

察[J]. 中国中医急症, 2018, 27(12): 2217-2219.

[15] 尹燕耀. 从疏通大肠论治 HBV 相关慢加急性肝功能衰竭前期 [C] //全国第 6 届中西医结合传染病学术会议论文汇编. 深圳: 全国中西医结合传染病学术会议, 2015: 121-122.

[16] 刘玉萍, 邱小玉, 刘 烨, 等. 茵陈的药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50(9): 2235-2241.

[17] 陶玉杰. 绵茵陈与花茵陈的现代药理对比及临床应用 [J]. 中国现代药物应用, 2017, 11(19): 193-194.

[18] 何立春, 席多宏, 李兴禹, 等. 茵陈五苓散治疗梗阻性黄疸术后 30 例 [J]. 现代中医药, 2018, 38(2): 43-44.

[19] 金丽霞, 金丽军, 栾仲秋, 等. 大黄的化学成分和药理研究进展 [J]. 中医药信息, 2020, 37(1): 121-126.

[20] 仁增加, 切羊让忠, 华吉卓玛, 等. 基于网络药理学的大黄抗炎作用机制分析 [J]. 中国高原医学与生物学杂志, 2020, 41(1): 60-66.

[21] 苗培福. 大黄的药理作用及临床应用分析 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2019, 17(20): 61-62.

[22] 郝鹏飞, 钟书婷, 等. 大黄附子汤治疗慢性肾衰竭的网络药理学研究及初证 [J]. 中国医院药学杂志, 2020, 40(5): 515-521.

[23] 王雅莉, 胡 光, 张 倩, 等. 活血化瘀中药丹参药对的研究进展 [J]. 重庆理工大学学报 (自然科学版), 2020, 34(3): 197-204.

[24] 万新焕, 王瑜亮, 周长征, 等. 丹参化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2020, 51(3): 788-798.

鬼针草水提物对大鼠肾结石改善作用

何 靖¹, 任群利², 林 冰^{3,4*}, 杨 薇¹, 陆倩倩¹

(1. 贵州大学酿酒与食品工程学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州中医药大学, 贵州 贵阳 550025; 3. 遵义医科大学, 贵州 遵义 563000; 4. 贵州中医药大学中药材开发技术研究中心, 贵州 贵阳 550025)

摘要: **目的** 探讨鬼针草水提物对乙二醇和氯化铵诱导的大鼠草酸钙肾结石模型的作用。**方法** 采用 1% 乙二醇和 2% 氯化铵诱导的草酸钙大鼠肾结石模型, 用鬼针草高、中、低剂量和排石颗粒连续灌胃后, 取大鼠肾脏称定质量, 并计算肾脏系数, 检测尿 Ca^{2+} 、血清 Ca^{2+} 、肾组织 Ca^{2+} 、血清肌酐 (serum creatinine, SCR)、血清尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN)、尿酸 (uric acid, UA); 做矿化结节染色 (von kossa, VK) 切片, 观察肾组织病理变化, 计算矿化结节表达面积百分比。**结果** 与模型组比较, 其他各组指标均降低 ($P<0.05$); 各组大鼠间空腹 24 h 的排尿量无统计学差异 ($P>0.05$)。另外, 排石颗粒组与鬼针草提取物高剂量组比较无统计学差异 ($P>0.05$)。**结论** 鬼针草水提物对乙二醇和氯化铵诱导的草酸钙结石具有改善作用, 且高剂量抗结石活性与排石颗粒活性相近, 可为鬼针草的研究与开发提供理论依据。

关键词: 鬼针草; 乙二醇; 氯化铵; 肾结石模型; 抗结石

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2021)05-1332-04

doi: 10. 3969/j. issn. 1001-1528. 2021. 05. 044

肾结石在我国是常见的疾病之一, 男性患病率为 6.5%, 女性患病率为 5.1%^[1]。尤其在西南地区较为普遍。肾结石按化学成分分为草酸钙、磷酸钙、尿酸盐、磷酸铵镁、胱氨酸结石等, 其中草酸钙结石最为常见^[2]。有研究表明用药不当也会引发肾结石^[3], 肾结石西医治疗方法多为手术, 会不同程度的对肾组织造成损伤。中医药疗法通过对因疗法和对症疗法相结合, 通过改善机体体质的同时促进结石排出体外, 不会对肾组织造成不良反应, 与西医治疗相比具有一定优势和开发潜力^[4]。

鬼针草为菊科鬼针草属植物, 别名一把针、刺针草等, 广泛分布于云南、四川、广西、贵州等地。性平, 味微苦,

归大肠、肝、肺经, 其普遍为野生, 山坡、田间较为常见, 可全草入药。有研究表明鬼针草富含黄酮类、苯丙素、酚类、萜类等成分^[5], 具有抗肿瘤、抗炎、利尿、清热解毒等功效^[6], 鬼针草被发现具有多种功效, 但目前其抗结石作用课题组尚未见相关报道。本研究采用乙二醇和氯化铵法^[7-8]诱导大鼠肾结石模型, 建模成功后用鬼针草水提物和排石颗粒对大鼠进行灌胃, 实验数据显示, 鬼针草具有一定的抗结石活性, 为鬼针草的研究与开发奠定基础。

1 材料

1.1 药材 鬼针草, 购买于安徽亳州中药城。经贵州中医药大学魏升华教授鉴定为菊科鬼针草属植物鬼针草 *Bidens*

收稿日期: 2020-07-20
基金项目: 国家重点研发计划项目 (2019YFC1712503); 贵州中医药大学博士启动基金 (贵中医博士启动 [2019] 09)
作者简介: 何 靖 (1996—), 男, 硕士生, 从事中药材物质基础研究。E-mail: 2938846764@qq.com
* 通信作者: 林 冰 (1974—), 男, 回族, 博士, 教授, 从事中药材物质基础研究。Tel: 15185034288, E-mail: 362570847@qq.com

bipinnata Linn 干燥全草。

1.2 动物 SPF 级雄性大鼠 60 只，体质量（200±20）g，饲料、垫料均购买于重庆腾鑫生物科技有限公司，许可证号 SCXK（辽）2015-0001。

1.3 试剂 乙二醇（天津市大茂化学试剂厂，批号 20171209）；氯化铵（天津市永大化学试剂有限公司，批号 20170811）；甲醛溶液（西陇科学股份有限公司，批号 20180502）；排石颗粒（江西南昌济生制药有限公司，国药准字 Z36020373）；钙（Ca²⁺）试剂盒、总蛋白（TP）试剂盒（南京建成生物工程研究所，批号分别为 C004-2-1、A045-2-1）；Rat BUN ELISA KIT 试剂盒、Rat SCR ELISA KIT 试剂盒、Rat UA ELISA KIT 试剂盒（上海茁彩生物科技有限公司，批号分别为 ZC-37052、ZC-36732、ZC-54381）。

1.4 仪器 SpectraMAX Plus384 型酶标仪（美谷分子仪器有限公司）；转轮式切片机（德国徕卡仪器有限公司）；TSJ-II 型全自动封闭式组织脱水机、BMJ-III 型包埋机、PHY-III 型病理组织漂烘仪（常州市中威电子仪器有限公司）；BA400Digital 型数码三目摄像显微镜（麦克奥迪实业集团有限公司）；图像分析软件 Image-Pro Plus 6.0（美国 Media Cybernetics 公司）。

2 方法

2.1 鬼针草水提物制备 精密称取 900 g 鬼针草，用纯水按料液比 1：10 的比例回流提取 2 次；2 h/次，抽滤，合并滤液，减压旋蒸浓缩成浸膏，冷冻干燥后研磨成粉末，备用^[9]。

2.2 分组 根据实验设计需要将 60 只雄性大鼠随机分为 6 组，每组 10 只。分别为空白组、模型组、排石颗粒组及鬼针草高、中、低剂量组^[10]。新环境适应 1 周后进行实验。

2.3 大鼠肾结石模型的建立 用纯水分别配制 1% 乙二醇和 2% 氯化铵溶液，最后将配制完成的溶液混合，分别给模型组、排石颗粒组、鬼针草高、中、低剂量组的大鼠自由饮用建模 2 周；空白组给予纯水自由饮用 2 周。建模 2 周后随机取 3 只大鼠麻醉后处死解剖，取双肾浸泡于 10% 的甲醛溶液，肾组织切片，观察^[11]。

2.4 给药 给药前，将鬼草干燥粉末配制成 0.25 g/mL，排石颗粒配制成 0.25 g/mL。其中鬼针草高剂量组为 1.5 g/kg、中剂量组为 1 g/kg、低剂量组为 0.5 g/kg 及排石颗粒组为 1.5 g/kg，每天 1 次连续给大鼠灌胃给药 2 周。

2.5 检测指标样本采集 处理动物前收集大鼠空腹 24 h

尿液，作为尿钙检测标本。收集完尿液后，将大鼠麻醉解剖，心脏取血后离心收集血清，作为血清钙、血清肌酐、血清尿素氮等指标检测的标本^[12]。取其双肾，用生理盐水洗掉多余血渍，用滤纸擦干后称重，计算其肾脏系数。左肾-80℃条件保存，作为肾组织钙检测标本。取其右肾于 4% 甲醛溶液中保存，作为肾结石切片检测样本。

2.6 指标检测 检测血清肌酐（SCR）、尿酸（UA）、血清尿素氮（BUN）、尿 Ca²⁺、肾组织 Ca²⁺、血清 Ca²⁺，并做大鼠肾组织切片，观察大鼠肾组织损伤程度以及各组实验大鼠肾组织结石结晶分布情况，并计算各组切片矿化结节表达面积百分比^[13]（以上指标检测均由成都里来生物科技有限公司完成）。

2.7 肾脏系数 计算肾脏系数=肾质量（g）/体质量（g）×100%，肾质量为大鼠肾脏的质量；体质量为大鼠的质量。

2.8 肾脏组织 VK 表达面积检测 采用 BA210Digital 数码三目摄像显微摄像系统对切片进行图像采集，每张切片先于 40 倍下观察全部组织的大体病变，选择要观察的区域采集 400 倍图片观察具体病变。采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统测定所采集全部图像的光密度（IOD）和矿化结节表达面积（Area），计算矿化结节表达面积百分比。

2.9 统计学分析 应用 SPSS 20.0 统计分析软件对数据进行单因素方差分析（one-way ANOVA），数据以（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 乙二醇和氯化铵对大鼠影响 实验组大鼠建模 3 d 后，大鼠逐渐出现食欲减退，建模 5 d 后体质量减轻，与空白对照组比较活动减少，同时毛色发黄且变得粗糙，建模 2 周后随机取 3 只大鼠处死解剖做肾组织切片，切片结果显示大鼠肾脏有明显结石结晶或钙盐沉淀，表明肾结石模型建立成功。

3.2 鬼针草水提物对建模大鼠影响 与空白组比较，模型组大鼠体质量减轻，肾质量、肾脏系数均增加（ $P < 0.01$ ），其余各组大鼠间体质量、肾质量、肾脏系数无变化（ $P > 0.05$ ）；与模型组比较，排石颗粒组、高剂量组大鼠体质量增加（ $P < 0.01$ ），肾质量、肾脏系数降低（ $P < 0.05$ ），其余各组大鼠间体质量、肾质量、肾脏系数无变化（ $P > 0.05$ ）。与模型组比较，其余各组大鼠空腹 24 h 排尿量无变化（ $P > 0.05$ ）。表明鬼针草水提物对大鼠的体质量、肾质量、肾脏系数具有一定改善作用，在实验剂量范围内鬼针草水提物对大鼠空腹 24 h 排尿量没有影响，见表 1。

表 1 各组大鼠体质量、肾质量、肾脏系数、尿量变化（ $\bar{x} \pm s$ ， $n = 8$ ）

组别	体质量/g	肾质量/g	肾脏系数/%	尿量/(mL·24 h ⁻¹)
空白组	251.80±16.59	0.87±0.13	0.003±0.007	4.69±1.25
模型组	192.59±14.61**	1.05±0.14**	0.005±0.009**	4.83±1.70
排石颗粒组	250.80±21.71##	0.91±0.10#	0.004±0.005#	4.38±1.76
鬼针草高剂量组	256.05±10.15##	0.87±0.09#	0.003±0.009#	4.69±1.09
鬼针草中剂量组	230.94±19.73	0.90±0.08	0.004±0.004	5.75±1.25
鬼针草低剂量组	222.58±11.61	0.84±0.09	0.004±0.008	4.16±4.16

注：与空白组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ 。

3.3 鬼针草水提物对尿 Ca²⁺、肾组织 Ca²⁺、血清 Ca²⁺的影响 与空白组比较,模型组大鼠尿液中 Ca²⁺、肾组织匀浆中 Ca²⁺、血清中 Ca²⁺升高 ($P<0.01$),其余各组大鼠间尿液中 Ca²⁺、肾组织匀浆中 Ca²⁺、血清中 Ca²⁺无差异 ($P>0.05$);与模型组比较,排石颗粒组、鬼针草高剂量组大鼠

尿液中 Ca²⁺、肾组织匀浆中 Ca²⁺、血清中 Ca²⁺降低 ($P<0.05$);其余各组大鼠间尿液中 Ca²⁺、肾组织匀浆中 Ca²⁺、血清中 Ca²⁺无差异 ($P>0.05$),表明鬼针草水提物对患结石大鼠尿液中 Ca²⁺、肾组织匀浆中 Ca²⁺、血清中 Ca²⁺具有一定改善作用,且高剂量组改善作用较明显,见表 2。

表 2 各组大鼠尿 Ca²⁺、肾组织 Ca²⁺、血清 Ca²⁺水平变化 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	尿 Ca ²⁺ /(mmol·L ⁻¹)	肾组织 Ca ²⁺ /(mmol·g prot ⁻¹)	血清 Ca ²⁺ /(mmol·L ⁻¹)
空白组	0.568±0.114	0.054±0.012	0.568±0.114
模型组	0.814±0.097 ^{**}	0.085±0.015 ^{**}	1.484±0.055 ^{**}
排石颗粒组	0.616±0.094 [#]	0.061±0.012 [#]	1.337±0.122 [#]
鬼针草高剂量组	0.636±0.110 [#]	0.065±0.025 [#]	1.347±0.125 [#]
鬼针草中剂量组	0.667±0.176	0.067±0.015	1.357±0.130
鬼针草低剂量组	0.696±0.154	0.069±0.010	1.418±0.089

注:与空白组比较,^{**} $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$ 。

3.4 鬼针草水提物对血清中 SCR、BUN、UA 和 VK 切片表达面积百分比的影响 与空白组比较,模型组大鼠血清中 SCR、BUN、UA 升高 ($P<0.01$)。与模型组比较,排石颗粒组、鬼针草高剂量组大鼠血清中 SCR、BUN、UA 降低 ($P<0.05$),其余各组大鼠间 SCR、BUN、UA 无统计学差异 ($P>0.05$)。与空白组比较,模型组肾脏组织内矿化结节表达面积百分比升高 ($P<0.05$);与模型组比较,排石

颗粒组、鬼针草高剂量组肾脏组织矿化结节表达面积百分比均降低 ($P<0.05$);排石颗粒组与鬼针草高剂量组比较,肾脏组织内矿化结节表达面积百分比无统计学差异 ($P>0.05$)。这表明鬼针草提取物对大鼠的对血清中 SCR、BUN、UA 及肾脏组织内结晶或钙盐水平具有一定改善作用,且高剂量组改善作用较明显,见表 3。

表 3 各组大鼠血清中 SCR、BUN、UA 及 VK 切片表达面积百分比变化 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	SCR /(μmol·L ⁻¹)	BUN/(mmol·L ⁻¹)	UA/(μmol·L ⁻¹)	VK 表达面积/%
空白组	1.480±0.145	1.233±0.117	33.670±2.260	0
模型组	1.743±0.100 ^{**}	1.727±0.230 ^{**}	41.025±2.339 ^{**}	0.30±0.13 [*]
排石颗粒组	1.547±0.133 [#]	1.483±0.129 [#]	36.977±6.403 [#]	0.00±0.00 [#]
鬼针草高剂量组	1.527±0.175 [#]	1.495±0.128 [#]	34.592±2.815 [#]	0.00±0.01 [#]
鬼针草中剂量组	1.593±0.169	1.567±0.174	37.012±2.075	0.01±0.01 [#]
鬼针草低剂量组	1.627±0.110	1.637±0.285	37.687±3.954	0.01±0.01 [#]

注:与空白组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$ 。

3.5 鬼针草水提物对大鼠肾组织病理切片的影响 由图 1 各组大鼠肾组织病理切片及表 3 矿化结节表达面积百分比结果显示,空白对照组切片未见结晶或钙盐表达;模型组

切片中有明显结晶或钙盐沉淀,矿化结节表达面积百分比与各组相比升高;排石颗粒组切片显示未见结晶或钙盐表达;鬼针草高剂量组切片显示未见结晶或钙盐表达;鬼针

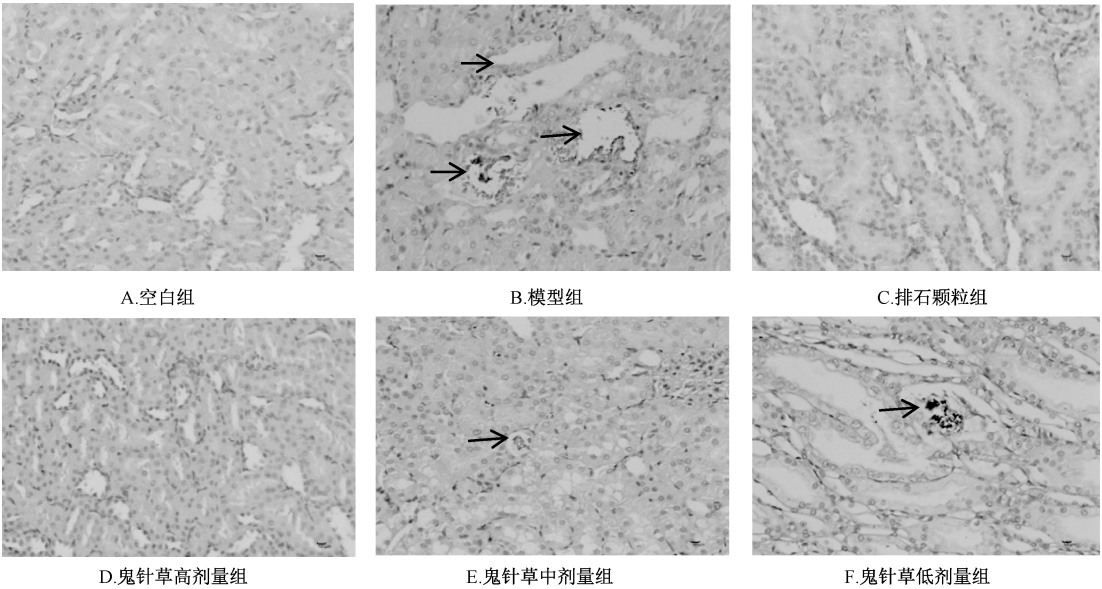


图 1 各组大鼠肾组织病理切片图 (VK, ×400)

草中剂量组切片与空白对照组比较显示有细小结晶，矿化结节表达面积百分比与空白对照组比较有略微升高；鬼针草低剂量组切片与空白对照组比较显示有明显结晶，与模型组比较结晶相对偏少，矿化结节表达面积百分比与空白对照组比较有略微升高，与鬼针草中剂量组相当。

4 讨论

肾脏是机体代谢重要器官之一，时刻都在监测着机体内代谢的动态平衡；当机体摄入食物后，除有机体所需营养物质之外，同时还会产生草酸盐和尿酸盐等，当盐浓度过高时，会使离子间相互吸附成核逐渐长大形成结石。陈玲等^[14]研究发现鬼针草在实验剂量范围内对豚鼠胆囊结石具有一定疗效；同时方媛等^[15]研究表明鬼针草通过缓解肾小管纤维化从而对高血压引起的肾损害有良好的改善作用。目前研究发现鬼针草具有良好降血压、抗炎、清热解毒等多种功效，提示其可能具有治疗肾结石的作用，但文献调研表明未见鬼针草治疗肾结石的相关报道，因此本实验基于鬼针草前期已有的研究，建立了大鼠肾结石模型，用鬼针草水提物灌胃给药后检测衡量的肾功能相关指标。实验数据结果显示，与模型组比较，各实验组指标均有向空白对照组指标靠近的趋势，同时 VK 病理切片结果显示，与模型组比较，鬼针草水提物低剂量组切片中的结晶或钙盐沉淀也有明显减少，其中鬼针草高剂量活性较好，其作用与排石颗粒接近；且在 SCR 和 UA 2 个指标中，鬼针草高剂量组抗结石活性稍优于排石颗粒组；通过初步研究结果显示，鬼针草水提物具有一定的抗结石活性，以期为后期鬼针草在研究与开发为肾结石或相关尿路结石用药提供理论科学依据，但其抗结石机制有待进一步研究。

参考文献：

[1] Guo H Z, Zan L M, Shu J X, *et al.* Prevalence of kidney stones in China: an ultrasonography based cross-sectional study[J]. *BJU International*, 2017, 120(1): 109-116.

[2] Daudon M, Dessombz A, Frochot V, *et al.* Comprehensive morpho-constitutional analysis of urinary stones improves etiological

diagnosis and therapeutic strategy of nephrolithiasis[J]. *Comptes rendus Chimie*, 2016, 19(11): 1470-1491.

[3] 崔向丽, 高颖昌, 徐春敏, 等. 常见可致药源性尿路结石的药物[J]. 药品评价, 2012, 9(23): 38-44.

[4] 韦重道. 中西医结合治疗肾结石的临床疗效观察[J]. 北方药学, 2019, 16(6): 91-92.

[5] 曾晓燕, 张 婷, 潘卫松, 等. 鬼针草属药用植物化学成分研究进展[J]. 中药材, 2017, 40(3): 748-753.

[6] 王碧晴, 赵俊男, 张 颖, 等. 鬼针草的药理作用研究进展[J]. 中医药导报, 2019, 25(18): 100-107.

[7] Wang S B, Li X R, Bao J S, *et al.* Protective potential of *Angelica sinensis* polysaccharide extract against ethylene glycol-induced calcium oxalate urolithiasis[J]. *Renal Failure*, 2018, 40(1): 618-627.

[8] 张凌云, 叶 迪, 楼招欢. 龙眼叶水提物抗实验性肾结石作用的研究[J]. 现代食品科技, 2018, 34(2): 25-31.

[9] 石振国, 苏 锦, 任永乐, 等. 鬼针草提取物通过 TGF- β 1/Smad3/Angptl4 信号保护急性胰腺炎大鼠肺损伤的实验研究[J]. 四川中医, 2017, 35(2): 47-51.

[10] 任群利, 林 冰, 周 英, 等. 枳椇皮提取物对肾结石大鼠的治疗作用[J]. 中国现代医学杂志, 2017, 27(14): 24-27.

[11] Wang R L, Younis M E, Veeraraghavan P V, *et al.* Antiurolithiatic effect of fucoxanthin on ethylene glycol-induced renal calculus in experimental rats[J]. *Pharmacogn Mag*, 2020, 32(3): 1896-1901.

[12] Ghale-Salimi M Y, Eidi M, Ghaemi N, *et al.* Antiurolithiatic effect of the taraxasterol on ethylene glycol induced kidney calculi in male rats[J]. *Urolithiasis*, 2017, 46(5): 1-10.

[13] Abbasi G F, Bahareh A, Timcheh H A, *et al.* Antilithiatic effects of Scrocin on ethylene glycol-induced lithiasis in rats[J]. *Urolithiasis*, 2014, 42(6): 549-558.

[14] 陈 玲, 涂春香, 施文荣. 鬼针草对实验性豚鼠胆囊结石的影响[J]. 福建中医药, 2009, 40(3): 40-41.

[15] 方 媛, 方祝元. 鬼针草及其有效成分治疗高血压肾损害机制研究概况[J]. 中医杂志, 2018, 59(9): 800-803.