

基于“肾脑相济”理论探讨归肾丸对亚急性衰老模型小鼠学习记忆的作用机制

公佩帅^{1,2,3}, 王平^{1,2,3*}

(1. 湖北中医药大学, 武汉 430065; 2. 湖北中医药大学老年医学研究所, 武汉 430065;
3. 湖北中医药大学老年脑健康中医药防护技术与新产品研发教育部工程研究中心, 武汉 430065)

[摘要] 目的:评价归肾丸对D-半乳糖衰老模型小鼠学习记忆能力的影响及探讨中医“肾脑相济”理论在老年记忆减退中的应用。方法:采用KM雄性小鼠颈背部皮下注射D-半乳糖(200 mg·kg⁻¹)构建亚急性衰老模型小鼠,随机分成空白组,模型组,归肾丸高、中、低剂量组(18、9、4.5 g·kg⁻¹·d⁻¹),阳性药组(多奈哌齐 2 mg·kg⁻¹·d⁻¹),选用临床常用治疗阿尔茨海默病的药物多奈哌齐为阳性药组,连续给药4周。通过水迷宫评价模型小鼠的学习记忆能力;采用马松(Masson)染色观察小鼠肾脏纤维化程度;采用苏木素-伊红(HE)染色观察小鼠海马神经元损伤情况;采用尼氏染色观察小鼠海马尼氏体损伤情况;采用免疫荧光观察小鼠海马中克老素蛋白(Klotho)的荧光表达强度;采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小鼠肾脏Klotho蛋白表达情况,检测小鼠海马炎症通路、炎症因子相关信号通路蛋白表达情况。结果:水迷宫结果显示,与空白组比较,模型组小鼠穿越平台次数与目标象限停留时间显著减少($P<0.01$);与模型组比较,归肾丸各剂量组可使模型小鼠潜穿越平台次数与目标象限停留时间显著增加($P<0.01$)。Masson染色结果显示,与空白组比较,模型组胶原容积分数显著增加($P<0.01$);与模型组比较,归肾丸各剂量组使模型组的胶原容积分数显著降低($P<0.01$)。肾脏Western blot显示,与空白组比较,模型组小鼠肾脏Klotho蛋白显著下降($P<0.01$);与模型组比较,归肾丸可显著提升Klotho蛋白($P<0.01$)。神经元细胞数量显示,与空白组比较,模型组神经元数量显著降低($P<0.01$);与模型组比较,归肾丸对神经元细胞的影响呈现递增趋势,显著修复神经元受损细胞($P<0.01$)。免疫荧光结果显示,与空白组比较,模型组小鼠Klotho的阳性表达显著减少($P<0.01$);与模型组比较,归肾丸各剂量组可显著增强Klotho的荧光表达($P<0.01$)。海马Western blot显示,与空白组比较,模型组白细胞介素(IL)-1 β 与IL-6蛋白表达显著升高($P<0.01$);与模型组比较,归肾丸各剂量组的IL-1 β 与IL-6蛋白表达显著降低($P<0.01$)。与空白组比较,模型组磷酸化核转录因子- κ B(p-NF- κ B)蛋白表达显著升高($P<0.01$),Klotho蛋白表达显著降低($P<0.01$);与模型组比较,归肾丸各组p-NF- κ B蛋白表达明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),Klotho蛋白表达显著降低($P<0.01$)。结论:归肾丸有效改善D-半乳糖诱导的衰老模型小鼠,其作用机制可能与上调Klotho浓度,抑制NF- κ B信号通路相关炎症因子有关。

[关键词] 归肾丸; 抗衰老; 克老素蛋白(Klotho); 炎症; 学习记忆

[中图分类号] R289;R259;R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2026)19-0013-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20260109

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20260204.1019.002>

[网络出版日期] 2026-02-04 13:23:36 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>



Deciphering Mechanism of Guishen Wan on Learning and Memory in A Sub-acute Aging Mouse Model via Kidney-brain Axis

GONG Peishuai^{1,2,3}, WANG Ping^{1,2,3*}

(1. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China; 2. Institute of Geriatrics, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China; 3. Hubei University of

[收稿日期] 2025-10-30

[基金项目] 湖北省中央引领地方科技发展项目(2020ZYD021);中医脑健康理论传承创新及应用研究项目(湖北中医药大学2024年度科技创新项目);中医药传承与创新“百千万”人才工程(岐黄工程)——国家中医药领军人才支持计划项目(国中医药人教发[2018]12号)

[第一作者] 公佩帅,在读硕士,从事中医衰老理论及老年病证治规律研究,E-mail:gongpeishuai123@163.com

[通信作者] *王平,博士,二级教授,主任医师,博士生导师,从事中医衰老理论及老年病证治规律研究,E-mail:pwang54@aliyun.com

*Traditional Chinese Medicine Elderly Brain Health Chinese Medicine Protection Technology and
New Product Development Engineering Research Center of Ministry of Education, Wuhan 430065, China)*

[Abstract] **Objective:** To evaluate the Effect of Guishen Wan on learning and memory ability in *D*-galactose-induced aging model mice and to explore the application of the "Kidney-Brain Coordination" theory in traditional Chinese medicine (TCM). **Methods:** An subacute aging mouse model was established by subcutaneous injection of *D*-galactose ($200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) into the neck and back of KM mice. The mice were then administered GuiShen Wan at high, medium, and low doses ($18, 9, 4.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) or donepezil ($2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), a standard clinical therapeutic agent for Alzheimer's disease, served as the positive control in this study, for 4 consecutive weeks. Learning and memory abilities were evaluated using the Morris water maze. The degree of renal fibrosis was observed via Masson staining. Hippocampal neuron injury was assessed by hematoxylin-eosin (HE) staining. Damage to Nissl bodies in the hippocampus was examined using Nissl staining. The fluorescence expression intensity of Klotho in the hippocampus was detected by immunofluorescence. Western blot was used to detect the protein expression of Klotho in the kidneys, as well as proteins related to the hippocampal inflammatory pathway and inflammatory factor-related signaling pathways. **Results:** Results from the water maze test showed that compared with the blank group, the number of platform crossings and the time spent in the target quadrant were significantly decreased in the model group ($P<0.01$). Compared with the model group, all dose groups of Guishen Wan significantly increased the number of platform crossings and the time spent in the target quadrant in model mice ($P<0.01$). Masson staining results showed that compared with the blank group, the collagen volume fraction was significantly increased in the model group ($P<0.01$). Compared with the model group, all dose groups of Guishen Wan significantly reduced the collagen volume fraction in the model group ($P<0.01$). Kidney Western blot analysis showed that compared with the blank group, the Klotho protein was significantly decreased in the model group ($P<0.01$). Compared with the model group, Guishen Wan elevated the klotho protein ($P<0.01$). Neuronal cell count results showed that compared with the blank group, the number of neurons was significantly reduced in the model group ($P<0.01$). Compared with the model group, Guishen Wan exhibited a dose-dependent trend in repairing neuronal damage and increasing the number of neuronal cells ($P<0.01$). Immunofluorescence intensity results showed that compared with the blank group, the positive expression of Klotho was significantly decreased in the model group ($P<0.01$). Compared with the model group, all dose groups of Guishen Wan enhanced Klotho fluorescence expression ($P<0.01$). Hippocampal Western blot analysis showed that compared with the blank group, the ratios of interleukin (IL)- 1β and IL-6 proteins were significantly increased in the model group ($P<0.01$). Compared with the model group, all dose groups of Guishen Wan significantly reduced the ratios of IL- 1β and IL-6 proteins ($P<0.01$). Compared with the blank group, the ratio of phosphorylated-nuclear transcription factor- κB (p-NF- κB) protein was significantly increased ($P<0.01$), while the klotho protein was significantly decreased ($P<0.01$) in the model group. Compared with the model group, all Guishen Wan groups significantly reduced the p-NF- κB protein ($P<0.05, P<0.01$) and significantly increased the Klotho protein ($P<0.01$). **Conclusion:** Guishen Wan effectively ameliorates *D*-galactose-induced aging in model mice. Its mechanism of action may be related to upregulating Klotho concentration and inhibiting inflammatory factors associated with the NF- κB signaling pathway.

[Keywords] Guishen Wan; anti-aging; Klotho; inflammation; learning and memory

近些年,伴随全球老龄化的持续深入,老龄化人口持续增加,养老问题日益凸显。随着衰老(Senescence)进程的加剧,认知及学习能力的下降,成为威胁老龄化人群健康生活的重要病理因素。如轻度认知障碍(MCI)、阿尔茨海默病(AD)为代表的神经退行性疾病,极易在老龄人群中高发,其主要的病理表现就是记忆力衰退、认知功能下降^[1],严重影响老年人的正常生活。

衰老素蛋白(Klotho)作为一种长寿基因,已被证实主要由肾脏的肾小管细胞产生,并在脑、肾系统等慢性疾病研究中广受关注^[2-4]。研究表明,高水平的促炎因子释放往往与认知功能密切相关^[5]。当前有观点认为,Klotho可能通过血脑屏障抑制神经炎症^[6-7],其可能是通过抑制核转录因子- κB (NF- κB)炎症通路激活,减轻炎症因子释放有

关^[8-9]。然而,该机制尚缺乏充分的动物实验研究支持,尚需进一步研究。

中医藏象理论中,“肾”“脑”之间存在着密切的生理和病理联系^[10]。肾被誉为“先天之本”,是人体生长发育之根本^[11]。其内藏先天之精,精可化髓,上充脑窍。《灵枢·经脉》记载:“人始生,先成精,精成而脑髓生。脑主司神志,为“精明之府”,又称“髓海”,《医学入门》云:“脑者髓之海,诸髓皆属于脑,故上至脑,下至尾骶,髓则肾主之。”上述论断表明,肾精是脑髓形成的重要物质基础^[12]。中医学认为,老年认知减退病机多为肾精亏虚^[26]。肾精化生髓,借由脊髓,充养神窍,构成“肾-脑”相通的结构与功能联系^[13]。因此,肾精充足则髓海充盈,神志清晰;肾精不足则髓海空虚,神志不清。该理论揭示了肾与脑的相互依存的生理特点,也为肾脏相关疾病提

供了中医理论支撑。“肾脑相济”理论的提出,不仅从生理上揭示了肾与脑相互依存关系,也从病理上为老年认知减退的辨证论治提供了理论依据^[10]。

归肾丸(Guishen Wan, GSW),出自《景岳全书》,作为“填补真阴”代表方剂。研究表明,其成分均具有延缓衰老、改善学习记忆功效^[14-17],与“肾脑相济”理论相符,在防治健忘延缓衰老中呈现巨大潜力。因此,本研究以“肾脑相济”为理论依据,以归肾丸为干预药物,以具有衰老、神经炎症和学习记忆能力下降等^[18]病理表现的D-半乳糖诱导小鼠为研究载体,旨在探讨“肾脑相济”理论的应用,探究归肾丸对衰老小鼠的学习记忆能力影响及机制作用。

1 材料

1.1 动物 SPF级雄性昆明种(KM)小鼠72只,体重(25±2)g,购自湖北省疾病预防控制中心。生产合格证号SCXY(鄂)2025-0018。动物在湖北中医药大学实验动物中心SPF级环境中常规饲养,小鼠可自由摄食、饮水。饲料、垫料经紫外线照射灭菌处理。动物房温度控制在(24±2)℃,湿度控制在50%~60%,定期更换垫料并及时添加饲料、饮水。

1.2 伦理 本实验获得湖北中医药大学动物实验伦理委员会的批准,动物伦理号HUCMS69900077。

1.3 药品与试剂 归肾丸组成药材:熟地黄、盐菟丝子、茯苓、山萸肉(湖北龚盛堂中药饮片有限公司,批号分别为25091、250401、250201、241101),当归(甘肃盛源益养药业有限公司,批号25090116),山药、枸杞子(安徽守信中药科技有限公司,批号分别为250201、A251001),盐杜仲(湖北聚瑞生物科技有限公司,批号250501)均采购于湖北中医药大学国医堂,经湖北中医药大学游秋云教授鉴定为正品药材。

D-半乳糖(上海源叶生物科技有限公司,纯度≥99%,批号S11050);多奈哌齐(重庆锐恩医药有限公司,批号H20010723,规格5mg);苏木素、酸性品红、十二烷基硫酸钠(SDS)、N,N,N',N'-四甲基乙二胺(TEMED)、过硫酸铵(美国Sigma公司,批号分别为H9627、F8129、151-21-3、110-18-9、A6761);马松(Masson)三色染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,货号G1340);三氯化铁、丽春红S、磷钼酸、苯胺蓝、无水乙醇、二甲苯、冰乙酸、包埋石蜡、中性树胶、伊红Y(水溶性)、盐酸、甲苯胺蓝(国药集团化学试剂有限公司,批号分别为10011918、71033942、20029916、71003644、10009218、10023418、10000218、69019361、10004160、71014544、

10011018、71041284);Klotho抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号bs-2925R);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、白细胞介素(IL)-1β、IL-6、NF-κB p65、磷酸化(p)-NF-κB抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号分别为60004-1-Ig、16806-1-AP、21865-1-AP、80799-1-RR、82335-1-AP);蛋白G磁珠(美国Cell Signaling公司,批号9006S);蛋白质Marker(美国赛默飞世尔科技公司,批号26634);聚偏二氟乙烯(PVDF)转移膜、化学发光试剂(美国Millipore公司,批号分别为IPVH00010、WBKLS0010);聚山梨醇酯20(美国Amresco公司,批号P-1379);放射免疫沉淀法(RIPA)(强)组织细胞快速裂解液、聚氰基丙烯酸正丁酯(BCA)蛋白浓度测定试剂盒(增强型)、磷酸盐缓冲液(PBS)(武汉贝茵莱生物科技有限公司,批号分别为PAB180006、PAB180007、PAB180003)。

1.4 仪器 Mini protean 3 cell型电泳仪(美国Bio-Rad公司);L00686C型快速湿转仪(金斯瑞生物科技股份有限公司);MK3型酶标仪(芬兰雷勃公司);K30型干式恒温器(杭州奥盛仪器有限公司);Centrifuge 5424 R型离心机(德国Eppendorf公司);微量移液枪(美国Rainin PiPet-Lite公司,SPIP-100、SPIP-1000);HI1210型水浴锅、RM2016型病理切片机(德国Leica公司);BCD-196TMZL型冰箱(中国海尔集团公司);Tanon-5200型全自动化学发光分析仪(上海天能科技有限公司);UPT优普特实验室超纯水器(法国MilliPORE公司);JT-12J型电脑生物组织脱水机、JK-6型生物组织摊烤片机(武汉俊杰电子有限公司);R35型切片刀(日本羽毛公司);载玻片及盖玻片(江苏世泰实验器材有限公司);BX53型显微镜(日本Olympus公司)。

2 方法

2.1 归肾丸药液制备 按照《景岳全书》原方处方各药比例,参照2025年版《中华人民共和国药典》中各药用量范围,最终取熟地黄20g、枸杞子15g、盐菟丝子20g、茯苓10g、当归10g、山药20g、盐杜仲10g、山萸肉10g。将药品放入煎药机内,武火煎开调至文火煎煮30min,先后煎煮2次,合并2次药液,依据人体表面积与小鼠体表面积换算,分别将其浓缩成含生药1.8、0.9、0.45g·mL⁻¹的药液,4℃分装保存备用。

2.2 动物分组与给药 将小鼠适应性喂养1周后,实验动物随机分成6组:空白组,模型组,归肾汤低、中、高剂量组,多奈哌齐(阳性)组,每组12只。依据中药药理研究方法学(第2版)大鼠与人用药物剂量折算,

归肾汤高、中、低组药物剂量为18、9、4.5 g·kg⁻¹·d⁻¹。多奈哌齐组给药剂量为2 mg·kg⁻¹。模型组及各给药组小鼠每天皮下注射D-半乳糖200 mg·kg⁻¹,空白组小鼠注射等量的生理盐水,连续造模8周^[19]。造模第5周起,除空白组和模型组外,其余各组每日以相应的给药量进行灌胃给药。空白组与模型组给予等量生理盐水灌胃。

2.3 Morris水迷宫 于第8周开展Morris水迷宫实验对各组小鼠进行行为学检测。评价标准包括各组小鼠在空间探索实验中的目标象限停留时间、穿越平台次数作为学习记忆功能的评价指标^[28]。

2.4 肾脏Masson三色染色观察肾脏组织的病理变化 行为学结束后24 h取材,取左侧小鼠肾脏采用4%多聚甲醛固定,而后进行组织脱水、组织透明、浸蜡、包埋、切片和烤片、脱蜡后进行观察。

2.5 苏木素-伊红(HE)染色观察海马CA1区的病理变化 水迷宫结束后24 h眼球取血,然后脱颈椎处死小鼠,分取左半脑采用4%多聚甲醛固定,后进行组织脱水、组织透明、浸蜡、包埋、切片和烤片、切片脱蜡后进行观察海马CA1区的病理形态学。

2.6 尼氏染色和免疫荧光检测 行为学结束后24 h取材,取左侧小鼠肾脏采用4%多聚甲醛固定,而后进行组织脱水、组织透明、浸蜡、包埋、切片和烤片、切片脱蜡后观察小鼠海马CA1区尼氏体形态结构变化及采用Image J软件统计神经元细胞数量。采用免疫荧光分析Klotho表达强度进行定性与定量分析,观察Klotho蛋白在组织中的定位与分布,实验中所使用的主要抗体及其稀释比例为Klotho抗体(1:500)、GAPDH抗体(1:5 000)。并利用图像分析软件(Image J)计算其荧光强度。

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小鼠海马组织Klotho、NF- κ B、p-NF- κ B通路蛋白表达情况 行为学结束后,取小鼠海马组织,检测Klotho表达水平;取小鼠海马组织,检测Klotho、NF- κ B、p-NF- κ B信号通路蛋白表达情况,并测定炎症因子IL-1 β 、IL-6蛋白表达。将组织从-80℃冰箱取出,加入适量裂解液研磨均匀,并提取蛋白。电泳[(100+180)V,1 h],转膜,用含5%脱脂奶粉的TBST(封闭液)浸泡PVDF膜,室温摇床封闭2 h。孵育一抗(1:500,4℃,3 h),TBST充分洗涤PVDF膜4次,5 min/次,洗去一抗。二抗(1:5 000),室温2 h, TBST充分洗涤PVDF膜5次,5 min/次,洗去二抗。显影后得到条带,并用Image J分析条带灰度值。

2.8 统计学方法 采用SPSS 27.0.1统计学软件进

行统计学分析,数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 归肾丸对亚急性衰老模型小鼠学习记忆功能的影响 水迷宫空间探索实验结果显示,与空白组小鼠比较,模型组小鼠穿越平台次数与目标象限停留时间显著减少($P < 0.01$),该结果表明颈背部皮下注射D-半乳糖使KM雄性小鼠的学习记忆功能受损。与模型组比较,归肾丸低、中、高剂量组可使模型小鼠潜穿越平台次数与目标象限停留时间明显增加($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表1及增强出版附加材料。

表1 归肾丸对亚急性衰老模型小鼠学习记忆功能的影响($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

Table 1 Effect of Guishen Wan on learning and memory function in subacute aging model mice ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

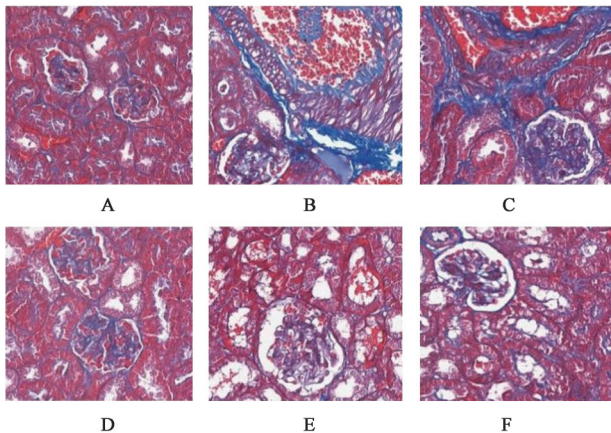
组别	剂量/g·kg ⁻¹	穿越平台次数/次	目标象限停留时间/s
空白组		6.00±1.86	38.99±14.15
模型组		1.42±0.51 ¹⁾	15.20±5.07 ¹⁾
归肾丸低剂量组	4.5	3.17±0.94 ²⁾	29.68±6.93 ²⁾
归肾丸中剂量组	9	3.58±1.00 ³⁾	31.07±11.69 ³⁾
归肾丸高剂量组	18	4.25±1.36 ³⁾	34.05±11.54 ³⁾
多奈哌齐组	0.002	4.50±1.45 ³⁾	33.58±10.22 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表2-表6同)

3.2 归肾丸对亚急性衰老模型小鼠的肾纤维化影响 肾脏Masson染色显示,空白组中仅可在肾小球基底膜和肾小管间质中发现少量胶原纤维;与空白组比较,模型组在上述区域中胶原纤维明显增多且炎症细胞增加;与模型组比较,归肾丸低、中、高剂量组中炎症因子显著减少且胶原纤维减少。见图1。

肾脏胶原容积分数结果显示,与空白组比较,模型组胶原容积分数显著增加($P < 0.01$),可见D-半乳糖可使昆明种小鼠肾脏纤维化程度增加,肾脏呈现衰老状态;与模型组比较,归肾丸低、中、高剂量组的胶原容积分数明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。综上可知,归肾丸可延缓亚急性衰老模型小鼠肾脏纤维化状态。见表2。

3.3 归肾丸对亚急性衰老模型小鼠肾脏Klotho蛋白的表达水平的影响 与空白组比较,模型组小鼠肾脏Klotho蛋白表达显著下降($P < 0.01$);与模型组比较,归肾丸各剂量组可显著提升Klotho蛋白表达($P < 0.01$)。见图2、表3。



注:A.空白组;B.模型组;C.归肾丸低剂量组;D.归肾丸中剂量组;E.归肾丸高剂量组;F.多奈哌齐组(图2-图6同)

图1 归肾丸对亚急性衰老模型小鼠肾纤维化影响(Masson,×400)
Fig. 1 Effect of Guishen Wan on renal fibrosis in subacute aging model mice (Masson,×400)

表2 归肾丸对亚急性衰老模型小鼠肾脏胶原纤维容积分数的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	胶原纤维容积分数/%
空白组		14.93±2.62
模型组		45.07±2.96 ¹⁾
归肾丸低剂量组	4.5	40.93±1.17 ²⁾
归肾丸中剂量组	9	37.42±0.23 ³⁾
归肾丸高剂量组	18	27.04±1.62 ³⁾
多奈哌齐组	0.002	28.81±2.59 ³⁾

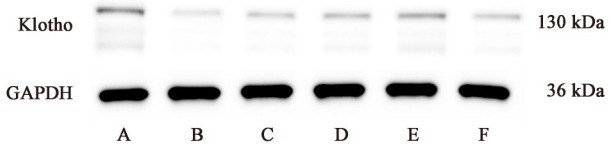


图2 各组小鼠Klotho蛋白表达电泳
Fig. 2 Electrophoresis of expression of Klotho protein in each group of mice

表3 归肾丸对亚急性衰老模型小鼠肾脏Klotho蛋白的表达水平的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Klotho/GAPDH
空白组		1.16±0.10
模型组		0.57±0.07 ¹⁾
归肾丸低剂量组	4.5	0.78±0.06 ³⁾
归肾丸中剂量组	9	0.85±0.04 ³⁾
归肾丸高剂量组	18	1.01±0.04 ³⁾
多奈哌齐组	0.002	0.94±0.02 ³⁾

3.4 归肾丸对亚急性衰老模型小鼠海马组织形态的影响 小鼠海马CA1区HE染色结果所示,与空白组比较,模型组小鼠该区神经细胞排列间隙扩大,出现部分细胞缺失且可见到明显的细胞核固缩、变性或是死亡;与模型组比较,归肾丸各剂量组中,小鼠海马神经细胞排列紧密、形态结构清晰,仅偶见零星变性与死亡细胞。见图3。

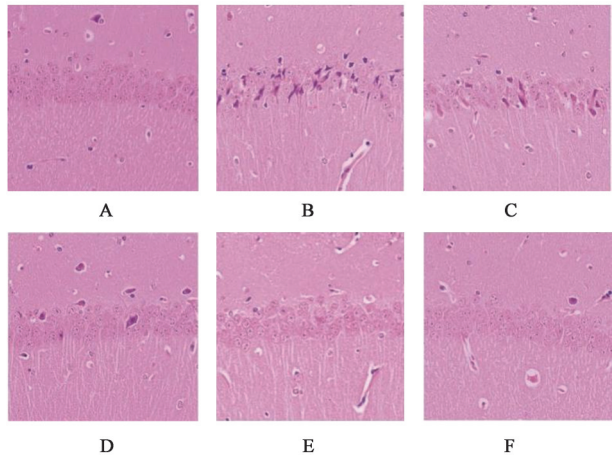


图3 归肾丸对亚急性衰老模型小鼠海马CA1区组织形态的影响(HE,×400)

Fig. 3 Effect of Guishen Wan on tissue morphology of CA1 area in hippocampus of subacute aging model mice (HE,×400)

3.5 归肾丸对亚急性衰老模型小鼠尼氏体的影响 小鼠海马CA1区尼氏染色结果所示,空白组小鼠CA1区神经元细胞排列紧密,细胞结构完整,形态完整,细胞内尼氏体较为丰富,未发生明显固缩现象;与空白组比较,模型组小鼠神经细胞存在排列散乱、细胞间隙变大并可见尼氏体明显减少;与模型组比较,归肾丸低、中、高剂量组小鼠神经细胞排列相对整齐、紧密,尼氏体清晰。见图4。与空白组比较,模型组神经元数量显著降低($P<0.01$),与模型组比较,归肾丸除低剂量组外,中、高剂量组对神经元细胞的影响呈现显著递增趋势($P<0.01$)。见表4。

3.6 归肾丸对亚急性衰老模型小鼠海马CA1区Klotho表达的影响 免疫荧光结果显示,与空白组比较,模型组小鼠海马中的Klotho的阳性表达显著减少($P<0.01$),与模型组比较,归肾丸中、高剂量组的海马神经形态较模型组出现改善,并且Klotho的阳性表达相对增加($P<0.01$)。见图5、表5。

3.7 归肾丸对亚急性衰老模型小鼠脑内IL-1 β 、IL-6及Klotho、NF- κ B蛋白表达的影响

3.7.1 归肾丸对亚急性衰老模型小鼠海马Klotho/NF- κ B信号通路的影响 本实验采用 Western blot

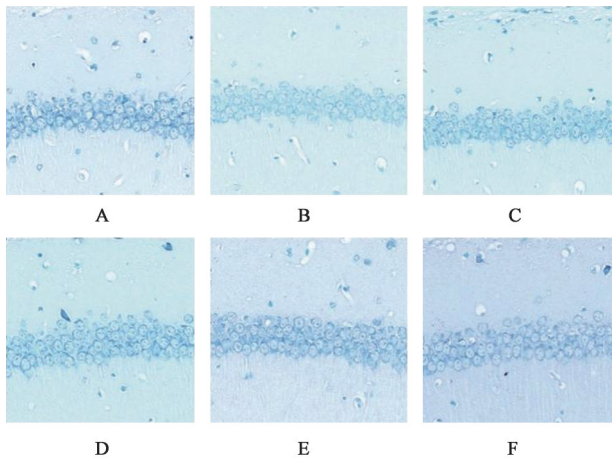


图4 归肾丸对亚急性衰老模型小鼠CA1区尼氏体的影响(尼氏染色,×400)
Fig. 4 Effect of Guishen Wan on Nissl cells in CA1 region of subacute aging model mice (Nissl staining, ×400)

表4 归肾丸对亚急性衰老模型小鼠神经元细胞数量的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	神经元细胞数量/个
空白组		168.67±11.37
模型组		84.67±6.43 ¹⁾
归肾丸低剂量组	4.5	98.00±2.65
归肾丸中剂量组	9	117.00±5.00 ³⁾
归肾丸高剂量组	18	134.33±3.06 ³⁾
多奈哌齐组	0.002	133.00±7.00 ³⁾

检测亚急性衰老模型小鼠海马组织中的炎症通路

表5 归肾丸对亚急性衰老模型小鼠海马CA1区Klotho荧光强度的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 5 Effect of Guishen Wan on Klotho fluorescence intensity in CA1 region in hippocampus of subacute aging model mice ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	荧光强度/%
空白组		29.71±0.80
模型组		13.48±1.97 ¹⁾
归肾丸低剂量组	4.5	17.32±1.08 ³⁾
归肾丸中剂量组	9	21.19±0.39 ³⁾
归肾丸高剂量组	18	24.99±0.60 ³⁾
多奈哌齐组	0.002	26.38±0.40 ³⁾

蛋白NF-κB及其磷酸化蛋白p-NF-κB的表达水平。此外,本实验中p-NF-κB条带灰度变化反映了磷酸化变化程度,可代表NF-κB信号通路的活化程度,灰度比值结果显示,与空白组比较,模型组p-NF-κB显著升高($P<0.01$),Klotho显著降低($P<0.01$);与模型组比较,归肾丸各组p-NF-κB明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),Klotho显著升高($P<0.01$)。见表6、图6。

3.7.2 归肾丸对亚急性衰老模型小鼠海马组织炎症因子IL-1β、IL-6的影响 研究表明,小鼠海马组织中炎症因子IL-1β和IL-6的异常升高,是加速衰老进程及导致老年认知减退的重要病理因素^[32]。Western blot检测亚急性衰老模型小鼠海马内炎症因子的表达。灰度比值结果所示,与空白组比较,模型组IL-1β、IL-6显著升高($P<0.01$);与模型组

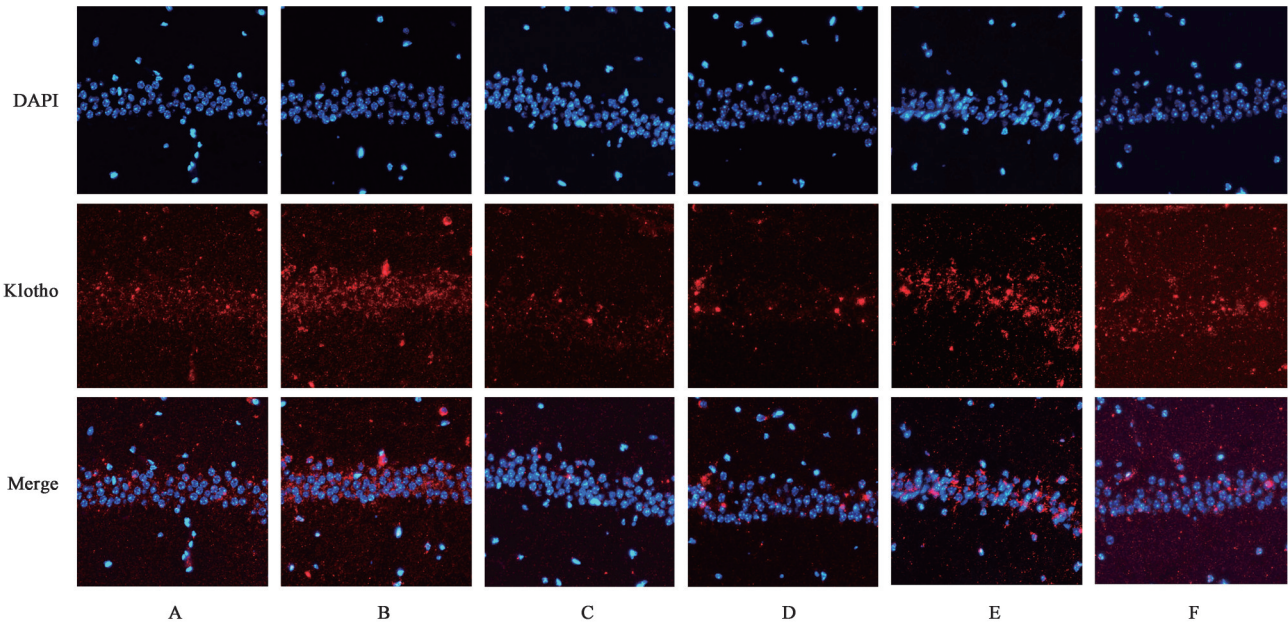


图5 归肾丸对亚急性衰老模型小鼠海马CA1区Klotho表达的影响(免疫荧光,×400)
Fig. 5 Effect of Guishen Wan on expression of Klotho in CA1 region in hippocampus of subacute aging model mice (IF, ×400)

比较,归肾丸各剂量组 IL-1 β 、IL-6 显著降低 ($P<0.01$)。见表 6、图 6。

表 6 归肾丸对亚急性衰老模型小鼠炎症因子蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of Guishen Wan on protetin expression of inflammatory factors in subacute aging model mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Klotho/GAPDH	IL-1 β /GAPDH	IL-6/GAPDH	p-NF- κ B/GAPDH
空白组		0.95 $\pm$ 0.13	0.10 $\pm$ 0.03	0.27 $\pm$ 0.09	0.34 $\pm$ 0.11
模型组		0.54 $\pm$ 0.10 ¹⁾	0.90 $\pm$ 0.05 ¹⁾	1.15 $\pm$ 0.14 ¹⁾	0.75 $\pm$ 0.10 ¹⁾
归肾丸低剂量组	4.5	0.61 $\pm$ 0.04	0.45 $\pm$ 0.05	0.83 $\pm$ 0.09 ³⁾	0.59 $\pm$ 0.07
归肾丸中剂量组	9	0.79 $\pm$ 0.04 ³⁾	0.30 $\pm$ 0.05 ³⁾	0.67 $\pm$ 0.05 ³⁾	0.49 $\pm$ 0.05 ²⁾
归肾丸高剂量组	18	0.96 $\pm$ 0.12 ³⁾	0.15 $\pm$ 0.05 ³⁾	0.55 $\pm$ 0.05 ³⁾	0.47 $\pm$ 0.06 ³⁾
多奈哌齐组	0.002	0.85 $\pm$ 0.07 ³⁾	0.12 $\pm$ 0.04 ³⁾	0.66 $\pm$ 0.05 ³⁾	0.44 $\pm$ 0.02 ³⁾

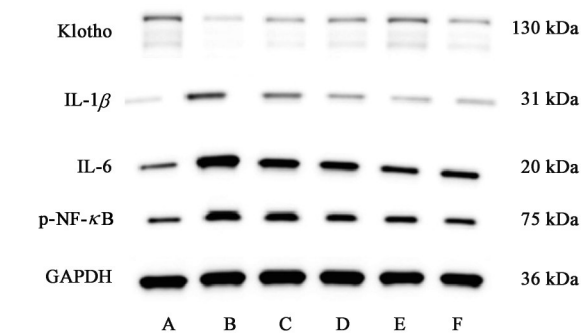


图 6 各组小鼠 Klotho/NF- κ B 炎症信号通路蛋白表达电泳

Fig. 6 Electrophoresis of expression of Klotho/NF- κ B inflammatory signaling pathway proteins in each group of mice

4 讨论

目前为止,慢性、低烈度的神经炎症被普遍认为 是学习、记忆减退的核心机制之一^[27],因此,针对 神经炎症及炎症因子释放为干预手段,是作为治疗 认知障碍的重要策略^[20]。除认知功能外,衰老亦免 疫与炎症密切相关^[31]。炎症学说认为,机体在衰老 过程中,由于免疫力降低,促炎因子与抑炎因子失 衡,致使组织处于慢性炎症浸润内,最终加速器官 衰老^[21]。NF- κ B 信号通路作为大脑参与神经炎症 的经典通路,在神经系统中表达广泛,病理状态下, 可引发 IL-1 β 、IL-6 等炎性介质过度释放,引起炎症 细胞浸润并导致 NF- κ B 信号通路激活,并在 B 细胞、T 细胞、巨噬细胞和多形核白细胞(PMLs)介导 的免疫与炎症反应中发挥关键作用^[8]。因此,抑制 NF- κ B 信号通路被认为是干预年龄相关的疾病发展的 关键机制^[25]。

Klotho 基因于 1997 年由日本学者 Kuro-o 首先 发现,已被多项研究证明其与衰老密切相关,且伴 随年龄增长可呈现下降趋势。在剔除 Klotho 基因 的小鼠模型中,呈现出明显的神经退行性表现^[22]与 肾脏纤维化^[29]。在抗炎机制方面,研究认为成纤维 细胞生长因子(FGF)23 与 Klotho 及其受体 FGFR1c

形成三元复合物以行使功能。其中,Klotho 分别通 过其 D3 结构域和 C 末端连接 FGFR1c 与 FGF23,充 当了不可或缺分子桥梁^[23]。在 NF- κ B 信号通路 的调控中,Klotho 扮演着关键的拮抗角色:与 FGF23 激活该通路、促进炎症相反,Klotho 能有效抑制 NF- κ B 的核移位及其转录活性,从而发挥其强大的抗炎 与延缓细胞衰老的作用^[9,24]。本实验研究表明,归 肾丸可通过加强 D-半乳糖诱导的衰老模型小鼠肾脏 与海马中 Klotho 的表达水平,降低 NF- κ B 与 p- NF- κ B 的表达水平;同时抑制 IL-1 β 、IL-6 促炎因子 的释放。这些结果从分子层面揭示了归肾丸可通 过调控 Klotho/NF- κ B 信号通路缓解神经炎症的潜 在机制,体现了中药复方“异病同治”^[30]、多途径与 多靶点的治疗优势。

归肾丸作为张景岳《景岳全书》中的经典方剂, 针对肾精亏虚虚损之证而设。方中君药熟地黄,填 精益髓,滋肾益阴。现代研究表明,其具有改善学 习记忆能力衰退,延缓衰老的功效^[15]。与中医理论 认为认知障碍的病机多由“肾精亏虚”的认识高度 契合。以杜仲、山药、菟丝子、枸杞子、山萸肉为臣。 杜仲,盐炒后助其下行,结合菟丝子滋阴收涩,山茱 萸固阴阳互生,激活元阳气化升腾,助熟地黄补肾 精化髓,为充养髓海提供物质基础^[33];枸杞子平补 阴阳,山药健脾补后天,补肾固先天,体现方剂“引 精归藏”特点。茯苓、当归为佐。熟地黄性滋腻,老 龄人群本就运化功能衰弱,易致湿气困阻中焦,茯 苓健脾利湿。当归为补血要药,活血补血,促进精 血互化,上养脑窍。诸药相合,共奏益精填髓、醒神 明智功效,是“肾脑相济”理论的具体应用。

综上所述,本研究已初步证实,归肾丸可通过 延缓小鼠肾脏纤维化程度,上调 Klotho 表达,抑制 NF- κ B 信号通路的激活与下游炎症因子释放。从现 代医学角度,初步验证了“异病同治”理论的合理

性,从动物实验角度,为“肾脑相济”的应用提供了动物实验支持。后续研究,课题组将深入研究归肾丸中可组成药物的活性成分,以期系统性阐述该复方在防治衰老认知衰退的机制。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 世界中医药学会联合会. 中医药干预衰老专家共识[J]. 世界中医药, 2025, 20(15): 2602-2610.
World Federation of Chinese Medicine Societies. Expert consensus on the intervention of traditional Chinese medicine in aging[J]. World Chin Med, 2025, 20(15): 2602-2610.
- [2] ZHANG L, LIU T. Clinical implication of alterations in serum Klotho levels in patients with type 2 diabetes mellitus and its associated complications[J]. J Diabetes Complications, 2018, 32(10): 922-930.
- [3] MASSÓ A, SÁNCHEZ A, BOSCH A, et al. Secreted α Klotho isoform protects against age-dependent memory deficits[J]. Mol Psychiatry, 2018, 23(9): 1937-1947.
- [4] OLEJNIK A, FRANCAZAK A, KRZYWONOS-ZAWADZKA A, et al. The biological role of Klotho protein in the development of cardiovascular diseases[J]. Biomed Res Int, 2018, 39(3): 87-89.
- [5] D'AVILA J C, SIQUEIRA L D, MAZERAUD A, et al. Age-related cognitive impairment is associated with long-term neuroinflammation and oxidative stress in a mouse model of episodic systemic inflammation[J]. J Neuroinflamm, 2018, 15(1): 28.
- [6] ABDELFAHATTAH A, HUGHES-DAVIES A, CLAYFIELD L, et al. Gata2 haploinsufficiency promotes proliferation and functional decline of hematopoietic stem cells with myeloid bias during senescence[J]. Blood Adv, 2021, 5(20): 4285-4290.
- [7] KAWATA K, SUZUKI T, OZAWA K, et al. Features of T-cell subset composition in a D-galactose-induced senescence mouse model[J]. Exp Anim, 2021, 70(3): 284-292.
- [8] BUENDÍA P, CARRACEDO J, SORIANO S, et al. Klotho prevents NF- κ B translocation and protects endothelial cell from senescence induced by uremia[J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2015, 70(10): 1198-1209.
- [9] BUENDÍA P, RAMÍREZ R, ALJAMA P, et al. Klotho prevents translocation of NF- κ B[J]. Vitam Horm, 2016, 101: 119-150.
- [10] 付夜平, 杨芳, 胡楠, 等. 基于“肾脑相济”理论的骨质疏松症与阿尔茨海默病相关性探析[J]. 辽宁中医杂志, 2025, doi: 21. 1128. R. 20250805. 1652. 020.
FU Y P, YANG F, HU N, et al. An analysis of the correlation between osteoporosis and Alzheimer's disease based on the theory of "kidney brain coordination"[J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2025, doi: 21. 1128. R. 20250805. 1652. 020
- [11] 付寒雪, 黄文玲. 金哲从肝肾论治卵巢储备功能下降的经验

- [J]. 江苏中医药, 2021, 53(12): 19-21.
- FU X H, HUANG W L. Professor Jin Zhe's experience in treating diminished ovarian reserve from the perspective of liver and kidney[J]. Jiangsu J Tradit Chin Med, 2021, 53(12): 19-21.
- [12] 张喜莲, 唐温, 马融. 马融教授“从肾论治”小儿脑病学术思想研究[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(12): 2237-2242.
ZHANG X L, TANG W, MA R. Research on professor MA Rong's academic thought of "treating children encephalopathy from kidney"[J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2010, 25(12): 2237-2242.
- [13] 陈森林, 王志晨, 陈耿钊, 等. 基于“肾脑相济”理论探讨慢性肾脏病对阿尔茨海默病的因果影响及防治[J]. 中国中药杂志, 2025, 50(12): 3431-3440.
CHEN S L, WANG Z C, CHEN G Z, et al. Causal effect of chronic kidney disease on Alzheimer's disease and its prevention based on "kidney-brain interaction" theory[J]. China J Chin Mater Med, 2025, 50(12): 3431-3440.
- [14] 李美霖, 王平, 尹灿, 等. 山茱萸多糖延缓秀丽隐杆线虫衰老的药效评价及机制研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(21): 6996-7003.
LI M L, WANG P, YIN C, et al. Pharmacodynamic evaluation and mechanism study of *Cornus officinalis* polysaccharide in delaying aging in *Caenorhabditis elegans* [J]. J Food Saf Qual, 2022, 13(21): 6996-7003.
- [15] 严斐霞, 谢永艳, 陈畅, 等. 熟地黄炮制过程中的化学成分变化和药理作用研究进展[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(10): 2493-2495.
YAN F X, XIE Y Y, CHEN C, et al. Research progress on chemical composition changes and pharmacological effect during the processing of *Rehmanniae Praeparata* [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2021, 32(10): 2493-2495.
- [16] 刘泽坤, 贺小芳, 洪颖, 等. 山药多糖延缓秀丽隐杆线虫衰老的药效评价及作用机制研究[J]. 世界中医药, 2024, 19(4): 473-480.
LIU Z K, HE X F, HONG Y, et al. Pharmacodynamic evaluation and mechanism of Chinese Yam polysaccharides in delaying senescence of *Caenorhabditis elegans* [J]. World Chin Med, 2024, 19(4): 473-480.
- [17] OLIVEIRA P J A D, SILVA M R A D, HELENA S D, et al. Unveiling the role of inflammation and oxidative stress on age-related cardiovascular diseases[J]. Oxidative Med Cell Longev, 2020, doi: 10. 1155/2020/1954398.
- [18] FULOP T, LARBI A, PAWELEC G, et al. Immunology of aging: The birth of inflammaging [J]. Clin Rev Allerg Immunol, 2021, 4(2): 1-14.
- [19] CAO Y, ZHANG Y, JIA Z, et al. Theaflavin-3, 3'-digallate ameliorates learning and memory impairments in mice with premature brain aging induced by D-galactose [J]. Physiol Behav, 2023, 261: 11407.
- [20] CHENG J, DONG Y, MA J, et al. Microglial Calhm2 regulates neuroinflammation and contributes to Alzheimer's

- disease pathology[J]. Sci Adv, 2021, 7(35): eabe3600.
- [21] CESARI M, PENNINX B W, PAHOR M, et al. Inflammatory markers and physical performance in older persons: The InCHIANTI study[J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2004, 59(3): 242-248.
- [22] TEOCCHI M A, FERREIRA A, DA LU D O E P, et al. Hippocampal gene expression dysregulation of Klotho, nuclear factor kappa B and tumor necrosis factor in temporal lobe epilepsy patients[J]. J Neuroinflamm, 2013, 10: 53.
- [23] CHEN G, LIU Y, GOETZ R, et al. *alpha*-Klotho is a non-enzymatic molecular scaffold for FGF23 hormone signalling [J]. Nature, 2018, 553(7689): 461-466.
- [24] GUO L W, WANG Y K, LI S J, et al. Elevated fibroblast growth factor 23 impairs endothelial function through the NF- κ B signaling pathway[J]. J Atheroscler Thromb, 2023, 30(2): 138-149.
- [25] HAGA M, OKADA M. Systems approaches to investigate the role of NF- κ B signaling in aging[J]. Biochem J, 2022, 479(2): 161-183.
- [26] 衡先培, 杨柳清. 中医内科临床诊疗指南·老年衰弱(制定)[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(8): 4030-4035.
- HENG X P, YANG L Q. Guide to clinical diagnosis and treatment of traditional Chinese medicine: Frailty in older adults (Development) [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2020, 35(8): 4030-4035.
- [27] WOODBURN S C, BOLLINGER J L, WOHLER E S. The semantics of microglia activation: Neuroinflammation, homeostasis, and stress [J]. J Neuroinflamm, 2021, 18(1): 258.
- [28] 周娇娇, 阙建宇, 于雯雯, 等. Morris水迷宫检测动物学习记忆水平的方法学[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(24): 6274-6277.
- ZHOU J J, QUE J Y, YU W W, et al. Methodology of the Morris water maze for assessing animal learning and memory [J]. Chin J Gerontol, 2017, 37(24): 6274-6277.
- [29] 张娴静, 陈素贞. 中药防治糖尿病肾病肾纤维化的作用机制及治疗进展[J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2026, 46(1): 90-99.
- ZHANG X J, CHEN S Z. Mechanisms and therapeutic progress of Chinese materia medica in the prevention and treatment of renal fibrosis in diabetic nephropathy [J]. J Shanghai Jiao Tong Univ: Med Sci, 2026, 46(1): 90-99.
- [30] 吕淑怡, 王新志, 陈晓阳, 等. 基于“肝-脾-肾”轴探讨抑郁症与阿尔茨海默病“异病同治”作用机制及中药干预进展[J]. 中国中药杂志, 2026, 51(10): 2726-2738.
- LV S Y, WANG X Z, CHEN X Y, et al. Exploring the mechanism of "treating different diseases with the same method" for depression and Alzheimer's disease based on the "liver-spleen-kidney" axis and advances in traditional Chinese medicine intervention[J]. China J Chin Mater Med, 2026, 51(10): 2726-2738.
- [31] 杨善岚, 吴磊, 涂嘉欣, 等. 自由基致衰老的研究进展[J]. 中华疾病控制杂志, 2022, 26(05): 589-594.
- YANG S L, WU L, TU J X, et al. Research progress of free radical induced aging[J]. Chin J Dis Control Prev, 2022, 26(5): 589-594.
- [32] 陈靖, 韩兆丰, 付彦君, 等. 经方小柴胡汤化裁方对阿尔茨海默病小鼠海马组织细胞炎症因子 IL-1 β , IL-6 及 p-p38 MARK、NF- κ B 表达水平的影响[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(12): 217-220, 299.
- CHEN J, HAN Z F, FU Y J, et al. Effect of Xiaochaihu decoction on expressions of IL-1 β , IL-6, p-p38 MARK and NF- κ B in hippocampus of Alzheimer's disease mice[J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2020, 38(12): 217-220, 299.
- [33] 李林, 魏海峰, 张兰, 等. 中医“肾生髓, 脑为髓海”现代生物学基础探讨[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(17): 1397-1400, 1417.
- LI L, WEI H F, ZHANG L, et al. Modern biological basis of Chinese medical theory that "kidney nourishes marrow and brain is sea of marrow"[J]. China J Chin Mater Med, 2006, 31(17): 1397-1400, 1417.

[责任编辑 周冰冰]