

# 五苓散调控RAS对阿霉素肾病综合征大鼠肾损伤的保护作用

何丹, 李强, 陈少丽, 都广礼\*  
(上海中医药大学基础医学院, 上海 201203)

**摘要:** 目的 探讨五苓散及其拆方以及单体桂皮醛对肾病综合征模型大鼠的影响。方法 通过2次尾静脉注射阿霉素(3 mg/kg)构建阿霉素肾病综合征大鼠模型,并分为模型组、五苓散组、五苓散去桂枝组、五苓散去桂枝加桂皮醛组、桂皮醛组、贝那普利组,每组10只,分别灌胃给予相应药物,连续28 d。最后一次灌胃后收集大鼠24 h尿液,检测尿蛋白、肌酐、尿素氮等指标,Western blot法检测血管紧张素转换酶(ACE)、血管紧张素转化酶2(ACE2)、血管紧张素2(Ang-2)蛋白表达。结果 与模型组比较,五苓散去桂枝加桂皮醛组、桂皮醛组大鼠尿蛋白、肌酐、尿素氮水平以及ACE、Ang-2表达降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),ACE2表达升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。结论 桂皮醛可能是五苓散中发挥抗肾病综合征的主要活性成分,其作用机制可能与RAS信号通路有关。

**关键词:** 五苓散; 桂枝; 桂皮醛; 肾病综合征; RAS信号通路

**中图分类号:** R285.5

**文献标志码:** B

**文章编号:** 1001-1528(2024)02-0640-04

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.02.049

肾病综合征是一系列以大量蛋白尿、低蛋白血症、高脂血症以及水肿为特征的肾脏疾病。该病并发症多<sup>[1]</sup>、复发率高<sup>[2]</sup>,且发病机制未明。因此,探讨肾病综合征的发病机制,寻找安全有效的治疗药物显得尤为重要<sup>[3]</sup>。

五苓散<sup>[4]</sup>出自《伤寒论》,由茯苓、猪苓、泽泻、白术、桂枝组成,是治疗阳不化气,水湿内停之经典方剂。近年来,五苓散的应用已不局限于蓄水证。研究表明,五苓散对改善泌尿系统<sup>[5-6]</sup>、心血管系统<sup>[7]</sup>疾病有明显优势。桂枝是樟科植物肉桂的干燥嫩枝,具有利尿、改善血液循环、扩张血管等多种药理活性<sup>[8]</sup>。徐灵胎在《医学源流论·古方加减论》中指出:“五苓之妙,专在桂枝”,可见桂枝在全方中起着至关重要的作用。桂皮醛是桂枝的主要化学成分,具有保护心肌<sup>[9]</sup>、调控血压<sup>[10]</sup>、减轻血管内皮损伤<sup>[11]</sup>等药理作用。课题组前期研究发现,桂枝是五苓散的“要药”,桂皮醛是桂枝的重要活性成分,并对阿霉素肾病大鼠肾功能有保护作用<sup>[12-13]</sup>。

本研究通过阿霉素构建肾病综合征大鼠模型,探讨五苓散及其拆方以及单体桂皮醛对肾病综合征模型大鼠的影响及其作用机制,以期对肾病综合征的临床治疗提供理论基础。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF级雄性SD大鼠70只,6~8周龄,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(沪)2020-0002。饲养环境为温度19~26℃,相

对湿度30%~70%,12 h/12 h明暗交替,自由饮食饮水。本研究已通过上海中医药大学实验动物伦理委员会审查(伦理号PZSHUTCM190912007)。

**1.2 药物** 盐酸阿霉素(批号25316-40-9),购自上海沃凯化学试剂有限公司;盐酸贝那普利(批号X2603),购自北京诺华制药有限公司。五苓散由猪苓9 g、茯苓9 g、泽泻15 g、白术9 g、桂枝6 g组成,所有饮片均购自康桥中药饮片有限公司,经上海中医药大学都广礼教授鉴定为正品,所有饮片浸泡1 h,煎煮30 min,旋转蒸发浓缩,五苓散全方的给药质量浓度为1.6 g/mL,五苓散去桂枝方的给药质量浓度为1.4 g/mL,五苓散去桂枝加桂皮醛方的给药质量浓度为1.403 g/mL。桂皮醛对照品(批号104-55-2),购自上海源叶生物科技有限公司。所有药物以人临床剂量3倍给药,并根据大鼠给药换算公式计算,剂量为10 mL/kg。

**1.3 试剂** 尿素氮(批号2020001)、肌酐(批号2020003)检测试剂盒购自长春汇力生物技术有限公司;尿蛋白检测试剂盒(批号C035-2-1)购自南京建成生物工程研究所有限公司;ACE(批号sc-23908)、ACE2(批号sc-390851)、Ang-2(批号sc-74402)一抗,购自美国Santa Cruz Biotechnology公司;GAPDH(批号60004-1-1g),购自美国Proteintech公司;山羊抗小鼠IgM二抗(批号L3032),购自美国Signalway Antibody公司。

**1.4 仪器** 2-16PK离心机购自美国Sigma-Aldrich公司;

收稿日期:2023-01-29

基金项目:上海中医药大学“杏林传承型人才培养计划”项目(上中医人字[2019]24号)

作者简介:何丹(1990—),女,博士生,主治医师,从事方剂配伍规律的理论、实验研究。Tel:18217434056, E-mail: danhe2020@163.com

\*通信作者:都广礼(1970—),男,教授,博士生导师,从事方剂配伍的理论及机制研究。Tel:13916195505, E-mail: duguangli2002@126.com

Primo-Star 光学显微镜购自蔡司光学仪器(上海)国际贸易有限公司; TS-8 摇床购自海门市其林贝尔仪器制造有限公司; Epoch 酶标检测仪购自美国 BioTek 公司。

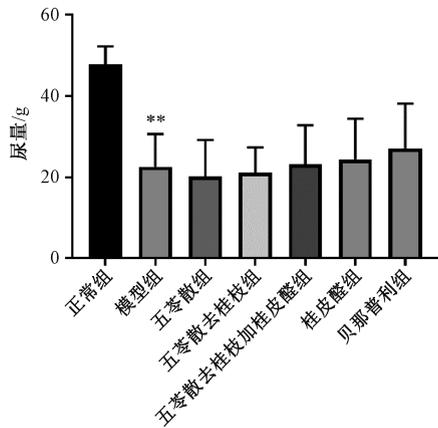
## 2 方法

2.1 造模、分组及干预 70 只 SD 大鼠按体质量随机分组, 取正常组 10 只, 其余大鼠分别于实验第 1 天和第 8 天尾静脉注射阿霉素 3 mg/kg 构建 SD 大鼠阿霉素肾病综合征模型。造模成功后随机分为模型组、五苓散组、五苓散去桂枝组、五苓散去桂枝加桂皮醛组、桂皮醛组、贝那普利组, 每组 10 只, 灌胃给予相应药物, 具体灌胃剂量按每天体质量计算。其中, 桂皮醛组给予 26 mg/kg 桂皮醛溶液, 贝那普利组给予 12 mg/kg 贝那普利溶液。每天 1 次, 连续 28 d。

2.2 检测指标 最后一次给药结束后收集大鼠 24 h 尿液, 腹主动脉取血于抗凝管, 离心并收集血浆; 摘取肾脏, 称定质量, 左肾平均剖开, 一半于甲醛中固定, 另一半用 OCT 包埋; 右肾分成 3 份冷冻保存。

2.2.1 24 h 尿量及尿蛋白水平 代谢笼收集各组大鼠 24 h 尿液后测定具体尿量, 3 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 按照相关试剂盒说明书检测尿蛋白水平。

2.2.2 肾功能指标 按照相关试剂盒说明书检测血浆中肌酐、尿素氮水平。



注: 与正常组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ 。

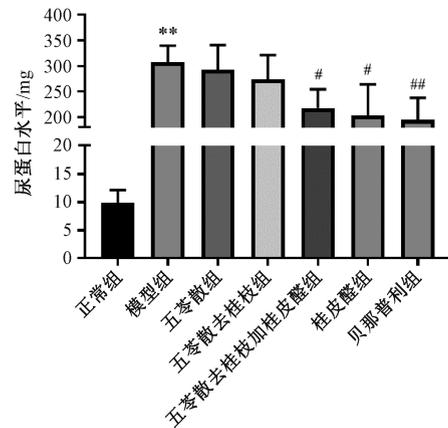
图 1 各组大鼠 24 h 尿量、尿蛋白水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

2.2.3 Western blot 法检测肾组织 ACE、ACE2、Ang-2 蛋白表达 切取冷冻保存的肾脏组织, 称定质量后放入 1.5 mL 离心管, 用剪刀将组织剪碎, 加入裂解液, 在冰上静置 35 min, 研磨, 离心后取上清, 用 BCA 法进行蛋白定量。常规电泳、转膜, 加入 ACE、ACE2、Ang-2、GAPDH 一抗 (1:200) 37 °C 孵育 1.5 h, 洗膜后, 室温加入山羊抗小鼠 IgM 二抗 37 °C 孵育 45 min, 洗膜, 以 GAPDH 为内参, 用 Image J 软件进行条带灰度值定量分析。

2.3 统计学分析 通过 GraphPad Prism 8.0.1 软件进行处理, 若为正态分布, 数据以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 TUKEY 法; 若不符合正态分布, 用中位数及四分位数间距  $M(Q_1, Q_3)$  进行统计描述, 采用 Kruskal-Wallis H 秩和检验, 方差不齐时采用 T2 检验。 $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 3 结果

3.1 五苓散对大鼠 24 h 尿量、尿蛋白水平的影响 如图 1 所示, 与正常组比较, 模型组大鼠尿蛋白水平升高 ( $P < 0.01$ ), 24 h 尿量减少 ( $P < 0.01$ ), 表明阿霉素肾病综合征大鼠模型构建成功; 与模型组比较, 五苓散去桂枝加桂皮醛组、桂皮醛组、贝那普利组大鼠尿蛋白水平降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。



3.2 五苓散对大鼠肾功能的影响 如图 2 所示, 与正常组比较, 模型组大鼠肌酐、尿素氮水平升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 五苓散去桂枝加桂皮醛组、桂皮醛组、贝那普利组大鼠肌酐、尿素氮水平降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

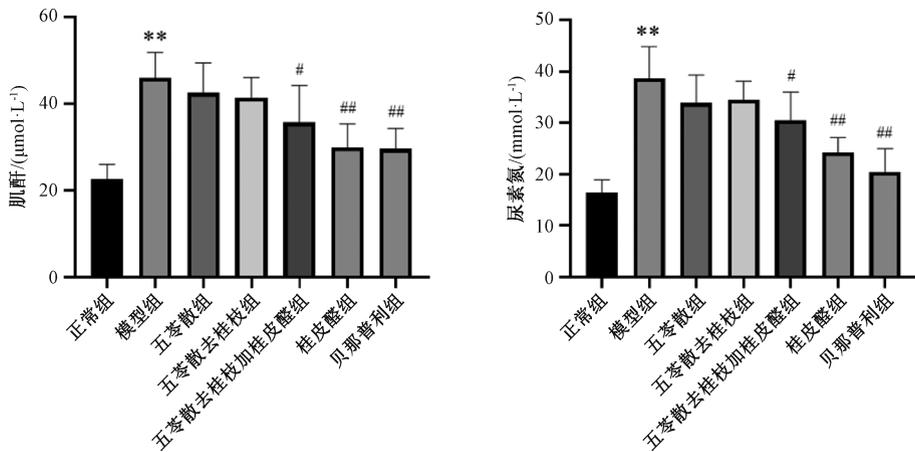
3.3 五苓散对大鼠肾组织 ACE、ACE2、Ang-2 蛋白表达的影响 如图 3 所示, 与正常组比较, 模型组大鼠 ACE、Ang-2 蛋白表达升高 ( $P < 0.01$ ), ACE2 蛋白表达降低 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 五苓散去桂枝加桂皮醛组、桂皮醛组、贝那普利组大鼠 ACE、Ang-2 蛋白表达降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), ACE2 蛋白表达升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

## 4 讨论

肾病综合征在中医上被归为“水肿”“水气”等范畴,

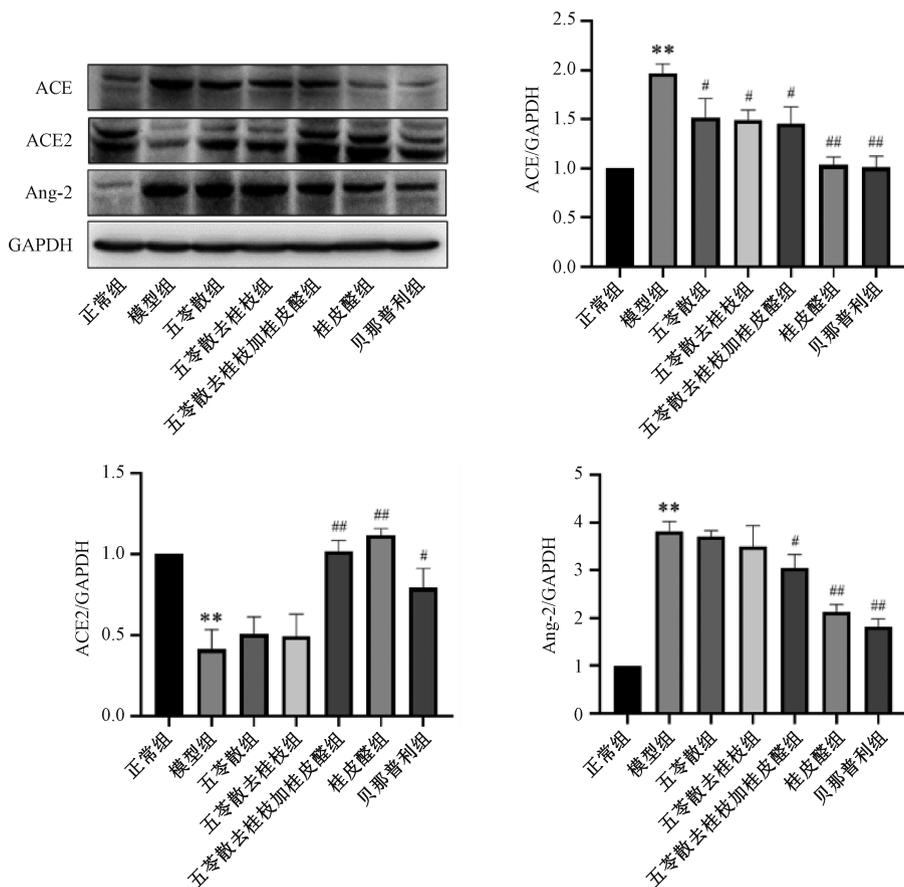
其治疗原则主要应侧重于通阳利水<sup>[14]</sup>。五苓散是治疗阳不化气, 水湿内停之经典方剂, 常用于泌尿系统<sup>[5-6]</sup>、心血管系统<sup>[7]</sup>等疾病的治疗。桂枝是五苓散的“要药”, 桂皮醛是桂枝的重要活性成分。

肾素血管紧张素系统 (RAS) 的主要功能是调节和维持人体血压、水、电解质的平衡, 是参与高血压发病的重要机制<sup>[15]</sup>。血管紧张素转换酶 (ACE) 是 RAS 的关键组成部分, 肝脏释放的血管紧张素原被肾素水解为血管紧张素 1 (Ang-1) 后, 可被 ACE 裂解产生血管紧张素 2 (Ang-2)<sup>[16]</sup>。而 Ang-2 主要有血管收缩、水钠潴留、醛固酮释放等作用<sup>[17-21]</sup>。血管紧张素转化酶 2 (ACE2) 是 ACE 的同源物<sup>[22-23]</sup>, 主要在肾脏血管内皮和肾小管上皮中表达<sup>[24]</sup>, 能



注：与正常组比较，\*\*  $P < 0.01$ ；与模型组比较，#  $P < 0.05$ ，##  $P < 0.01$ 。

图2 各组大鼠肌酐、尿素氮水平比较 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )



注：与正常组比较，\*\*  $P < 0.01$ ；与模型组比较，#  $P < 0.05$ ，##  $P < 0.01$ 。

图3 各组大鼠肾组织 ACE、ACE2、Ang-2 蛋白表达比较 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

减少体内 Ang-2 表达，从而具有内源性 ACE 抑制剂的作用，进而降低血压，减轻肾损伤<sup>[25]</sup>。已有研究表明，阻断 RAS 对肾脏具有保护作用<sup>[26]</sup>。

肾病综合征可导致高血压的发生，而高血压又会进一步造成肾脏损害，两者相互作用，促使疾病不断发展<sup>[27-28]</sup>。蛋白尿是肾病综合征的主要表现，高血压的发生会加重蛋白尿<sup>[29]</sup>。研究表明，RAS 与血压、肾损伤和尿蛋白密切相关，可通过降低血压来减少肾损伤和蛋白尿<sup>[30]</sup>。其中，

Ang-2 是参与疾病发展的主要因素<sup>[31]</sup>。

本实验采用阿霉素成功复制了肾病综合征大鼠模型。研究发现，五苓散去桂枝加桂皮醛、桂皮醛、贝那普利可降低阿霉素肾病综合征大鼠尿蛋白、肌酐、尿素氮含量，降低 ACE、Ang-2 表达，同时使 ACE2 表达升高。但五苓散组及五苓散去桂枝组未见尿蛋白、肌酐、尿素氮水平降低，ACE、Ang-2 表达降低及 ACE2 表达升高。

综上所述，桂皮醛是五苓散发挥抗肾病综合征的主要

活性成分,对阿霉素肾病综合征大鼠有一定的肾脏保护作用,其作用机制可能与RAS信号通路有关。

### 参考文献:

[1] 何开英. 肾病综合征中医治疗研究进展[J]. 亚太传统医药, 2016, 12(1): 44-45.

[2] Aaltonen S, Honkanen E. Outcome of idiopathic membranous nephropathy using targeted stepwise immunosuppressive treatment strategy[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2011, 26(9): 2871-2877.

[3] Eckardt K U, Coresh J, Devuyst O, et al. Evolving importance of kidney disease; from subspecialty to global health burden[J]. *Lancet*, 2013, 382(9887): 158-169.

[4] 张仲景. 伤寒论[M]. 厉 畅, 梁丽娟, 点校. 北京: 中国古籍出版社, 1997: 27.

[5] 何 岚, 王宇生. 五苓散减轻阿霉素肾病大鼠蛋白尿的实验研究[J]. 中成药, 2006, 28(10): 1532-1534.

[6] 韩宇萍, 王宇生, 宓穗卿. 五苓散对阿霉素型肾病综合征大鼠治疗作用的实验研究[J]. 中药新药与临床药理, 2003, 14(4): 223-227.

[7] 李瑾英. 真武汤合五苓散加减治疗阳虚水泛性慢性心力衰竭临床观察[J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2019, 7(14): 179.

[8] 许 源, 宿树兰, 王团结, 等. 桂枝的化学成分与药理活性研究进展[J]. 中药材, 2013, 36(4): 674-678.

[9] Zhang Y, Cao W, Xie Y H, et al. The comparison of  $\alpha$ -bromo-4-chlorocinnamaldehyde and cinnamaldehyde on coxsackie virus B3-induced myocarditis and their mechanisms [J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 14(1): 107-113.

[10] Alvarez-collazo J, Alonso-carbajo L, Lopez-medina A, et al. Cinnamaldehyde inhibits L-type calcium channels in mouse ventricular cardiomyocytes and vascular smooth muscle cells[J]. *Pfluegers Arch*, 2014, 466(11): 2089-2099.

[11] Fang W, Chun H P, Peng Z, et al. Cinnamaldehyde prevents endothelial dysfunction induced by high glucose by activating Nrf2[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 36(1): 315-324.

[12] 陈少丽, 陈德兴, 陈佳靓, 等. 五苓散中桂枝的配伍对水负荷和阳虚模型小鼠利尿水作用的影响[J]. 上海中医药杂志, 2014, 48(1): 78-80; 84.

[13] 张倩霞, 陈少丽, 文小平, 等. 五苓散要药“桂枝”在五苓散对阿霉素肾病大鼠肾脏保护中的作用[J]. 中医杂志, 2019, 60(2): 150-154.

[14] 高燕翔, 张佩青, 张 琪. 张琪教授以“通”为用治疗难治性肾病综合征水肿经验[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2014, 15(8): 663-664.

[15] Kobori H, Nangaku M, Navar L G, et al. The intrarenalrenin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease[J]. *Pharmacol Rev*, 2007, 59(3): 251-287.

[16] Deschepper C F. Angiotensinogen: hormonal regulation and relative importance in the generation of angiotensin II [J].

*Kidney Int*, 1994, 46(6): 1561-1563.

[17] Gray M O, Long C S, Kalinyak J E, et al. Angiotensin II stimulates cardiac myocyte hypertrophy via paracrine release of TGF- $\beta$ 1 and endothelin-1 from fibroblasts[J]. *Cardiovasc Res*, 1998, 40(2): 352-363.

[18] Kaschina E, Unger T. Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function [J]. *Blood Press*, 2003, 12(2): 70-88.

[19] De Carvalho Frimm C, Sun Y, Weber K T. Angiotensin II receptor blockade and myocardial fibrosis of the infarcted rat heart[J]. *J Lab Clin Med*, 1997, 129(4): 439-446.

[20] Hooper N M, Turner A J. An ACE structure [J]. *Nat Struct Biol*, 2003, 10(3): 155-157.

[21] Riordan J F. Angiotensin-I-converting enzyme and its relatives [J]. *Genome Biol*, 2003, 4(8): 225.

[22] Crackower M A, Sarao R, Oudit G Y, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function [J]. *Nature*, 2002, 417(6891): 822-828.

[23] Tipnis S R, Hooper N M, Hyde R, et al. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(43): 33238-33243.

[24] Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9 [J]. *Circ Res*, 2000, 87(5): E1-E9.

[25] Ferrario C M. There is more to discover about angiotensin-converting enzyme [J]. *Hypertension*, 2003, 41(3): 390-391.

[26] Parving H H, Lehnert H, Bröchner-Mortensen J, et al. The effect of irbesartan on the development of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes [J]. *N Engl J Med*, 2001, 345(12): 870-878.

[27] Isobe S, Ohashi N, Fujikura T, et al. Disturbed circadian rhythm of the intrarenal renin-angiotensin system; relevant to nocturnal hypertension and renal damage [J]. *Clin Exp Nephrol*, 2015, 19(2): 231-239.

[28] Isobe S, Ohashi N, Ishigaki S, et al. Augmented circadian rhythm of the intrarenal renin-angiotensin systems in anti-thymocyte serum nephritis rats [J]. *Hypertens Res*, 2016, 39(5): 312-320.

[29] Ohashi N, Isobe S, Ishigaki S, et al. Circadian rhythm of blood pressure and the renin-angiotensin system in the kidney [J]. *Hypertens Res*, 2017, 40(5): 413-422.

[30] Ohashi N, Ishigaki S, Isobe S. The pivotal role of melatonin in ameliorating chronic kidney disease by suppression of the renin-angiotensin system in the kidney [J]. *Hypertens Res*, 2019, 42(6): 761-768.

[31] Takahashi A, Fukusumi Y, Yamazaki M, et al. Angiotensin II type 1 receptor blockade ameliorates proteinuria in puromycin aminonucleoside nephropathy by inhibiting the reduction of NEPH1 and nephrin [J]. *J Nephrol*, 2014, 27(6): 627-634.