.* 2001; 358:651-6.
24. Wilson DM. Clinical and laboratory approaches for evaluation of nephrolithiasis. *J Urol.* 1989;141:770-4.
25. 李瀛輝、陳明村、張心湜：尿路結石，九州圖書文物有限公司，台北 1980。
26. Chaussy C, Schüller J, Schmiedt E, Brandl H, Jocham D, Liedl B. Extracorporeal shock wave lithotripsy for treatment of urolithiasis. *Urol.* 1984;23:59-66.
27. 孫光煥、于大雄：尿路結石之治療最新發展，九州圖書文物有限公司，台北 1996;pp.13-67.
28. Khan SR. Interactions between stone-forming calcific crystals and macromolecules. *Urol Int.* 1997;59:59-71.
29. Bernhard H, Dirk JK. Nucleation, growth, and aggregation of stone-forming crystals. In: *Kidney stone: medical and surgical management*, Eds Coe FL, Favus MJ, Pak CYC, Parks JH and Preminger GM, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1996; pp. 3-32.
30. Begun FP, Knoll CE, Gottlieb M, Lawson RK. Chronic effects of focused electrohydraulic shock waves on renal function and hypertension. *J Urol.* 1991;145:635-9.
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. *Eur Urol.* 1986;12:308-13.
32. Ruml LA, Pearle MS, Pak CYC. Medical therapy, calcium oxalate

- urolithiasis. *Urol Clin North Am.* 1997;24:117-33.
33. Mani M, Martin IR. Urinary lithiasis: etiology, diagnosis, and medical management. In: *Campbell's Urology (8/e)*, Eds Patrick CW, Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York 2002; pp. 3280-5.
34. Atmani F, Khan SR. Effect of an extract from *Herniaria hirsute* on calcium oxalate crystallisation in vitro. *BJU Int.* 2000;85:621-5.
35. Atmania F, Slimania Y, Mimounib M, Aziza M, Hachtb B, Ziyayata A. Effect of aqueous extract from *Herniaria hirsute* L. on experimentally nephrolithiasic rats. *J Ethnopharmacol.* 2004;95:87-93.
36. 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. *J Cryst Growth.* 2005;275:1403-08.
37. Dasa I, Gupta SK, Ansaria SA, Pandey VN, Rastogi RP. In vitro inhibition and dissolution of calcium oxalate by edible plant *Trianthema monogyna* and pulse *Macrotyloma uniflorum* extracts. *J Cryst Growth.* 2005;273:546-54.
38. 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。 *J Chin Med.* 2004;15:17-29.
39. Suzuki K, Kawamura K, Tsugawa R. Formation and growth inhibition of calcium oxalate crystals by Takusha (*Alismatis Rhizoma*). *Scanning Microsc.* 1999;13:183-9.
40. 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. *Urol Res.* 1999;27:194-9.

41. 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;37:1097-101.
42. 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;2:81-6.
43. 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*. 1998;44:13-6.
44. 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. *Med Electron Microsc*. 2001;34:103-14.
45. Barros ME, Schor N, Boim MA. Effects of an aqueous extract from *Phyllanthus niruri* on calcium oxalate crystallization in vitro. *Urol Res*. 2003;30:374-9.
46. 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;32:362-6.
47. 馮勇：中醫十大名方-五苓散，中國中醫藥出版社，北京 1998
48. 陳汶吉：尿路結石的生物礦化機制探索 博士論文，國立清華大學生命科學系，新竹 2001； pp. 27-9.
49. Harris SS, Eccleshall R, Gross C, Dawson-Hughes B, Feldman D. The vitamin D receptor start codon polymorphism (Fok I) and bone mineral density in premenopausal American black and white

- women. *J Bone Miner Res.* 1997;12:1043-8.
50. Nakagawa Y, Abram V, Kezdy FJ, Kaiser ET, Coe FL. Purification and characterization of the principal inhibitor of calcium oxalate monohydrate crystal growth in human urine. *J Biol Chem.* 1983;258:12594-600.
51. Meyer JL, Thomas Jr. WC. Trace metal-citric acid complexes as inhibitors of calcification and crystal growth. II. Effects of Fe(III), Cr(III) and Al(III) complexes on calcium oxalate crystal growth. *J Urol.* 1982;128:1376-8.
52. Hess B, Meinhardt U, Zipperle L, Giovanoli R, Jaeger P. Simultaneous measurements of calcium oxalate crystal nucleation and aggregation: impact of various modifiers. *Urol Res.* 1995;21:231-8.
53. Lee YH, Chang LS, Chen MT, Chiang H, Huang JK, Huang WC. Characterization of ethylene glycol : Induced urolithiasis model in rats. *J Urol ROC.* 1991;2:518-24.
54. 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*, Eds Bichler KH and Strohmaier WL, Springer-Verlag, Berlin 1988; pp. 113-25.
55. 沈明來：試驗設計學 第二版，九州圖書文物有限公司，台北 1999; pp. 27-62.
56. 沈明來：實用無母數統計學與計數資料分析，九州圖書文物有限公司，台北 1997; pp. 1-214.
57. Grover PK, Ryall RL, Marshall VR. Does Tamm-Horsfall mucoprotein inhibit or promote calcium oxalate crystallization in human urine? *Clin Chim Acta.* 1990;190:223-34.
58. Grover PK, Moritz RL, 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 : 637-44.
59. Bretherton T, Rodgers A. Crystallization of calcium oxalate in minimally diluted urine. J Cryst Growth. 1998;192:448-55.
60. Schneider HJ, Bothor W, Berg W, Borner RH, Jakob M. A gel model for measuring crystallization inhibitor activities. Urol Int. 1983;38:33-8.
61. <http://brc.se.fju.edu.tw/protein/analysis/enzymeac.htm>
62. http://www.its.bldrdoc.gov/projects/devglossary/_optical_density.html
63. Institute of Clinical Acupuncture and Oriental Medicine. Chinese herbal medicine formulas. Citation from: <http://www.orientalmedicine.edu/Formulas%20that%20Expel%20Dampness.pdf>
64. Kano Y, Takaguchi S, Nohno T, Hiragami F, Kawamura K, Iwama MK, Miyamoto K, Takehara M. Chinese medicine induces neurite outgrowth in PC12 mutant cells incapable of differentiation. Am J Chin Med. 2002;30:287-95.
65. Chen WC, Shih CC, Lu WA, Li PC, Chen CJ, Hayakawa S, Shimizu K, Chien CT. Combination of Wu Lin San and Shan Zha ameliorates substance P-induced hyperactive bladder via the inhibition of neutrophil NADPH oxidase activity. Neurosci Lett. 2006;402:7-11.
66. Leth PM, Gregersen M. Ethylene glycol poisoning. Forensic Sci Int. 2005;155:179-184.
67. Guo C, McMartin KE. The cytotoxicity of oxalate, metabolite of ethylene glycol, is due to calcium oxalate monohydrate formation. Toxicology. 2005;208:347-55.
68. Khan SR, Byer KJ, Thamilvan S, Hackett RL, McCormack WT, Benson

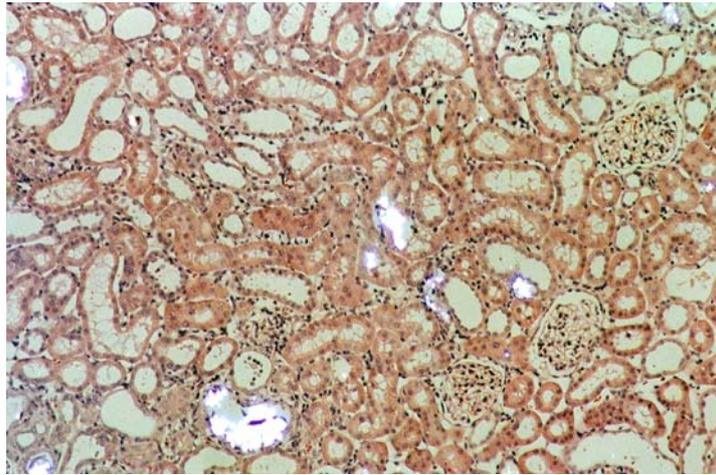
NA, Vaughn KL, Erdos GW. Crystal-cell interaction and apoptosis in oxalate-associated injury of renal epithelial cells. *J Am Soc Nephrol.* 1999;10:S457-63.

69. 李士瑋：生命中無法承受的痛－尿路結石，和記圖書出版社，台北 2003； pp. 45-114.

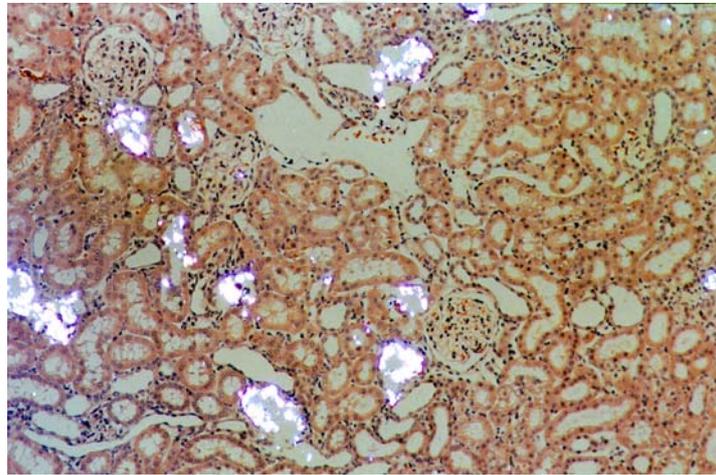
70. Halabe A, Shor R, Wong NLM, Sutton RAL. Effect of vitamin D3 on the conversion of ethylene glycol to glycolate and oxalate in ethylene glycol-fed rats. *Clin Chim Acta.* 2003;330:135-9.



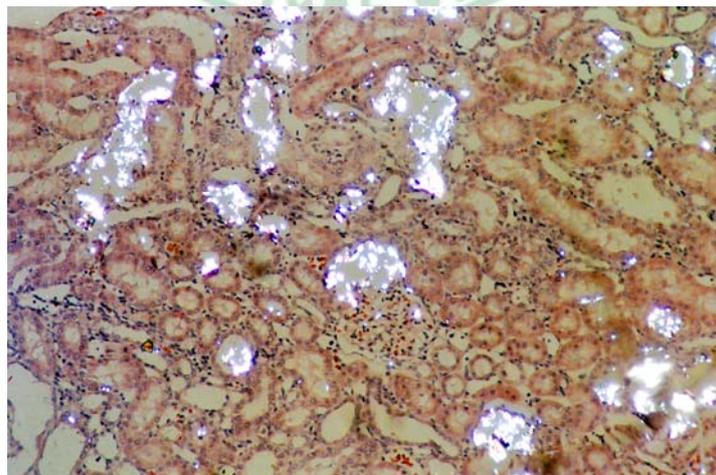
附 錄



A.

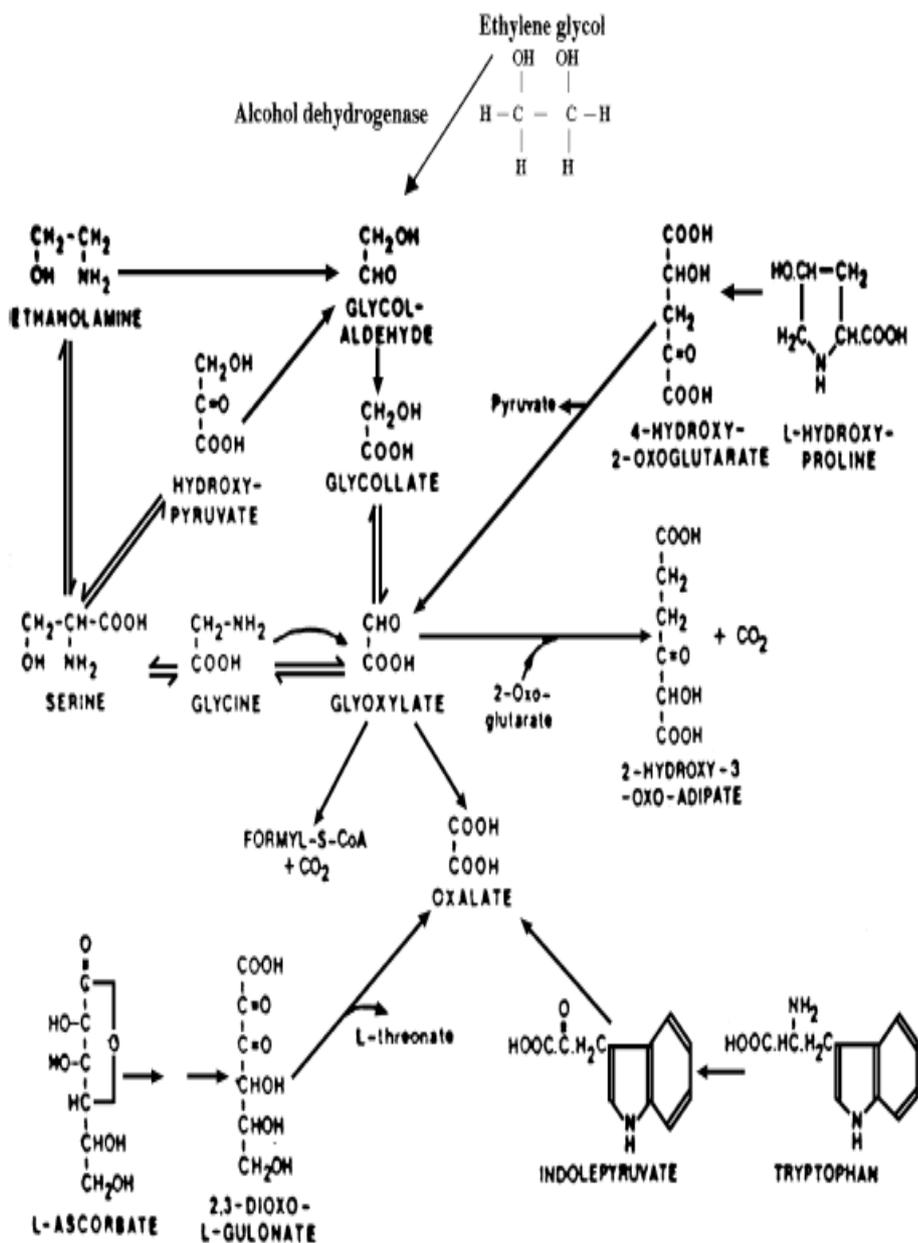


B.



C.

附錄一 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 mm



附錄二 乙二醇 (Ethylene glycol) 在人體和動物體中代謝合成草酸的途徑 [70]

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

Wu-Ling-San Formula Inhibits the Crystallization of Calcium
Oxalate in vitro and in rats
Graduate student : Yu-Cheng Chen
Major professor : Sheng-Feng Hsu
Graduate institute of Chinese Medical Science, China Medical
University

Urinary stone disease is a common and high-recurrent disease. There is no ideal medical drug to prevent the recurrence of urinary stone. Therefore, to develop effective medical drugs is a worthwhile issue. The purpose of this study was to investigate the effect of Wu-Ling-San (WLS) on calcium oxalate formation by using crystallization experiments of crystal nucleation, growth, and aggregation in vitro. Then the animal study was followed to investigate the effect of WLS on EG (ethylene glycol) -induced nephrolithiasic rats. The results of crystallization experiments indicated that WLS extract exerted an effect in the inhibition of calcium oxalate crystallization by inhibiting the nucleation and aggregation. The results of animal study revealed WLS could inhibit calcium oxalate crystal deposition effectively in renal tubules of rats fed by EG. Therefore, it may have potential for preventing stone recurrence if further clinical study can be confirmed.

Key word : Urinary stone, Wu-Ling-San formula, Calcium oxalate

謝 辭

當初秉持著要以科學化的方法來證實中醫效用的信念，進而來到中國醫學研究所學習，想要努力證明中醫並不是怪力亂神或是不科學，而是數千年來老祖宗寶貴的智慧結晶。現今中國醫學慢慢已經在國外有發揚光大的趨勢，但在國內仍被少數人視如敝屣，實為痛心，在此希望盡自己一份棉薄心力來延續和發展中國醫學，期望付予嶄新的面貌。

兩年時間匆匆過去，在研究所的老師和前輩的教導下，獲得了許多有用的知識和觀念，也對於中醫科學研究開始跨出了第一步，這一步雖然很辛苦，但是回首起來真的很充實，收穫真的很多。然而兩年所能達到的成果不多，而今後要走的路還很長遠，仍然希望往後有機會和前輩及有志者一同努力。

父親十餘年來身體一直不是很好，在今年一月間辭世。自己未能把此成果親自呈獻給他，心中不免有些遺憾。非常感謝父親二十幾年來辛苦培育之恩，讓我衣食無虞能夠好好的學習醫學，才能夠達到目前的成就，您的恩情浩瀚，實是無以回報。也感謝母親辛勞的撫養之恩，誠心希望您未來的日子能夠健康快樂。也非常謝謝關心我、幫助我的伯伯、叔叔、姑姑等長輩們。

兩年來，經由許多人的幫助，我才能順利的完成學業，在此由衷感激你們：感謝陳汶吉教授的用心指導實驗進行和論文寫作，讓我獲益匪淺；感謝陳悅生教授在論文寫作上的指導；感謝許昇峰教授指導論文寫作以及在澄清中醫科工作上的協助；感謝賴銘淙老師在病理切片上的詳細教導；感謝澄清中醫科的所有同仁在這兩年來愉快的相處和協助，讓我獲得非常寶貴的臨床經驗；感謝秀雯給予多方面的支持與幫助；感謝寧漪姊的大力幫忙；感謝凱揚、承志兩位學弟實驗上的協助；感謝李佳霖同學在統計方面的友情指導；感謝蔡輔仁院長實驗室的同仁們在各方面的協助；感謝所有研究所的老師和同學，讓我擁有美好、充實的兩年碩士研究生涯。