龙眼叶水提物抗实验性肾结石作用的研究

张凌云[1]，叶迪[1]，楼招欢[2]

（1.华南农业大学园艺学院，广东广州 510642）（2.浙江中医药大学药物研究所，浙江杭州 310053）

摘要：为了研究龙眼叶水提取物对肾结石模型大鼠的抑制作用，采用灌胃乙二醇+氯化铵溶液建立肾结石大鼠模型，造模成功后，用低、中、高不同剂量的龙眼叶水提取物对小鼠进行治疗恢复，测定 24 h 饮水量和尿量、尿常规指标、以及血清 Cr、BUN、UA、Ca^{2+}、Mg^{2+}、草酸水平，肾组织中 Ca^{2+}、Mg^{2+}、草酸水平，观察肾脏病理学改变及结晶情况。结果表明：与模型组相比较，各剂量龙眼叶水提取物能降低大鼠 24 h 饮水量（p<0.05）各剂量提取物均能降低模型大鼠 24 h 尿液草酸水平，其中高剂量组上述二者达到显著性差异（p<0.05）；各剂量提取物均能显著降低血清中尿酸（UA）、尿素氮（BUN）、肌酐（Cr）浓度，而对血清中的 Ca^{2+}、Mg^{2+} 浓度影响不明显，但能显著降低肾脏中 Mg^{2+}浓度。各剂量龙眼叶水提取物能不同程度降低肾脏器系数和肾脏草酸水平，减轻肾小管上皮细胞凋亡及草酸结晶程度，改善肾脏病变，降低肾结石发生率。研究结果显示龙眼叶水提取物能抑制肾结石的发生。

关键词：龙眼叶；提取物；乙二醇诱导；肾结石

文章篇号：1673-9078(2018)02-25-31 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.2.005

Inhibitory Effects of Aqueous Extract from Longan (*Dimocarpus longan* Lour) Leaves on Kidney Calculi

ZHANG Ling-yun[1], YE Di[1], LOU Zhao-huan[2]

(1.College of Horticultural Science, South China Agricultural University, Guangzhou, 510642, China)

(2.Institute of Material Medica, Zhejiang Chinese Medicine University, Hangzhou 310053, China)

Abstract: A rat model of kidney calculi was established by gavage with ethylene glycol and ammonium chloride solution to investigate the inhibitory effects of aqueous extract fromlongan dimocarpus (Lour.) leaves on ethylene glycol-induced kidney calculi in rats. The rats were treated with low, medium and high dose of aqueous extract from longan dimocarpus (Lour.) leaves based on the established model, and the drinking water and urine volume (24 h), urine routine indexes, Serum levels of Cr、BUN、UA、Ca^{2+}、Mg^{2+} oxalic acid, levels of Ca^{2+}、Mg^{2+} oxalic acid in kidney tissues were measured. The kidney tissue was subjected to analysis of pathological changes and crystallization The results revealed that each dose of aqueous extract from longan leaves significantly decreased the water volume (p < 0.05) and oxalic acid levels of urine in 24 h, and the high-dose group had a significant difference (p < 0.05). There was a significant decrease of uric acid (UA), blood urea nitrogen (BUN) and creatinine (Cr) in serum and the concentration of Mg^{2+} in kidney in each dose group, and the effects of aqueous extract in each dose on the concentration of $Ca^{2+}$and Mg^{2+} in serum were not significant.. In addition, each dose of aqueous extract from longan leaves could decrease the kidney coefficient and kidney oxalic acid level, and reduce the apoptosis of renal tubular epithelial cell and crystallization degree of oxalic acid, which resulted in the improvement of kidney disease and the reduction of kidney calculi. The results showed that the aqueous extract from longan dimocarpus (Lour.) leaves could inhibit the occurrence of kidney calculi.

Key words: longan leaves; extract; ehylene glycol-induced; kidney calculi

研究表明，有 5%~15%的人群一生中会罹患肾结石，过去 25 年里世界范围内肾结石的发病率不断增加。饮食习惯的改变尤其是高脂和高动物蛋白饮食已损伤的机制与活性氧簇的大量生成有关，因此抗氧化治疗可以作为结石防治的一个手段。抗氧化疗法是目经被证明增加了肾结石的发病率。模型动物与外体细胞化学诱导模型研究结果表明，由于肾小管上皮细胞前结石防治研究的新思路之一，但仍然需要更多的机理性的实验研究进行证实和完善。

龙眼属于无患子科龙眼属，是热带乔木类果树，原产于我国南部和越南北部的南亚热带区域。龙眼的医药价值早在《本草经》中就有记载：“龙眼甘平、无毒、安志厌食，主治五脏之邪气”。李时珍在《本草纲目》中也述及：“龙眼补虚、开胃、健脾、益智。”龙

收稿日期：2017-09-01

基金项目：浙江省自然科学基金项目（LY5H280007）

作者简介：张凌云（1972-），男，博士，副教授，研究方向：茶树生物技术与资源利用

眼植物的根或根皮、树皮、果皮、叶或嫩芽、花、种子亦可供药用。近年来，国内外学者对龙眼的化学成分及其药理活性进行了相关研究[1,2]。研究表明，龙眼叶中可能含有黄酮类、酚类、香豆素类、挥发油甾醇、糖类、苷类、鞣质和有机酸等化学成分，并且黄酮类、多酚物质具有非常强的抗氧化作用，在治疗肿瘤、癌症和降血糖等方面有着很好的疗效[3-6]。我国南方民间关于龙眼叶治疗肾结石疾病的验方，但是具体原理尚不清楚。

本研究以龙眼叶水提取物为材料，采用灌胃乙二醇+氯化铵溶液建立肾结石大鼠模型，通过测定 24 h 饮水量和尿量、尿常规指标、以及血清 Cr、BUN、UA、Ca^{2+}、Mg^{2+}、草酸水平，肾组织中 Ca^{2+}、Mg^{2+}、草酸水平，以及观察肾脏病理学改变和结晶情况，来评估龙眼叶水提取物抗肾结石作用效果，为龙眼叶深加工提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 实验动物

SD 大鼠，清洁级，72 只，体重 160~180 g。购自上海斯莱克实验动物有限责任公司，动物生产许可证号：SCXK（沪）2012-0002，动物质量合格证号：0225064。随机设计分为 6 组，即：空白对照组、模型对照组、阳性对照组及三个试验组（低剂量组、中剂量组、高剂量组，即：龙眼叶水提取物 2.0、4.0、8.0 g/kg）。

1.1.2 实验材料

受试原材料为脆肉石硖龙眼叶（由中山市东凤镇西罟脆肉石硖龙眼专业合作社提供）。取龙眼叶适量，于 100 ℃提取 3 次，加水量分别为：30 BV、20 BV、20 BV，提取时间分别为 90 min、60 min、45 min，滤取三次药液，减压回收并适当浓缩，得龙眼叶水提取物，药液浓度 1.0 g（生药）/mL，临用前用纯水稀释至所需浓度。阳性对照药：(排石颗粒，批号：150909)；规格：20 g×10 袋，用蒸馏水配制成浓度为 0.6 g/mL 溶液备用。

1.1.3 主要试剂

尿酸（UA）试剂盒、尿素氮（BUN）试剂盒、肌酐（Cr）试剂盒购自宁波美康生物科技股份有限公司；Ca 试剂盒、Mg 试剂盒购自南京建成生物科技有限公司；草酸试剂盒购自美国 Bio Vision 公司；URIT 11A 尿试纸条购自桂林优利特医疗电子有限公司；伊红和苏木素购自南京建成科技有限公司；其余试剂为国产分析纯。

1.1.4 实验仪器

TBA-40FR 全自动生化仪，日本东芝医疗系统株式会社；Powerwave340 酶标仪，美国 Bio-TEK 公司；Heraeus Biofuge Stra 冷冻离心机，德国 Heraeus；SAKURA Tissue-Tek VIP 5Jr 自动脱水机（日本樱花检验仪器株式会社）；MEIKO EC360 包埋机（德国 MEIKO 公司）；LEICARM2245 切片机（德国 LEICA 公司）；生物显微镜 B5-223IEP（Motic 公司）；Adavance3.2 图像分析系统（Motic 公司）。

1.2 方法

1.2.1 动物模型构建及龙眼叶水提物干预实验

选取健康雄性 SD 大鼠 72 只，随机分为 6 组，即空白对照组、模型对照组、阳性对照组（排石颗粒）、低（2 g/kg）、中（4 g/kg）、高（8 g/kg）三个剂量组，每组 12 只；所有大鼠均给予基础饲料，自由采食饮水。除正常对照组（以等体积的蒸馏水灌胃）外，其余各组大鼠均灌胃给予成石液（2.5%乙二醇+2%氯化铵），每日 1 次，灌胃容积 1 mL/100 g，连续 5 周；第 6 周开始，除正常对照组（以等体积的蒸馏水灌胃）外，其余各组大鼠均给予 1%乙二醇自由饮用，2.5%乙二醇+2%氯化铵灌胃，每日 1 次，灌胃容积 1 mL/100 g；第 7 周开始除空白对照组、模型对照组、阳性对照组外，其余 3 组连续 12 周按高、中、低剂量组（依重量计分别为 2.0、4.0、8.0 g/kg）灌胃龙眼叶水提物，给药体积为 10 mL/kg（即 1 mL/100 g 体重），按体重的增减调整给药量。

1.2.2 大鼠饮水量、尿量及尿液生化指标检测

连续给药 9 周后，测定大鼠饮水量及尿量方法如下；将大鼠分别放于代谢笼内测定大鼠 24 h 饮水量并于收集 24 h 大鼠尿液。尿液生化指标检测：采用试剂盒测定尿液中 Ca^{2+}、Mg^{2+}水平和尿液分析仪检测尿常规指标。

1.2.3 大鼠血清生化指标检测

末次给药后，各组大鼠禁食 12 h，戊巴比妥钠麻醉，下腔动脉取血，3500 r/min 离心 15 min，取上层血清按照试剂盒操作方法测定各组大鼠血清 Cr、BUN、UA 水平，并检测血清 Ca^{2+}、Mg^{2+}水平。

1.2.4 大鼠肾脏结石观察与生化指标检测

切取各组大鼠双肾，纵向剖开，取左肾用 10%中性福尔马林液固定，作常规石蜡切片，苏木精-伊红（HE）染色，显微镜下观察各组大鼠肾组织病理改变及肾组织草酸钙结晶分布，并对每个病理切片样本随机选择 5 个视野，放大 100 倍数下获取图片后，对各

组大鼠肾组织病理切片进行分析；取右肾按照试剂盒操作测定肾组织 Ca^{2+}、Mg^{2+}水平。

1.3 数据分析

采用 SPSS 16.0 软件包进行数据统计。计量资料数据以 $\bar{x}$±SD 表示，采用单因素方差分析进行多重比较，组间比较方差齐性采用 LSD 分析，方差不齐采用 Bunnett's T 分析；p<0.05 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 龙眼叶水提物对大鼠 24 h 饮水量及尿量的影响

与正常对照组比较，模型对照组 24 h 饮水量及 24 h 尿量显著增加（p<0.01），达到极显著差异。说明造模比较成功，即肾结石模型大鼠在病态条件下饮水量和尿量都有大幅度增加。与模型对照组比较，阳性对照组的经过排石颗粒药物的治疗饮水量和尿量有不同程度的下降，饮水量降低量达到显著水平，说明药物治疗对肾结石有一定效果。而采用龙眼叶水提取物治疗的大鼠 24 h 饮水量有降低趋势；并且 8 g/kg 剂量龙眼叶水提取物能明显降低大鼠 24 h 饮水量（p<0.05）；各剂量组大鼠 24 h 尿量均有降低趋势（见表 1），但模型对照组相比，没有达到显著差异，治疗效果与排石颗粒类似。

表 1 对大鼠 24 h 饮水量及 24 h 尿量的影响（ $\bar{x}$±SD）

Table 1 Effects of aqueous extract from longan leaves on urine volume and water intake in 24 h

组别	剂量/(g/kg)	饮水量/mL	尿量/mL
正常组	-	47.50±4.33	7.40±3.03
模型组	-	103.33±15.28$^{\Delta\Delta}$	21.33±9.77$^{\Delta\Delta}$
阳性组	6	64.17±12.33*	16.50±5.63
龙眼叶水提取物	2	78.33±1.44*	18.70±7.99
	4	86.67±16.65	17.00±7.31
	8	77.78±8.43*	16.15±8.17

注：与正常对照组比较，$^{\Delta}p$<0.05，$^{\Delta\Delta}p$<0.01；与模型对照组比较，*p<0.05，** p<0.01。

2.2 龙眼叶水提物对模型大鼠尿液生化的影响

如表 2 所示，与正常对照组相比，模型对照组尿液钙离子、镁离子浓度显著比正常大鼠要低（分别为 4.15±1.90 mmol/L 和 15.89±11.35 mmol/L），而草酸浓度明显升高（p<0.05），与正常大鼠相比达到显著差异（237.1±80.80 mmol/L 和 443.1±196.2 mmol/L），说明造模非常成功。与模型对照组比较，低剂量龙眼叶水提取物能明显升高大鼠 24 h 尿液镁离子浓度（p<0.05）；但对尿液中钙离子浓度的影响效果不是很一致，如低剂量水提取物可以升高钙离子浓度，可以达到 5.17±2.77 mmol/L，效果超过阳性药物；但是随着剂量的增加，反而效果不如低剂量的效果好。与模型组相比较，各剂量龙眼叶水提取物均能降低模型大鼠 24 h 尿液草酸水平，其中 8 g/kg 剂量组具有显著性差异（p<0.05），前者为 443.1±196.2 mmol/L，后者为 251.1±124.8 mmol/L，高剂量组已经接近正常大鼠（237.1±80.8 mmol/L），说明高剂量组降低尿中草酸水平具有较好的效果。

表 2 龙眼叶水提物对大鼠 24h 尿液 Ca^{2+}、Mg^{2+}的影响（ $\bar{x}$±SD）

Table 2 Effects of aqueous extracts from longan leaves on the concentration of Ca^{2+} and Mg^{2+} in urine

组别	剂量 /(g/kg)	Ca^{2+} /(mmol/L)	Mg^{2+} /(mmol/L)	草酸 /(mmol/L)
正常组	-	6.59±2.46	28.41±11.87	237.1±80.8
模型组	-	4.15±1.90$^{\Delta}$	15.89±11.35$^{\Delta}$	443.1±196.2$^{\Delta}$
阳性组	6	4.49±2.56	22.83±12.26	389.7±262.5
龙眼叶水提取物	2	5.17±2.77	34.49±16.94*	319.7±75.4
	4	2.94±1.14$^{\#}$	23.44±9.35	388.0±165.3
	8	3.94±1.69	16.47±10.55$^{\#}$	251.1±124.8*

注：与正常对照组比较，$^{\Delta}p$<0.05，$^{\Delta\Delta}p$<0.01；与模型对照组比较，* p<0.05，** p<0.01；与低剂量组比，# p <0.05。

2.3 龙眼叶水提物对血清生化的影响

从表 3 可以看出，与正常对照组比较，模型对照组大鼠血清 Ca^{2+}、Mg^{2+}、UA、BUN、Cr 水平均显著升高，对正常大鼠相比均达到极显著水平（p<0.01）。采用阳性药物排石颗粒治疗后，血清中 Ca^{2+}、Mg^{2+}水平有一定程度的降低，变化达到显著差异。但是各剂量龙眼叶水提取物对血清 Ca^{2+}、Mg^{2+}水平无明显影响，但能不同程度降低模型大鼠血清尿酸（UA）、尿素氮（BUN）及肌酐（Cr）水平，降低效果不仅达到显著水平（p<0.05），而且要比阳性对照药物排石颗粒效果好。

上述结果表明，龙眼叶水提取物会不同程度的对肾功能具有保护作用，且达到一定浓度后（2 g/kg）降低血清中尿酸（UA）、尿素氮（BUN）及肌酐（Cr）差异不大。

表 3 龙眼叶水提物对大鼠血清生化指标的影响（ $\bar{x}$±SD）

Table 3 Effects of aqueous extracts from longan leaves on the biochemical index in serum

组别	剂量/(g/kg)	Ca^{2+}/(mmol/L)	Mg^{2+}/(mmol/L)	UA/(mmol/L)	BUN/(mmol/L)	Cr/(μmol/L)
正常对照组	-	1.51±0.18	0.62±0.12	55.17±11.50	6.75±0.91	52.08±4.03
模型对照组	-	1.76±0.12$^{\Delta\Delta}$	1.04±0.23$^{\Delta\Delta}$	85.88±27.04$^{\Delta\Delta}$	20.64±8.75$^{\Delta\Delta}$	104.86±31.93$^{\Delta\Delta}$
阳性对照组	6	1.57±0.21*	0.81±0.12*	70.50±11.31	15.73±8.13	83.56±27.14
龙眼叶水提取物	2	1.74±0.14	1.08±0.30	61.40±17.26*	12.89±5.84*	77.00±24.54*
	4	1.78±0.24	1.01±0.13#	62.89±12.83*	12.16±4.53*	72.60±18.90*
	8	1.72±0.16	1.06±0.32	62.57±14.23*	12.92±7.21*	73.73±18.66*

注：与正常对照组比较，$^{\Delta}p<0.05$，$^{\Delta\Delta}p<0.01$；与模型对照组比较，$*p<0.05$，$**p<0.01$；与低剂量（2 g/kg）组比，$\#p<0.05$。

2.4 龙眼叶水提物对尿液 pH 的影响

前人研究表明，代谢综合征及其组成部分可以改变尿的生化环境以促进结石。尿 pH 值降低可能是因为肾近端小管泌氨减少从而导致可滴定算排出增多造成的。随着代谢综合征危险因素的增加尿 pH 值和尿氨可以显著的减少[6]。Losito 等[7]的研究也发现患有高血压的肾结石人群比没有高血压的肾结石患者相比，尿枸橼酸分泌减少，尿 pH 值下降同时尿中可滴定酸的排出增多。因此，尿液 pH 常作为肾结石代谢异常评估的指标之一。

本研究结果表明，正常大鼠尿液 pH<6 的比率为 0%，即尿液 pH 都不低于 6；而模型组大鼠尿液 pH<6 的比率为 44.4%，由此可见，经过药物诱导处理的大鼠代谢出现一定程度的紊乱。与模型组相比，采用阳性药物排石颗粒治疗的大鼠尿液 pH 有一定程度的升高。

仅有 10%的大鼠低于 6，而中等剂量和高剂量组（4 g/kg 和 8 g/kg）尿液 pH<6 的大鼠均无发现，pH≥7 的比率分别为 40%和 10%，上述两组对肾结石的治疗效果要超过排石颗粒。研究结果还说明，模型对照组大鼠尿液酸度升高，可能与尿草酸水平升高有关，而给予 4、8 g/kg 剂量龙眼叶水提取物后大鼠尿液酸度降低（见表 4）。

表 4 龙眼叶水提物对大鼠尿液 pH 的影响

Table 4 Effects of aqueous extracts from longan leaves on pH of urine

组别	剂量/(mg/kg)	尿 pH 比率/%				
		5.5	6	6.5	7	7.5
正常对照组	-	0	50	40	10	0
模型对照组	-	44.4	44.4	11.1	0	0
阳性对照组	6	10	60	30	0	0
龙眼叶水提取物	2	20	60	20	0	0
	4	0	50	10	30	10
	8	0	30	60	10	0

2.5 对肾脏器系数及钙、镁离子、草酸水平的影响

脏器系数又称脏体比，是试验动物某脏器的重量与其体重的比值。正常状态下，各脏器与体重的比值比较恒定。动物染毒后，受损脏器重量可能发生改变，故脏器系数也随之而改变。脏器系数对动物所处环境的变化较为敏感，且测定方法简便易行，因而是毒理试验中常用的指标[8]。本研究中，与对照组相比，模型组肾脏器系数（Relative kidney weight，RKW）极显著增加，但采用阳性对照药物和龙眼叶水提取物治疗后，RKW 降低，但未有显著变化，而且各剂量龙眼叶和排石颗粒的效果近似（二者并无显著差别，见表 5）。

而肾脏钙离子含量的变化趋势与 RKW 结果类似，但排石颗粒的治疗要好一些，与龙眼叶提取物相比，仍未达到显著差异。肾脏内的镁离子水平却与钙离子的变化显著不同。与模型对照组比较，龙眼叶水提取物各剂量组均能显著降低肾脏内镁子水平，而且降低效果要比阳性对照药物要好很多；龙眼叶水提取物各剂量组间镁离子含量的变化不明显，也未显出量效关系。与模型大鼠相比，龙眼叶治疗的大鼠肾脏内草酸水平呈降低趋势，但未达到显著水平。而草酸含量要比阳性对照药物低（未达到显著水平），说明龙眼叶要比排石颗粒更能影响草酸浓度。

表 5 对大鼠肾脏系数及钙、镁离子、草酸水平的影响（ $\bar{x}$±SD）

Table 5 Effects of aqueous extracts from longan leaves on RKW and levels of Ca^{2+}, Mg^{2+} and oxalic acid in kidney tissue

组别	剂量/(g/kg)	RKW/(mg/g)	Ca^{2+}/(mmol/g prot)	Mg^{2+}/(mmol/g prot)	草酸/(mmol/L)
正常对照组	-	0.048±0.01	0.086±0.02	6.55±0.33	1271.8±326.8
模型对照组	-	0.106±0.03$^{\Delta\Delta}$	0.103±0.04	12.36±2.32$^{\Delta\Delta}$	1517.9±327.3
阳性对照组	6	0.092±0.02	0.095±0.02	10.67±2.93	1371.0±350.0
龙眼叶水提取物	2	0.094±0.02	0.105±0.02	9.92±2.32*	1455.2±452.8
	4	0.093±0.02	0.108±0.02	9.72±1.91*	1307.7±327.3
	8	0.096±0.03	0.128±0.02	9.56±2.35*	1361.2±281.9

注：与正常对照组比较，$^{\Delta}p$<0.05，$^{\Delta\Delta}p$<0.01；与模型对照组比较，* p<0.05，** p<0.01。

2.6 龙眼叶水提物对肾脏组织形态学的影响



图 1 各组肾脏整体外观图

Fig.1 Appearance of rat kidney in each group

注：G1：正常对照组；G2：模型对照组；G3：排石颗粒组；G4：龙眼叶水提物 2 g/kg；G5：龙眼叶水提物 4 g/kg；G6：龙眼叶水提物 8 g/kg。

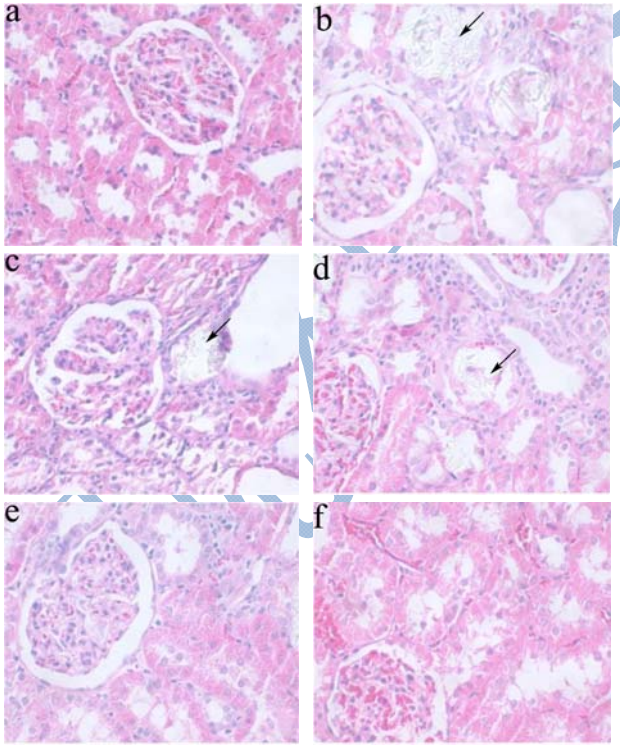


图 2 肾脏 HE 染色（400×，箭头所指为草酸钙结晶）

Fig.2 Figure representative microscopic images (400×, tubular calculi showed by arrows) of kidney tissues

注：a：正常对照组；b：模型对照组；c：排石颗粒组；d：龙眼叶水提物 2g/kg；e：龙眼叶水提物 4g/kg；f：龙眼叶水提物 8g/kg。

采用乙二醇+氯化铵诱导的模型大鼠，肾脏会有不同程度的肿大。本研究中，将摘取的肾脏用肉眼观察，可发现模型组大鼠肾脏不同程度肿大，颜色变浅或发白；与模型组相比，不同剂量龙眼叶水提取物均能有效减轻肾脏的肿胀度，改善肾脏形态（图 1）。HE 染色显示，正常对照组肾脏结构正常，未见细胞水肿变性，肾小管腔内无沉积物，未见草酸钙结晶。模型组大鼠肾脏组织学改变表现为肾脏皮部多灶性结晶，肾小管颗粒状变性，管腔明显扩张，形状不规则，可见大量草酸钙结晶聚集（淡蓝色晶体，不规则，折光率强）；部分肾小球血管球和肾小囊丢失，内含草酸钙结晶，炎性细胞浸润明显；各剂量龙眼叶水提取物均能不同程度地改善肾脏病变，减轻肾小管颗粒样变性和肾小管草酸结晶状态（呈零散单灶性及局部小灶性分布，结晶较松散），降低结石发生率；其中以 8 g/kg 剂量作用最为明显（图 2）。虽然阳性对照物可以减轻肾结石的发生（见图 2c），但各剂量龙眼叶提取物的抗结石效果都要比阳性对照物好，尤其是 4 g/kg 和 8 g/kg 剂量，已经看不到结晶，说明龙眼叶抗肾结石效果是非常好的。

3 讨论

3.1 肾结石是泌尿外科的常见疾病之一，在我国发病率较高，近年来，我国泌尿系统结石的发病率有增加趋势，目前的手术或药物疗法效果并不理想，且存在诸多副反应[9,10]。乙二醇加氯化铵法诱导肾结石动物模型是较成熟且稳定的造模方法。乙二醇是草酸代谢途径中的代谢产物，乙二醇进入体内后转化成羟乙酸，后者在羟乙酸氧化酶的作用下直接转化成草酸，也可以通过乳酸脱氢酶的催化转化成乙醛酸。乙醛酸除可直接在非酶促作用下转化成草酸外，主要是在羟乙酸氧化酶、黄嘌呤氧化酶及乳酸脱氢酶的作用下转变为草酸，羟乙酸及乙醛酸是内源性草酸合成的两个主要的前体。同时乙二醇和氯化铵有一定的毒性，会对肾

脏造成明显损害，尤其是肾小球滤过功能[11]。本实验采用成石液（2.5%乙二醇+2%氯化铵）诱导法建立肾结石大鼠模型。模型大鼠 24 h 饮水量、24 h 尿量、尿液钙离子含量、尿液草酸含量、血清钙离子、血清 UA、BUN、Cr 含量、肾脏脏器系数及肾脏钙离子、草酸含量均明显升高，说明本实验模型是成功的。

3.2 在肾结石模型大鼠尿液中和肾脏中，草酸含量、尿酸度均升高，说明大鼠体内草酸生成明显增加，促进肾脏中草酸钙结晶的形成。而龙眼叶水提取物高剂量组（8 g/kg）能一定程度上降低尿草酸和肾脏草酸含量，尿液酸度比模型组增加。我们的研究结果提示，龙眼叶水提取物能减少体内草酸生成，降低肾草酸含量，进而抑制草酸钙结晶的形成；其机制可能是龙眼叶水提取物抑制草酸在肠道内吸收或抑制肝脏的内源性代谢过程，抑制羟乙酸和乙醛酸向草酸的转化，从而使草酸生成减少。本研究中，肾结石模型大鼠血清肌酐、尿素氮和尿酸水平均明显升高，出现严重的肾功能受损。龙眼叶水提取物（8 g/kg）能在一定程度上降低血清肌酐、尿素氮和尿酸水平。这一结果说明，高浓度的龙眼叶水提取物能保护肾功能，改善肾小球排泄等作用。

3.3 正常情况下肾小管上皮细胞可很好地抵制晶体的粘附，当草酸浓度升高时，高浓度的草酸对肾细胞有直接毒性作用，肾上皮细胞受损，细胞凋亡增加，细胞通透性增加等，使肾小管上皮细胞失去其原有的抵制晶体粘附能力，导致晶体在其表面停滞、聚集，进而损坏其固有结构，表现为细胞的水肿坏死，肾小管管腔扩张，炎性浸润不断恶化，反之各种损害结果再次加重了结晶体在其各个部位的粘附、聚集[12,13]。肾结石模型大鼠大体观察出现肾脏肿大、颜色变浅或发白的现象，且肾脏系数明显增大；光镜观察出现肾小管萎缩，官腔明显扩张，上皮细胞水肿，腔内可见大量草酸钙结晶及上皮细胞坏死物等病理改变。而不同剂量的龙眼叶水提取物能降低肾脏系数，减轻肾脏草酸钙结晶、炎性浸润和肾小球等病理改变，减轻肾脏组织病理损伤和肾小管草酸钙结晶的形成。综上所述，脆肉石碜龙眼叶水提取物具有改善肾功能和良好的抗实验性肾结石作用，各剂量龙眼叶提取物的抗结石效果都要比阳性对照物好，尤其是 4 g/kg 和 8 g/kg 剂量，已经看不到结晶。

3.4 Cr、BUN 在一定程度上可反映肾小球滤过功能的损伤程度。无机离子如钙、镁、磷等参与了结石的形成，其中高钙含量是结石形成的重要因素，而镁与钙竞争结合草酸的结合位点，形成可溶性的草酸镁，可减少不溶性草酸钙的产生。因此钙是结石形成的促进成分，镁是结石形成的抑制成分[14]。人体血液中的钙、镁主要经肾小球滤过，而大部分又会被肾小管重吸收。肾结石模型大鼠出现血清中钙和镁离子水平升高，尿液中钙和镁离子水平降低，肾脏钙离子水平升高。这可能与模型大鼠肾功能受损，肾脏排泄钙镁离子能力减弱，使尿钙和尿镁含量减少。而钙离子会在肾脏积聚，与草酸形成结晶。但本研究结果中，与模型对照组比较，低剂量龙眼叶水提取物能明显升高大鼠 24 h 尿液镁离子浓度，而且显著降低肾脏内镁子浓度，而且降低效果要比阳性对照药物要好很多；但是血清中镁离子浓度变化不大。上述结果正好证明了龙眼叶通过调节镁离子浓度来实现抑制结石的目的。

3.5 前人研究表明，草酸钙结晶生成的病理过程主要是草酸钙晶体刺激肾小管上皮细胞，激活烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶的激活，产生活性氧，进而使亲环蛋白 D（Cyclophilin D）活化，继而发生线粒体通透性转换孔开放，诱导线粒体坍塌，活性氧进一步增多，机体处于较高的氧化应激状态，细胞色素 C 由坍塌的线粒体释放继而激活 Caspase3，这些反应最终导致小管上皮细胞损伤乃至凋亡，改变细胞膜上磷脂酰丝氨酸的分布，从而促进晶体与小管上皮细胞的粘附，促成大量的肾结晶[15]。既往有关肾结晶的体内、外研究发现，在结晶形成的过程中，随着成石因素逐渐强于抑石因素，氧化应激水平增强，而机体本身的抗氧化能力逐渐减弱，如果能从外界给予机体抵抗氧化应激的支持，那么就可以减轻肾小管上皮细胞损伤，阻断结晶的进一步生长[16]。有研究者从龙眼果提取物包括假种皮，果皮和种子，表现出了优异的抗氧化能力和良好的抗酪氨酸酶和抗癌活性[3~5]。本研究的相关结果，也说明了龙眼叶水提物具有抗肾结石能力，其可能的机理是龙眼叶中所含有的黄酮类等活性物质有关，其详细机理还有待于进一步深入研究。

4 结论

本研究立足于龙眼叶的深加工与综合利用，首次评估了龙眼叶水提物对肾结石大鼠模型抑制结石效果的影响，研究结果表明，各剂量龙眼叶水提取物能够不同程度的降低大鼠 24 h 尿液草酸水平；各剂量提取物均能显著降低血清中尿酸（UA）、尿素氮（BUN）、肌酐（Cr）浓度，能不同程度降低肾脏器系数和肾脏草酸水平，减轻肾小管上皮细胞凋亡及草酸结晶程度，改善肾脏病变，降低肾结石发生率。研究结果提示龙眼叶水提取物能抑制和减轻肾结石的发生。本研究结果可为龙眼叶综合利用提供理论依据，也可为肾结石

疾病的中药防治提供参考。

参考文献

[1] Yuan-Chiang Chung, Chih-Cheng Lin, Chih-Chung Chou, et al. The effect of Longan seed polypHenols on colorectal carcinoma cells [J]. European Journal of Clinical Investigation, 2010, 40: 713-721

[2] Chien-Wei Hou, Ying-Chung Lee, Hsiao-Fang Hung, et al. Longan seed extract reduces hyperuricemia via modulating urate transporters and suppressing xanthine oxidase activity [J]. The American Journal of Chinese Medicine, 2012, 40(5): 979-991

[3] Meng-Chieh Hsieh, Yi-Jane Shen, Yueh-Hsiung Kuo et al. Antioxidative activity and active components of Longan (*Dimocarpus longan* Lour.) flower extracts [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(16): 7010-7016

[4] Guoxiang Jiang, Yueming Jiang, Bao Yang, et al. Structural characteristics and antioxidant activities of oligosaccharides from longan fruit pericarp [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(19): 9293-929

[5] Rangkadilok N, Sitthimonchai S, Worasuttayangkurn L, et al. Evaluation of free radical scavenging and antityrosinase activities of standardized longan fruit extract [J]. Food Chemical Toxicology, 2007, 45(2): 328-336

[6] Maalouf N M, Cameron M A, Moe O W, et al. Low urine pH: a novel feature of the metabolic syndrome [J]. Clin. J Am. Soc. NepHrol., 2007, 2(5): 883-888

[7] Losito A, Nunzi E G, Covarelli C, et al. Increased acid excretion in kidney stone formers with essential hypertension [J]. NepHrol Dial Transplant, 2009, 24(1): 137-41

[8] 恽时锋,胡玉红,田小芸.不同品种试验兔主要脏器重量及脏器系数的研究[J].中国比较医学杂志,2004,14(6):350-354
YUN Shi-feng, HU Yu-hong, TIAN Xiao-yun. Study on the chief organ weight and coefficients of different species of experimental rabbits [J]. Chinese Journal of Comparative Medicine, 2004, 14(6): 350-354

[9] BaoYang, Mouming Zhao, Yueming Jiang. Optimization of tyrosinase inhibition activity of ultrasonic-extracted polysaccharides from longan fruit pericar [J]. Food Chemistry, 2008, 110(2): 294-300

[10] Charles D Scales Jr, Alexandria C Smith, Janet M Hanley, et al. Prevalence of kidney stones in The United States [J]. European Urology, 2012, 62: 160-165

[11] Andrew D Rule, Eric J Bergstralh, L JosepH Melton III, et al. Kidney stones and the risk for chronic kidney disease [J]. Clinical Journal of the American Society of NepHrology, 2009, 4(4): 804-811

[12] Amol L Shirfule, Venkatesh Racharla, S S Y H Qadri, et al. Exploring antiurolithic effects of gokshuradi polyherbal ayurvedic formulation in ethylene-glycolinduced urolithic rats [J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013, 2013: 763720

[13] Sivagnanam Thamilselvan, Saeed R Khan, Mani Menon. Oxalate and calcium oxalate mediated free radical toxicity in renal epithelial cells: effect of antioxidants [J]. Urological Research, 2003, 31: 3-9

[14] 张顺祥,李良成,沈珉,等.血液和尿液中化学元素与尿石症发病关系的研究[J].现代预防医学,2002,29(5):603-606
ZHANG Shun-xiang, LI Liang-cheng, SHEN Min, et al. Study on chemical elements in serum and urine and urolithiasis [J]. Modern Preventive Medicine, 2002, 29(5): 603-606

[15] R M ThusharaM, Hemshekhar M, Sebastin Santhosh S, et al. Crocin, a dietary additive protects platelets from oxidative stress-induced apoptosis and inhibits platelet aggregation [J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2013, 373: 73-83

[16] Kanlaya R, Khamchun S, Kapincharanon C, et al. Protective effect of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) via Nrf2 pathway against oxalate-induced epithelial mesenchymal transition (EMT) of renal tubular cells [J]. Sci. Rep., 2016, 6: 30233