

右归丸含药血清通过调控 *miR-125b-1-3p/UQCRB* 表达对 H_2O_2 诱导衰老细胞线粒体能量代谢的影响

鲁 莎， 谭从娥*
(陕西中医药大学基础医学院, 陕西 咸阳 712046)

摘要: **目的** 探讨右归丸含药血清对过氧化氢 (H_2O_2) 诱导衰老细胞线粒体能量代谢的影响。**方法** 原代培养大鼠肾小管上皮细胞 (NRK-52E), 并将细胞分为①空白组、模型组、空白血清组、含药血清组; ②miR-125b-1-3p-mimic-NC 组、miR-125b-1-3p-mimic 组、miR-125b-1-3p-inhibitor-NC 组、miR-125b-1-3p-inhibitor 组; ③空白血清组、含药血清+miR-125b-1-3p-NC 组、含药血清+miR-125b-1-3p-mimic 组、含药血清+miR-125b-1-3p-inhibitor 组, 采用双荧光素酶报告基因实验确定 *miR-125b-1-3p* 对 *UQCRB* 的靶向调控关系。然后采用 H_2O_2 诱导大鼠肾小管上皮细胞 (NRK-52E) 发生衰老, 并给予右归丸含药血清干预, 通过 β -半乳糖苷酶染色法检验细胞发生衰老情况, Western blot 法检测衰老相关蛋白 (P16、P21) 表达, 以此确证细胞发生衰老。进而采用脂质体转染技术, 转染 *miR-125b-1-3p-mimic/nhibitor* 进入细胞, 再用 qPCR 法检测细胞 *miR-125b-1-3p*、*UQCRB* mRNA 表达及线粒体 DNA 拷贝数 (mtDNA) 变化, 透射电镜观察肾脏线粒体超微结构, JC-1 荧光探针法检测线粒体膜电位, DCFH-DA 法检测细胞内活性氧 (ROS) 水平, 试剂盒检测线粒体三磷酸腺苷 (ATP) 水平。**结果** 双荧光素酶报告基因实验证实 *UQCRB* 是 *miR-125b-1-3p* 的直接作用靶点。与空白组比较, 模型组 β -半乳糖苷酶染色阳性细胞率升高和衰老相关蛋白 (P16 和 P21) 表达升高, 检测结果均确认 H_2O_2 诱导衰老细胞模型成功。与空白组比较, 模型组 ROS 水平升高 ($P<0.01$), 线粒体膜电位、mtDNA、ATP 水平和 *UQCRB* 表达均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$); 与模型组比较, 右归丸含药血清组 ROS 水平降低 ($P<0.01$), 线粒体膜电位、mtDNA、ATP 水平和 *UQCRB* 表达均升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。与 miR-125b-1-3p-mimic-NC 组比较, miR-125b-1-3p-mimic 组线粒体 ATP、mtDNA、线粒体膜电位水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), ROS 水平升高 ($P<0.01$); 与 miR-125b-1-3p-inhibitor-NC 组比较, miR-125b-1-3p-inhibitor 组线粒体 ATP、mtDNA、线粒体膜电位水平升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), ROS 水平降低 ($P<0.01$)。**结论** 右归丸可改善衰老细胞的线粒体能量代谢水平, 其作用机制可能与抑制 *miR-125b-1-3p* 表达从而上调 *UQCRB* 表达量有关。

关键词: 右归丸; 细胞衰老; *miR-125b-1-3p*; *UQCRB*; 线粒体能量代谢

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2025)12-4161-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.12.044

细胞衰老是指细胞进入稳定的周期停滞状态, 细胞在这种状态下的生理功能逐渐发生衰退直至细胞死亡^[1]。细胞衰老可由多种因素触发, 如 DNA 损伤、线粒体功能障碍、高氧等^[2]。细胞衰老是造成多种增龄相关疾病如骨质疏松症、癌症、2 型糖尿病等的重要原因之一, 因此消除衰老细胞是缓解或治疗这些疾病的有效方法^[3-4]。研究发现, 通过减少线粒体活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的产生, 可以减缓端粒缩短的速度, 延长培养细胞的寿命, 提示线粒体途径可能是一个消除细胞衰老的有效方法^[5]。近年来, 补肾中药在缓解衰老或治疗衰老相关疾病方面发挥了巨大作用, 右归丸是代表方剂之一。课题组前期研究发现, 右归丸可明显改善肾损伤模型大鼠的线粒体功能^[6]。由此推断, 右归丸可能对衰老肾皮质细胞的线粒体

损伤也具有修复作用, 其作用机制可能与线粒体基因的转录后调控作用有关。

miRNAs 为长度约 22nt 的内源性非编码 RNA, 通过 3' UTR 碱基互补配对介导靶 mRNA 降解或翻译阻滞, 实现转录后基因表达调控^[7], 可作为疾病治疗的潜在靶点。前期研究发现, *miR-125b-1-3p* 和 *UQCRB* 均在右归丸干预后显著表达^[6], 且根据生物信息学预测结果, 二者呈靶向调控关系, 提示右归丸对衰老细胞线粒体损伤的修复作用可能与 *miR-125b-1-3p* 对 *UQCRB* 的靶向调控作用有关。因此, 本实验选择 H_2O_2 诱导的衰老 NRK-52E 细胞模型^[8], 通过细胞转染技术过表达或抑制 *miR-125b-1-3p* 表达, 观察右归丸含药血清对衰老细胞线粒体功能及 *UQCRB* 表达的影响, 探讨对衰老细胞线粒体损伤的修复作用及其分子机制。

收稿日期: 2025-04-20
基金项目: 国家自然科学基金项目 (81973754); 陕西省科技厅自然科学基金基础研究计划 (2025JC-YBMS-892)
作者简介: 鲁 莎 (1993—), 女, 硕士生, 从事中医证候物质基础研究。Tel: 18089251402, E-mail: 744385057@qq.com
* 通信作者: 谭从娥 (1972—), 女, 博士, 教授, 从事脏腑病机及其证治规律研究。Tel: 15829806999, E-mail: tanzime@163.com

1 材料

1.1 仪器 透射电镜（日本 HITACHI 公司）；电热恒温鼓风干燥箱（上海精宏实验设备有限公司）；组织研磨器（上海净信实业发展有限公司）；FlexStation 3 多功能酶标仪（美国 Molecular Devices 公司）；倒置显微镜（广州明美光电技术有限公司）；PCR 仪（东胜创新生物科技有限公司）；流式细胞仪（美国 Beckman 公司）；低速离心机（可成科技股份有限公司）。

1.2 药物与试剂 右归丸（主要由熟地黄、炮附片、肉桂、山药、酒萸肉、菟丝子、鹿角胶、枸杞子、当归、盐杜仲组成）购自北京同仁堂股份有限公司，9 g/丸，批号 22010212。CCK8 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒（美国 MedChemExpress 公司，批号 HY-K0301）；lipofectamine2000（美国 Invitrogen 公司，批号 11668-019）；线粒体膜电位检测试剂盒、ATP 检测试剂盒、细胞 ROS 检测试剂盒、双荧光素酶报告基因检测试剂盒（上海碧云天生物技术股份有限公司，批号 C2006、S0026、S0033S、RG027）；HiScript® II Q Select RT SuperMix for qPCR、SYBR Green Master Mix（南京诺唯赞生物科技股份有限公司，批号 R233、Q111-02）；Trizol 试剂（美国 Ambion 公司，批号 15596-026）；戊二醛（美国 Alfa Aesar 公司，批号 A17876）；硝酸铅（美国 SPI-CHEN 公司，批号 10088-74-8）；miR-125b-1-3p mimics/inhibitor [金拓思（武汉）生物科技有限公司]。

1.3 细胞株和动物 大鼠肾小管上皮细胞（NRK-52E）购自武汉普诺赛生命科技有限公司。8 只 SPF 级 SD 雄性大鼠，体质量（250~300）g，购自湖北省实验动物研究中心 [实验动物生产许可证号 SCXK（鄂）2020-0018]，适应性饲养 7 d，动物实验内容已通过陕西中医药大学实验动物伦理委员会审核（伦理号 SUCMDL20220311001）。

2 方法

2.1 细胞分组 实验分 3 个部分：（1）为了确定右归丸含药血清是否对 H₂O₂ 诱导衰老 NRK-52E 细胞的线粒体能量代谢具有改善作用，将 NRK-52E 细胞分为空白组、模型组、空白血清组、右归丸含药血清组（简称为含药血清组）；（2）为了验证 miR-125b-1-3p/UQCRB 对细胞线粒体功能是否存在调控作用，将 NRK-52E 细胞分为 miR-125b-1-3p-mimic-NC 组（简称 mimic-NC 组）、miR-125b-1-3p-mimic 组（简称 mimic 组）、miR-125b-1-3p-inhibitor-NC 组（简称 inhibitor-NC 组）、miR-125b-1-3p-inhibitor 组（简称 inhibitor 组）；（3）为了探究右归丸含药血清对衰老细胞 UQCRB 的调控作用是否与 miR-125b-1-3p 水平相关，将 H₂O₂ 诱导衰老细胞分为空白血清组、H₂O₂ + 含药血清 + miR-125b-1-3p-NC 组（简称含药血清 + NC 组）、H₂O₂ + 含药血清 + miR-125b-1-3p-mimic 组（简称含药血清 + mimic 组）、H₂O₂ + 含药血清 + miR-125b-1-3p-inhibitor 组（简称含药血清 + inhibitor 组）。

2.2 细胞培养与转染 NRK-52E 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基，于 37 ℃、5% CO₂ 条件下培养。取对数

生长期的细胞，按照 Lipofectamine TM 2000 转染试剂说明书方法严格操作，将 miR-125b-1-3p-mimic-NC、miR-125b-1-3p-mimic、miR-125b-1-3p-inhibitor-NC、miR-125b-1-3p-inhibitor 分别转染至各组细胞中，转染 72 h 后，通过荧光显微成像系统评估转染率，若视野内 80% 以上细胞携带绿色荧光，荧光较强且稳定，则视为有效转染。收集符合标准的转染细胞，于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养，6 h 后吸出混合液换入正常培养基，继续于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。

2.3 H₂O₂ 诱导衰老细胞模型的建立 取“2.2”项下各组细胞，按每孔 5×10⁵ 个的密度接种于 6 孔板，于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱培养 24 h；吸弃培养液，模型组、空白血清组、含药血清组、含药血清 + NC 组、含药血清 + mimic 组、含药血清 + inhibitor 组分别加入终浓度 200 μmol/L 的 H₂O₂，培养 24 h，建立衰老细胞模型；其余处理组不加 H₂O₂，培养 24 h。

2.4 右归丸含药血清制备及细胞给药 称取右归丸 10 g，以 0.9% 氯化钠注射液溶解至给药质量浓度为 0.5 g/mL。将 8 只大鼠随机分为右归丸含药血清组（6 只）和空白血清组（2 只）。所有大鼠常规饲养 7 d 后开始给药，含药血清组灌胃给予右归丸混悬液 17 mL/kg（给药质量浓度参照实验动物学用药剂量换算^[9]），空白组灌胃给予等体积蒸馏水，每天 1 次，连续 7 d。于末次给药 1 h 后，大鼠麻醉后在无菌条件下腹主动脉插管取血，全血室温静置 1 h，在 2~8 ℃、1 000×g 条件下离心 20 min，取上清，即血清，56 ℃灭活 30 min，0.22 μm 滤膜过滤除菌后分装，于 -20 ℃冰箱保存备用。

取处于对数生长期的 NRK-52E 细胞，以 5×10⁵ 个/孔的密度接种于 6 孔板，37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养过夜后，空白血清组加入 10% 空白血清，其余各组加入 10% 右归丸含药血清^[10]，继续培养 24 h 后，留待检测。

2.5 Western blot 法检测衰老相关蛋白（P16、P21）表达 收集各组 NRK-52E 细胞，加入含有 10% PMSF 的 RIPA 裂解液，在 4 ℃、12 000 r/min 条件下离心 5 min 后取上清，使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度，加入 SDS 蛋白上样缓冲液，在沸水中水浴加热 10 min 进行变性。蛋白上样，SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白，转移到 PVDF 膜上，用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 2 h，加入 P16、P21、GAPDH 抗体 4 ℃孵育过夜，TBST 洗膜后，加入二抗室温孵育 2 h，通过 Image pro plus 软件分析胶片灰度值，实验重复 3 次。

2.6 衰老相关 β-半乳糖苷酶（SA-β-gal）染色 吸除各组细胞培养液，细胞用 PBS 洗涤 2 次，加入 1 mL β-半乳糖苷酶（SA-β-gal）染色固定液，室温固定 15 min，弃去固定液，PBS 洗涤 3 次，每孔加入 1 mL β-gal 染色工作液，37 ℃孵育过夜，于光学显微镜下观察细胞染色情况。

2.7 RT-qPCR 法检测 UQCRB mRNA 表达 使用 Trizol 法提取 RNA，分离得到的 RNA 按照 HiScript® II Q Select RT SuperMix for qPCR（VAZYME）试剂盒说明书操作，逆转

录成 cDNA，然后按照 SYBR Green Master Mix（VAZYMED）试剂盒说明书进行 PCR 扩增反应，反应程序为 95℃，30 s，1 个循环；95℃ 10 s，60℃ 30 s，40 个循环。内参基因为 GAPDH，引物由北京擎科生物科技股份有限公司合成，序列见表 1。采用 2^{-ΔΔCT} 法计算 UQCRR mRNA 相对表达表达。

表 1 引物序列	
基因	引物序列(5'→3')
β-actin	正向 AGTGTGACGTTGACATCCGTA
	反向 CCAGAGCAGTAATCTCCTTCT
ND1	正向 CGCCTGACCAATAGCCATAA
	反向 ATTCGACGTTAAAGCCTGAGA
GAPDH	正向 TCAAGAAGGTGCTGAAGCAGG
	反向 TCAAAGGTGGAGGACTGGGT
UQCRR	正向 ACTGGGGTTAATGCGAGATG
	反向 TCACCTCTTCGCCCACTCTT

2.8 双荧光素酶报告基因实验 使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒检测萤火虫和海肾的荧光素酶活性，并测定转染 24 h 后的相对荧光素酶单位（RLU）值。

2.9 线粒体功能检测

2.9.1 线粒体超微结构 收集各组细胞，PBS 洗涤 6 次，用 2.5%戊二醛固定 4 h 后，1 000 r/min 离心沉降细胞后，更换新鲜的 2.5%戊二醛于 4℃下固定 4 h。样本用含 1%锇酸和 0.1 mol/L 磷酸缓冲液（pH 7.4）于室温条件下固定 2 h，依次用 50%、70%、80%、90%、95%、100%乙醇脱

水，每次 15 min。60℃聚合 8 h，60~80 nm 切片，铅铅双染色后于透射电镜观察下各组细胞线粒体超微结构变化。

2.9.2 线粒体膜电位 NRK-52E 细胞用胰蛋白酶消化后，重悬于含血清和酚红的细胞培养液中，然后加入 JC-1 染色工作液，37℃孵育 20 min，1 200 r/min 离心 4 min，弃上清，加入 JC-1 染色缓冲液，流式细胞仪上机分析，通过检测红/绿荧光强度的比值分析线粒体膜电位的极化状态。

2.9.3 细胞活性氧（ROS）水平 NRK-52E 细胞用胰蛋白酶消化后，用含 DCFH-DA 的无血清培养液 37℃孵育 20 min，1 200 r/min 离心 5 min，弃上清，加 PBS 重悬，流式细胞仪上机检测分析。

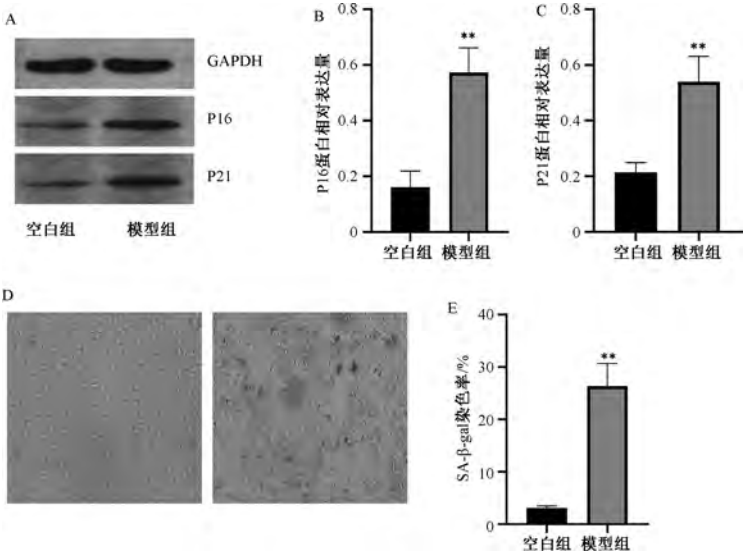
2.9.4 线粒体 ATP 水平 细胞裂解后，4℃、12 000 r/min离心 5 min，取上清，按照 ATP 检测试剂盒说明书操作。

2.9.5 线粒体 DNA（mtDNA）表达 按照“2.7”项下方法，通过实时定量 PCR 法进行检测，内参基因为 β-actin，引物序列见表 1。

2.10 统计学分析 通过 GraphdPad Prism 9 软件进行处理，实验数据以平均数±标准差（ $\bar{x}\pm s$ ）表示，2 组之间比较采用非配对 t 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 H₂O₂ 诱导 NRK-52E 细胞发生衰老 与空白组比较，模型组 P16 和 P21 蛋白表达升高（P<0.01），SA-β-gal 染色阳性率升高（P<0.01），提示 H₂O₂ 诱导 NRK-52E 细胞发生衰老，见图 1。



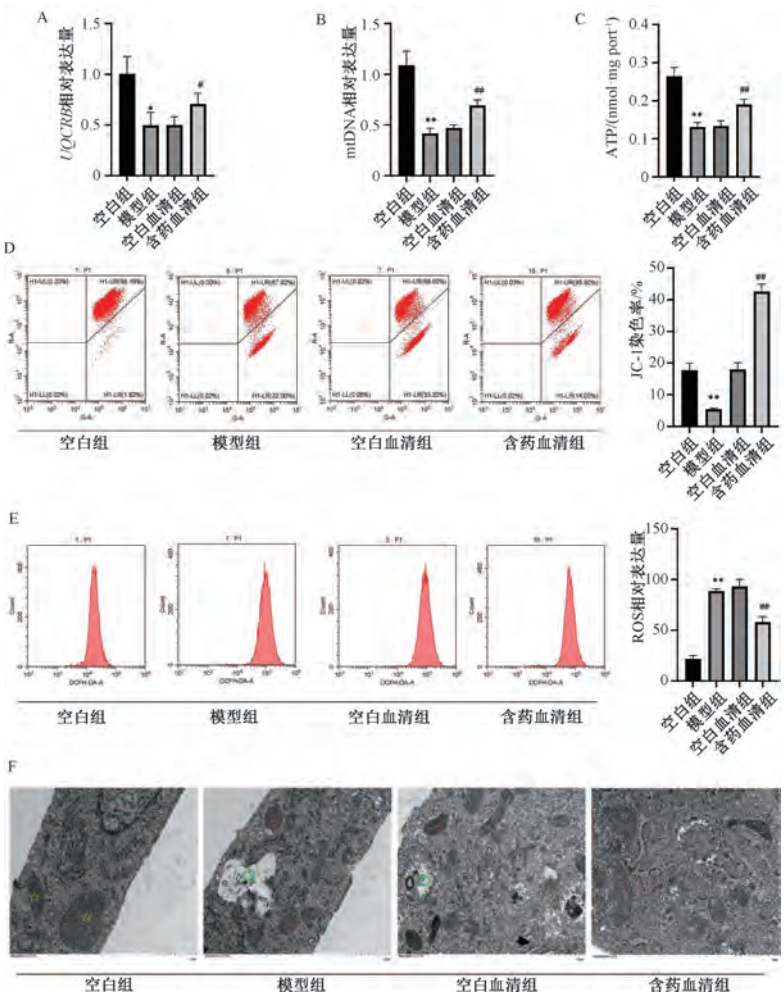
注：A 为各组 P16、P21 蛋白条带图，B~C 为各组 P16、P21 蛋白表达比较，D 为各组 SA-β-gal 染色图，E 为各组 SA-β-gal 染色率比较。与空白组比较，** P<0.01。

图 1 H₂O₂ 对 NRK-52E 细胞 P16、P21 表达及 SA-β-gal 染色阳性率的影响（ $\bar{x}\pm s$ ，n=3）

3.2 右归丸对 H₂O₂ 诱导衰老细胞 UQCRR 及线粒体能量代谢的影响 与空白组比较，模型组 UQCRR 表达降低（P<0.05），线粒体膜电位、mtDNA、ATP 水平降低（P<0.01），ROS 水平升高（P<0.01），线粒体结构呈现病理性

肿胀，胞质内空泡形成，嵴密度显著降低且空间构象异常，甚至消失，说明 H₂O₂ 可使 NRK-52E 细胞 UQCRR 表达降低并发生线粒体功能损伤；与模型组比较，右归丸含药血清组 UQCRR 表达升高（P<0.05），线粒体膜电位、mtDNA、

ATP 水平升高 ($P<0.01$), ROS 水平降低 ($P<0.01$), 线粒体内空泡减少, 基质较均匀, 说明右归丸含药血清可升高 H_2O_2 诱导衰老细胞的 *UQC*R*B* 表达, 并修复衰老细胞的线粒体功能, 见图 2。

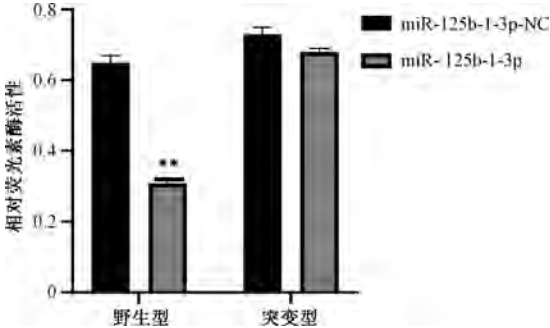


注: A 为各组 *UQC*R*B* 表达; B 为各组 mtDNA 表达; C 为各组 ATP 水平; D 为各组线粒体膜电位水平; E 为各组 ROS 表达; F 为各组超微结构观察。蓝色正方形代表细胞核; 黄色五角星代表正常线粒体, 线粒体双层膜完整, 嵴结构清晰; 红色倒三角形代表损伤线粒体, 双层膜完整, 但嵴有断裂; 绿色圆形代表损伤线粒体, 但线粒体完全破裂, 双层膜消失。与空白组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与模型组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

图 2 右归丸对 H_2O_2 诱导衰老细胞 *UQC*R*B* 表达和线粒体 mtDNA、ATP、膜电位、ROS 水平及线粒体超微结构的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

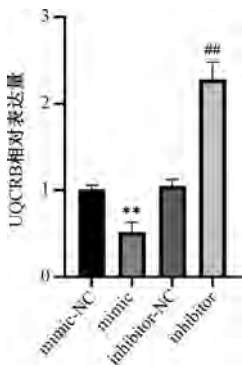
3.3 *miR*-125*b*-1-3*p* 调控 *UQC*R*B* 对衰老细胞线粒体功能的影响 双荧光素酶报告基因实验表明, *UQC*R*B* 为 *miR*-125*b*-1-3*p* 的靶基因, 见图 3。与 mimic-NC 组比较, mimic-组 *UQC*R*B* 表达降低 ($P<0.01$); 与 inhibitor-NC 组比较, inhibitor 组 *UQC*R*B* 表达升高 ($P<0.01$), 说明 *miR*-125*b*-1-3*p* 可负向调控 *UQC*R*B* 表达, 见图 4。

与 mimic-NC 组比较, mimic 组线粒体 ATP、mtDNA、线粒体膜电位水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), ROS 水平升高 ($P<0.01$), 线粒体结构呈现病理性肿胀, 胞质内空泡形成, 嵴密度显著降低且空间构象异常; 与 inhibitor-NC 组比较, inhibitor 组线粒体 ATP、mtDNA、线粒体膜电位水平升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), ROS 水平降低 ($P<0.01$), 线



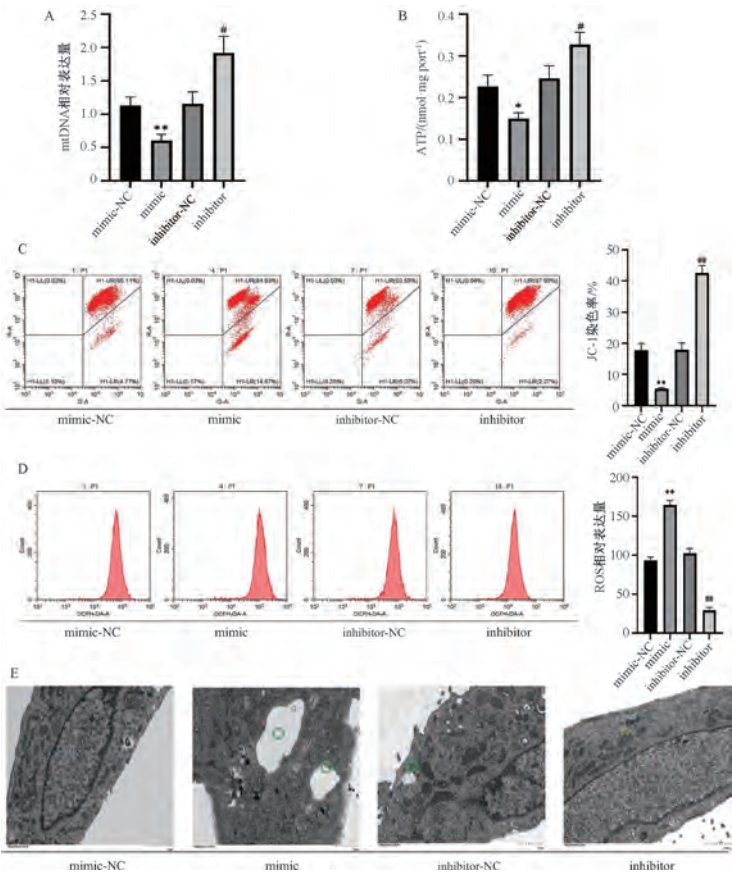
注: 与 NC 组比较, ** $P<0.01$ 。

图 3 双荧光素酶报告基因实验 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)



注：与 mimic-NC 组比较，** $P<0.01$ ；与 inhibitor-NC 组比较，## $P<0.01$ 。

图 4 *miR-125b-1-3p* 对衰老细胞 *UQCRLB* 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)



注：A 为各组 mtDNA 表达；B 为各组 ATP 水平；C 为各组线粒体膜电位水平；D 为各组 ROS 表达；E 为各组超微结构观察。蓝色正方形代表细胞核；黄色五角星代表正常线粒体，线粒体双层膜完整，嵴结构清晰；红色倒三角形代表损伤线粒体，双层膜完整，但嵴有断裂；绿色圆形代表损伤线粒体，但线粒体完全破裂，双层膜消失。与 mimic-NC 组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；与 inhibitor-NC 组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。

图 5 *miR-125b-1-3p* 对衰老细胞线粒体 mtDNA、ATP、膜电位、ROS 水平及线粒体超微结构的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

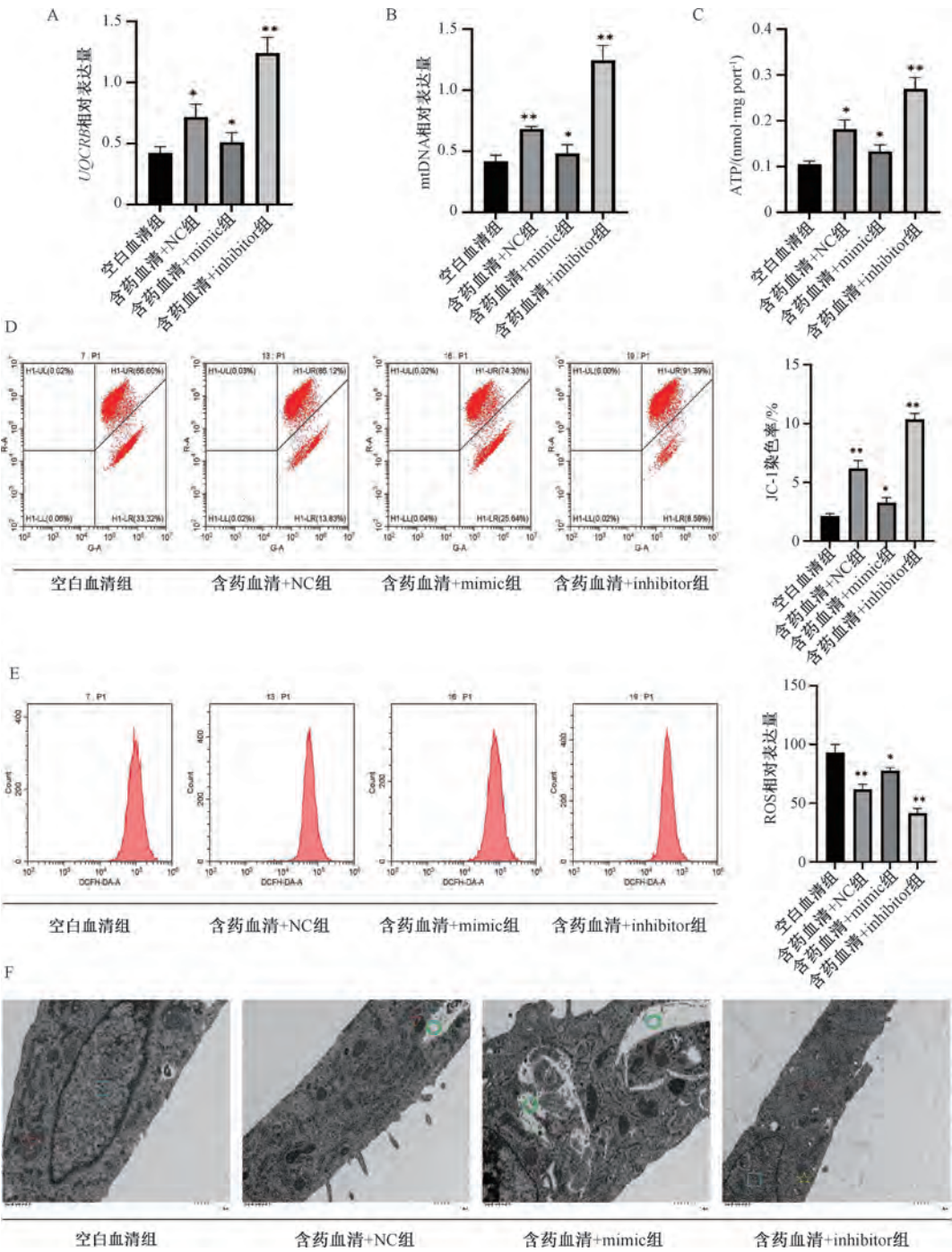
4 讨论

衰老是指随着年龄的增长，机体自身内环境稳定能力减弱和应激适应力降低，进而引发细胞与器官功能衰退、组织结构损伤等变化，最终导致生理功能和形态结构出现退行性改变的生理、病理现象^[11]。衰老机制众多，其中线粒体功能障碍被认为是衰老发生最重要的机制^[12]。肾虚衰

粒体超微结构完整，嵴系统呈现密集层状排列且折叠结构显著，基质区电子密度均匀，内外膜连续完整，未见病理性水肿或空泡形成，说明 *miR-125b-1-3p* 可调控 *UQCRLB* 表达，影响衰老细胞的线粒体功能，见图 5。

3.4 右归丸调控 *miR-125b-1-3p/UQCRLB* 对衰老细胞线粒体功能的影响 与空白血清组比较，含药血清+mimic 组和含药血清+inhibitor 组 *UQCRLB* 表达升高 ($P<0.05$)，线粒体膜电位、ATP、mtDNA 水平升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)，ROS 水平降低 ($P<0.05$)，线粒体内外膜结构较清晰，线粒体嵴排列较清晰，气泡小且少，说明右归丸含药血清对衰老细胞的 *miR-125b-1-3p* 水平具有双向调节作用，通过调节 *miR-125b-1-3p* 的平衡维持 *UQCRLB* 表达而修复衰老细胞的线粒体功能，见图 6。

老是中医衰老学说的核心。肾藏精，寓元阴和元阳，为各脏腑阴阳之根本^[13]。肾中阴阳互根互用是肾主生长发育之基础^[14]。其中肾阳为五脏阳气之根本，若肾虚衰，阳气之温煦和推动功能减弱，则会出现阴寒内盛、代谢产物堆积的状态，因此肾虚衰是衰老的重要因素之一^[15]。右归丸是温补肾阳的经典方剂，前期研究发现，右归丸可通过



注：A 为各组 *UQCRCB* 表达；B 为各组 *mtDNA* 表达；C 为各组 ATP 水平；D 为各组线粒体膜电位水平；E 为各组 ROS 表达；F 为各组超微结构观察。蓝色正方形代表细胞核；黄色五角星代表正常线粒体，线粒体双层膜完整，嵴结构清晰；红色倒三角形代表损伤线粒体，双层膜完整，但嵴有断裂；绿色圆形代表损伤线粒体，但线粒体完全破裂，双层膜消失。与空白血清组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

图 6 右归丸干预 *miR-125b-1-3p* 对 *UQCRCB* 表达和线粒 *mtDNA*、ATP、膜电位、ROS 及线粒体超微结构的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

改善肾阳虚模型线粒体功能来促进其恢复能量代谢平衡，而衰老也是一个代谢、免疫、神经内分泌等多系统稳态失衡的病理生理过程^[16]，其中能量代谢失衡是其发生发展进程中的重要环节之一^[17]。因此，具有温补肾阳功效的右归丸可能通过改善机体能量代谢而对抗衰老。

为了证实右归丸对衰老细胞线粒体代谢是否存在调控作用，本研究建立了 H_2O_2 诱导的肾小管上皮细胞衰老模型，通过 SA- β -gal 染色及衰老相关蛋白 (P16、P21) 检测确证衰老细胞模型造模成功。线粒体功能检测结果显示，与正常组比较，衰老细胞组 ROS 水平升高，线粒体膜电位

及 mtDNA、ATP 水平降低，而经右归丸含药血清干预后，这些指标又能恢复至正常组水平，提示衰老细胞存在显著的线粒体功能损伤，右归丸能够有效改善衰老细胞损伤的线粒体功能。

UQCRCB 是线粒体呼吸链中复合物Ⅲ的亚基，参与氧化磷酸化过程，在电子的传递和氧化还原相关质子运输方面起重要作用^[18]。*UQCRCB* 的突变可引起线粒体缺陷，并通过 ROS 介导的信号途径影响线粒体生物活性^[19]。本研究发现，衰老细胞 *UQCRCB* 表达降低，而右归丸含药血清可增加其表达，提示右归丸可通过上调 *UQCRCB* 表达来改善衰老细胞的能量代谢水平。

miR-125b-1-3p 是 *miR-125b* 家族成员之一，对细胞增殖、分化、迁移、凋亡等具有重要调控作用^[20]。为了进一步确认 NRK-52E 细胞中 *miR-125b-1-3p* 对 *UQCRCB* 的调控关系，本研究首先利用生物信息学预测筛选 *miR-125b-1-3p* 与 *UQCRCB* 的潜在结合位点，再采用双荧光素酶报告基因实验进行了确证。进一步采用 miRNA 干扰技术，发现促进细胞的 *miR-125b-1-3p* 表达后，其 *UQCRCB* 表达降低，线粒体功能出现损伤；而细胞的 *miR-125b-1-3p* 表达被抑制后，其 *UQCRCB* 表达升高，线粒体功能又得以修复，说明 *miR-125b-1-3p* 可负向调控衰老细胞 *UQCRCB* 的表达，*miR-125b-1-3p* 过表达引起的 *UQCRCB* 表达降低可能是 H₂O₂ 诱导衰老细胞发生线粒体功能损伤的重要机制。

为了进一步证实右归丸是否可通过 *miR-125b-1-3p*/*UQCRCB* 调控细胞衰老，本研究又以右归丸含药血清干预经 *miR-125b-1-3p* 干扰后的衰老细胞，发现衰老细胞的 *miR-125b-1-3p* 表达被过表达或抑制后，右归丸含药血清均可增加其 *UQCRCB* 表达量，说明右归丸含药血清可通过调节衰老细胞的 *miR-125b-1-3p* 水平，维持 *UQCRCB* 表达的平衡，从而改善衰老细胞的线粒体功能。

综上所述，右归丸含药血清可通过 *miR-125b-1-3p*/*UQCRCB* 途径调控衰老细胞的线粒体功能，改善衰老细胞的能量代谢水平。本研究为右归丸的补肾抗衰老作用提供了一定的实验依据。

参考文献：

[1] Nelson G, Wordsworth J, Wang C, *et al.* A senescent cell bystander effect: senescence-induced senescence[J]. *Aging Cell*, 2012, 11(2): 345-349.

[2] Yousefzadeh M J, Flores R R, Zhu Y, *et al.* An aged immune system drives senescence and ageing of solid organs[J]. *Nature*, 2021, 594(7861): 100-105.

[3] Fiard G, Stavrindes V, Chambers E S, *et al.* Cellular senescence as a possible link between prostate diseases of the ageing male[J]. *Nat Rev Urol*, 2021, 18(10): 597-610.

[4] Martel J, Ojcus D M, Wu C Y, *et al.* Emerging use of senolytics and senomorphics against aging and chronic diseases[J]. *Med Res Rev*, 2020, 40(6): 2114-2131.

[5] Birch J, Passos J F. Targeting the SASP to combat ageing: mitochondria as possible intracellular allies? [J]. *Bioessays*, 2017, 39(5): 1600235.

[6] 张巍岚. 基于线粒体氧化磷酸化途径研究肾阳虚证能量代谢低下及右归丸的作用机制[D]. 西安: 陕西中医药大学, 2021.

[7] Shang R, Lee S, Senavirathne G, *et al.* MicroRNAs in action: biogenesis, function and regulation[J]. *Nat Rev Genet*, 2023, 24(12): 816-833.

[8] Baeeri M, Bahadar H, Rahimifard M, *et al.* α-Lipoic acid prevents senescence, cell cycle arrest, and inflammatory cues in fibroblasts by inhibiting oxidative stress[J]. *Pharmacol Res*, 2019, 141: 214-223.

[9] 刘恩岐, 尹海林, 顾为望. 医学实验动物学[M]. 北京: 科学出版社, 2008.

[10] 张济周. 基于活血化瘀法探讨三七粉抗肺癌的机制研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2020.

[11] Levine M E, Lu A T, Quach A, *et al.* An epigenetic biomarker of aging for lifespan and healthspan[J]. *Aging (Albany NY)*, 2018, 10(4): 573-591.

[12] Langeh U, Kumar V, Kumar A, *et al.* Cellular and mitochondrial quality control mechanisms in maintaining homeostasis in aging[J]. *Rejuvenation Res*, 2022, 25(5): 208-222.

[13] 谭从娥, 王米渠. 右归丸对肾阳虚证患者干预效应的差异表达基因功能网络分析[J]. 中成药, 2013, 35(9): 1875-1879.

[14] 谢 兰, 赵 帅, 闫 迪, 等. 肾阳虚不孕症的代谢组学研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(4): 2157-2160.

[15] 焦丹丽, 刘 洋, 侯 彤, 等. 基于“肾藏精”理论探讨衰老与骨关节炎的关系[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2019, 21(8): 1738-1743.

[16] Cabello-Rivera D, Ortega-Sáenz P, Gao L, *et al.* Oxygen regulation of breathing is abolished in mitochondrial complex Ⅲ-deficient arterial chemoreceptors[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2022, 119(39): e2202178119.

[17] Salekeen R, Diaconeasa A G, Billah M M, *et al.* Energy metabolism focused analysis of sexual dimorphism in biological aging and hypothesized sex-specificity in sirtuin dependency[J]. *Mitochondrion*, 2021, 60: 85-100.

[18] Gwak E J, Kim D, Hwang H Y, *et al.* Mitochondrial ROS produced in human colon carcinoma associated with cell survival via autophagy[J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(8): 1883.

[19] Jung H J, Cho M, Kim Y, *et al.* Development of a novel class of mitochondrial ubiquinol-cytochrome c reductase binding protein (UQCRCB) modulators as promising antiangiogenic leads[J]. *J Med Chem*, 2014, 57(19): 7990-7998.

[20] Zhang J, Qu P, Zhou C, *et al.* MicroRNA-125b is a key epigenetic regulatory factor that promotes nuclear transfer reprogramming[J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(38): 15916-15926.