文章编号:1000-1638(2026)02-0198-14 DOI:10.13484/j.nmgdxxbzk.20260211

基于MICU2探讨红花清肝十三味丸对急性肝损伤的保护作用*

赵林昀[1],张 鑫[1],席子萌[1],张 权[1],苏淑婷[2],宁 畅[2],马春丽[1],包玉龙[1]
(1.内蒙古医科大学基础医学院,呼和浩特 010110;2.内蒙古医科大学第一临床医学院,呼和浩特 010110)

摘要:探讨红花清肝十三味丸(HHQG)对四氯化碳诱导急性肝损伤小鼠的保护效应及其分子机制,特别关注线粒体钙离子摄取蛋白2(Mitochondrial calcium uniporter 2,MICU2)与氧化应激的关联。通过HE/Masson组织学、血清学、肝组织氧化应激生化指标评估病理变化,基于不同时相(12~120 h)开展RNA-seq时序分析并以qPCR验证关键基因;采用蛋白质组学鉴定差异表达蛋白并进行功能富集与免疫组织化学时相验证;通过Pearson相关分析探讨MICU2与SOD/MDA关系;采用AutoDock Vina对HHQG关键活性成分(Apigenin、Emodin、Genistein、Kaempferol、Quercetin)与MICU2进行分子对接预测结合位点。结果表明,在12~72 h CCl_4能够诱导明显的肝小叶结构破坏、炎症浸润及早期胶原沉积。此外,血清丙氨酸氨基转移酶(Alanine aminotransferse,ALT)和天冬氨酸氨基转移酶(Aspartate aminotransferase,AST)在12~72 h达高峰;HHQG可在早期显著减轻组织病理损伤、抑制炎症与胶原沉积,并使ALT、AST、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase,SOD)、丙二醛(Malondialdehyde,MDA)等指标部分或完全恢复。qPCR与蛋白免疫组化提示,MICU2在中期(48~72 h)显著上调,HHQG能抑制其异常上调。Pearson相关分析显示,在模型组各时间点,MICU2与SOD活性呈显著负相关($P<0.05$),而与MDA含量呈显著正相关($P<0.05$)。经HHQG干预后,随着MICU2表达被有效抑制,MICU2与SOD、MDA之间的相关性发生逆转,在各时间点MICU2与SOD呈正相关,与MDA呈负相关。蛋白组学结果也显示,HHQG对解毒、蛋白清除与抗氧化相关通路的调控。分子对接预测表明MICU2存在两个可结合口袋,5种活性成分均可与之结合(Apigenin得分最优),提示可能的直接作用位点。HHQG通过抑制炎症与胶原沉积、增强抗氧化能力并调控MICU2相关的线粒体钙稳态,从分子与功能层面缓解CCl_4诱导的急性肝损伤。MICU2及其与HHQG活性成分的相互作用可能为其抗氧化防护作用的重要机制与潜在靶点。

关键词:红花清肝十三味丸;MICU2;氧化应激;急性肝损伤
中图分类号:R392;Q731 **文献标志码**:A

急性肝损伤(Acute liver injury,ALI)是临床常见且病程进展迅速的危重病症,可由药物毒性、病毒感染、缺血缺氧、自身免疫反应等多种内外因在短期内损伤肝细胞并导致肝功能急剧受损[1]。其

* **收稿日期**:2025-10-31;**修回日期**:2026-01-10
基金项目:内蒙古医科大学笃学人才项目(ZY20243102);内蒙古自然科学基金项目(2024MS08054,2024LHMS08024);内蒙古医科大学大学生科技创新"英才培育"项目(YCPY2024004,YCPY2024018)
作者简介:赵林昀(2000—),女,山西晋中人,2023级硕士研究生。E-mail:2426332787@qq.com
通信作者:包玉龙(1976—),男(蒙古族),内蒙古科右中旗人,教授,博士。主要从事肝损伤修复机制与保肝蒙药药效活性成分研究。E-mail:472689713@qq.com

病因复杂多样，发病率呈上升趋势[2]。若不及时干预，可能迅速进展为急性肝衰竭，严重威胁患者生命健康，增加社会医疗负担[3]。因此，深入探究急性肝损伤的发病机制并开发有效的治疗方法具有重要的临床意义。氧化应激在急性肝损伤的发病机制中起着核心作用[4]。当体内活性氧（Reactive oxygen species，ROS）的过度生成超过机体抗氧化防御系统的清除能力时，可引发脂质过氧化、蛋白质羰基化和DNA损伤，最终导致肝细胞凋亡和坏死[5]。这一过程不仅直接加剧肝组织损伤，还通过激活炎症信号通路促进炎症反应，形成恶性循环[6]。因此，调节氧化应激已成为治疗急性肝损伤的关键靶点。

传统蒙药复方制剂红花清肝十三味丸（HHQG）具有清热解毒、活血化瘀的功效[7]。其多成分、多靶点的特点为急性肝损伤的综合治疗提供了新思路。近年来，实验和临床研究均表明HHQG在减轻肝损伤、改善肝功能指标和抗氧化方面具有显著效果[8]。例如，动物实验表明，HHQG能降低肝损伤模型小鼠的血清转氨酶水平，并减轻肝组织的病理损伤；临床研究也证实其能改善慢性肝病患者的肝功能指标[9]。然而，其作用机制尚未完全阐明。特别是调节氧化应激相关通路的具体分子机制仍需深入探究。线粒体钙离子摄取蛋白2（Mitochondrial calcium uniporter 2，MICU2）是线粒体钙转运复合体（Mitochondrial Ca^{2+} uptake is mediated by the uniporter channel，mtCU）的关键组成部分，参与调节线粒体钙稳态[10]。现有研究表明，MICU2可通过调节线粒体钙内流影响ROS生成和细胞凋亡[11]。在肝损伤过程中，MICU2的异常表达可能导致线粒体钙超载，进而加剧氧化应激和肝细胞损伤[12]。然而，目前尚无关于HHQG是否可通过调节MICU2表达抑制氧化应激从而减轻急性肝损伤的相关报道。

本研究以四氯化碳（Carbon tetrachloride，CCl_4）诱导的急性肝损伤小鼠模型为研究对象，通过不同时间点转录组测序、蛋白质组学分析、免疫组织化学、氧化应激指标检测以及分子对接等技术，系统地探讨了HHQG对急性肝损伤的保护作用及其分子机制。研究重点在于HHQG是否能通过调节MICU2的表达并抑制氧化应激来减轻肝损伤。研究结果将为急性肝损伤的预防和治疗提供新的理论依据和实验支持，推动中医药现代化在肝病治疗中的应用。

1　材料与方法

1.1　药品与试剂

CCl_4（阿拉丁，C112044），AST/GOT活性检测试剂盒（南京建成生物工程研究所，中国，C010-2-1），ALT/GPT活性检测试剂盒（南京建成生物工程研究所，中国，C009-2-1），Masson三色染色试剂盒（索莱宝，G1340），抗MICU2抗体（Abcam，ab101465），抗β-肌动蛋白抗体（LABLEAD，A0101-1），FastKing一步法gDNA去除及cDNA合成试剂盒（天根生化科技，北京有限公司，KR118），FastReal qPCR试剂盒SYBR Green（北京天根生化科技有限公司，FP217）。

本研究中使用的HHQG（内蒙古蒙药股份有限公司，国药准字Z15020395）购自内蒙古国际蒙医医院。HHQG由红花（60 g）、丁香（30 g）、莲子（30 g）、麦冬（60 g）、木香（30 g）、诃子（30 g）、川楝子（30 g）、栀子（30 g）、紫檀香（30 g）、麝香（0.5 g）、水牛角浓缩粉（30 g）、牛黄（30 g）和银珠（30 g）共13味成分组成。除麝香和银珠外，其余11味药材需进行炮制，而银珠则通过水飞法制备。炮制完成后，将药材粉碎、过筛并混合，然后加入麝香搅拌均匀。根据模具计算药粉量，加水湿润后制成丸剂，干燥至每丸0.2 g，完成水丸的制备。最后，将朱砂制备好后，对丸剂进行包衣、抛光并储存。

1.2　仪器

自动旋转切片机（徕卡，德国），石蜡包埋机（徕卡，德国），载玻片加热器（徕卡，德国），正置显微镜（徕卡，德国），实时荧光定量PCR仪（LightCycler 480 Ⅱ，德国），恒温振荡培养箱（FMC-1000，日本）。

2　方法

2.1　动物分组及造模方法

选取45只SPF级雄性C57BL/6小鼠，体重20～22 g。适应性喂养1周后，随机分为3组。每个

时间点(12、24、48、72、120 h)的每个组都包含3个生物学重复样本。在每个时间点,都设置了对照组、模型组和HHQG组,每组有3只小鼠。在建模开始前,HHQG组的小鼠每天灌胃一次HHQG(0.616 5 g/kg),连续1周。正常对照组和模型组的小鼠每天灌胃等体积的生理盐水,所有组均持续干预1周。模型组和HHQG组的小鼠通过腹腔注射CCl_4建立急性肝损伤模型[13]。具体来说,将CCl_4与橄榄油按体积比1∶4混合,配制成20%的CCl_4溶液,然后以10 mg/kg的剂量进行腹腔注射。正常对照组的小鼠喂食标准饲料,自由饮水,每天腹腔注射等体积的生理盐水。建模成功的标准是丙氨酸氨基转移酶(Alanine aminotransferase,ALT)和天冬氨酸氨基转移酶(Aspartate aminotransferase,AST)水平比正常对照组高出2倍以上。建模后12、24、48、72、120 h,相应组别的动物被实施安乐死,采集血液和肝脏组织用于后续生化指标检测和组织病理学检查。

2.2 苏木精-伊红(H&E)染色

取出肝脏组织,用4%多聚甲醛固定24 h。经过常规脱水、透明和石蜡包埋后,制备4 μm厚的石蜡切片。切片经二甲苯脱蜡至水后,用苏木精溶液染色3 min,用自来水冲洗1 min,于1%盐酸乙醇中分化2 s,再用自来水冲洗1 min使其呈蓝色,然后用伊红溶液染色1 min。脱水、透明后,用中性树胶封片。使用光学显微镜观察肝组织的形态变化,包括肝细胞变性和坏死的程度、炎性细胞浸润的范围以及肝小叶结构的完整性[14]。

2.3 马松染色

取石蜡切片,经二甲苯脱蜡至水。然后,将其用维格特苏木精溶液染色8 min,用自来水冲洗1 min,用1%盐酸-乙醇分化5 s,再在流动水下冲洗10 min。接着,切片用波拿酸性品红溶液染色8 min,然后用蒸馏水快速冲洗两次。随后,用1%磷钼酸溶液处理10 min,直接用苯胺蓝溶液染色5 min。之后,切片用1%冰醋酸处理1 min,脱水、透明,用中性树胶封片。在光学显微镜下观察肝组织中胶原纤维的分布和含量变化[15]。

2.4 不同时点肝损伤的转录组

小鼠腹腔注射麻醉后,处死动物,迅速解剖并分离肝脏。称重后,用预冷的无菌PBS缓冲液(pH 7.4)轻轻冲洗肝表面的血液,用滤纸吸干水分。沿左肝叶最大切面取组织样本。对于每只小鼠,来自相同部位的组织块(约100 mg/块)立即放入无核糖核酸酶的冷冻管中,迅速在液氮中冷冻5 min,然后转移至−80 ℃的超低温冰箱中保存(用于RNA测序)。使用Trizol试剂(DP424)从小鼠肝脏组织中提取总RNA。使用安捷伦2100生物分析仪(安捷伦科技,美国加利福尼亚州)测定RNA的完整性和含量[16]。使用寡聚脱氧胸苷磁珠富集mRNA。经过片段化处理后,使用随机六聚体引物进行第一链cDNA合成。通过末端修复、腺苷酸化、接头连接、片段选择、扩增和纯化构建cDNA文库。使用Qubit荧光计和RT-qPCR对其进行定量,并使用生物分析仪分析其片段大小分布。采用Illumina测序获取目标片段的序列信息。使用fastp软件处理原始读取。对得到的干净数据进行Q20、Q30和GC含量的分析[17]。使用HISAT2 v2.0.5工具生成参考基因组,并将配对的末端清洁读段与该基因组进行比对。使用StringTie(1.3.3b)进行基因预测。使用FeatureCounts(1.5.0-p3)获取映射到每个基因的读段计数。根据基因长度和映射读段计数确定每个基因的FPKM值。使用DESeq2(1.20.0)评估对照组、模型组和HHQG组之间的差异基因表达。使用GSEA工具(http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp)对特定物种的GO和KEGG数据集进行基因集富集分析[18]。

2.5 蛋白质组学分析

从对照组、模型组和HHQG组中收集肝脏组织,在液氮中研磨。将研磨后的样本分别加入适量的SDT裂解液(十二烷基硫酸钠-去污剂),并转移至离心管(EP管)中。样本沸水浴3 min,再于4 ℃下超声2 min。以16 000 g离心20 min,收集上清液用于后续分析[19]。采用BCA法测定各样本的总蛋白浓度。蛋白样本送至上海倍吉生物进行DIA蛋白质组学分析。使用Spectronaut软件整合质谱数据,进行数据库搜索,并对蛋白质进行DIA定量分析。所用数据库为Uniprot Mus musculus(小鼠)

[10090]-87552 20240325. fasta，可在 https://www. uniprot. org/10090 获取。差异表达蛋白（Differentially expressed proteins，DEPs）的确定标准为$|\log_2 F_C| \geqslant \log_2 1.2$，其中$F_C$为差异倍数（Fold change）。使用DAVID对DEPs进行GO和通路分析，参数count和ease分别设置为2和0. 05。对于连续数据，先进行方差齐性检验。若满足方差齐性，采用方差分析；若不满足，则采用非参数检验。差异具有统计学意义的标准为$P<0.05$。

2. 6　实时荧光定量PCR

取约100 mg新鲜肝脏组织，加入1 mL Trizol试剂。在冰上用组织研磨器将组织研磨成匀浆，按照试剂盒说明书提取总RNA。使用紫外分光光度计测定RNA的浓度和纯度。以2 μL总RNA为模板合成cDNA。使用FastReal快速荧光定量PCR预混试剂（SYBR Green）在罗氏LightCycler® 480实时荧光定量PCR仪上进行qRT-PCR反应[20]。反应条件如下：95 ℃预变性30 s；95 ℃变性5 s，60 ℃退火30 s，共40个循环；最后绘制熔解曲线，95 ℃ 15 s，60 ℃ 1 min，95 ℃ 15 s。以β-肌动蛋白为内参基因，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算目标基因的相对表达水平。引物序列MICU2正向：5′-TCGGCGCAGAAAAATTATTTGG-3′；反向：5′-GTGTCATGTAATACTCTCCGTCG-3′。β-肌动蛋白正向：5′-GGCTGTATTCCCCTCCATCG-3′；反向：5′-CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3′。

2. 7　抗氧化剂检测

取50 mg新鲜肝脏组织，加入450 μL预冷的生理盐水，在冰上用组织匀浆器制备10%的组织匀浆。在4 ℃下以12 000 r/min离心15 min，收集上清液。使用SOD检测试剂盒和MDA检测试剂盒，并严格遵循试剂盒的说明。在酶标仪上测量每个指标的吸光度值，并根据标准曲线计算SOD活性和MDA含量。每个样本设置3个重复孔[21]。

2. 8　免疫组织化学

将石蜡切片脱蜡至水后，于室温下用3%的H_2O_2孵育10 min以消除内源性过氧化物酶活性。用0. 01 mol/L的柠檬酸盐缓冲液进行抗原修复。加入正常山羊血清封闭液，在室温下孵育30 min，然后弃去血清。加入稀释的一抗（兔抗小鼠MICU2多克隆抗体，稀释比例1∶1 000），在4 ℃下孵育过夜。加入HRP标记的山羊抗兔二抗，在室温下孵育30 min。用DAB显色液显色3～5 min，然后用自来水冲洗以终止显色。用苏木精复染30 s，自来水冲洗5 min使其呈蓝色，脱水、透明，用中性树胶封片。在光学显微镜下观察MICU2的阳性表达[22]。

2. 9　分子对接

分子对接分析利用CB-Dock2平台（http://cao. labshare. cn/cb - dock）进行，该平台采用空腔检测引导的盲对接技术来预测结合位点与亲和力[23]。目标蛋白MICU2（PDB ID：6IIH）的三维结构数据均从蛋白质数据库（http://www. rcsb. org）得到。配体芹菜素（Apigenin，CID 5280443）、大黄素（Emodin，CID 3220）、染料木素（Genistein，CID 5280961）、山柰酚（Kaempferol，CID 5280863）以及槲皮素（Quercetin，CID 5280343）的三维结构数据来源于PubChem化合物数据库（https://pubchem. ncbi. nlm. nih. gov）。通过对对接分数、结合构象和接触残基的分析，评估了药物与靶蛋白之间相互作用的强度及其潜在的治疗价值。

2. 10　数据分析

使用GraphPad Prism 9软件进行数据相关性分析和统计分析。$P<0.05$被认为具有统计学意义。数据以3个实验重复的平均值±标准差（SD）表示。

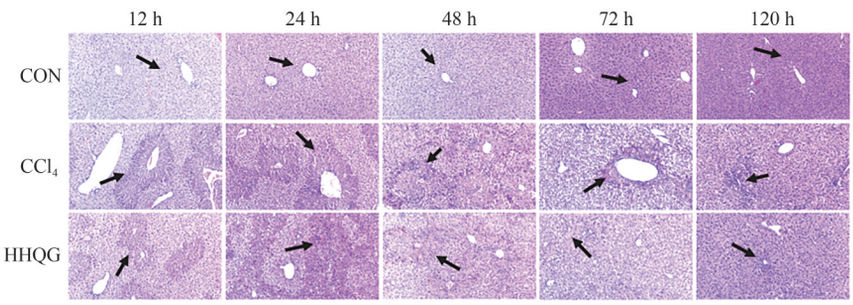
2. 11　伦理声明

本研究中的动物管理和实验操作均获得了内蒙古医科大学生物医学科研伦理委员会批准（编号：YKD202405027）。所有实验动物均得到了妥善饲养、喂食、供水和提供垫料。实验室技术人员每天都会进行观察，以确保符合适当的动物护理标准。实验遵循GB/T 39760—2021《实验动物 安乐死指南》进行，所有手术均在戊巴比妥钠麻醉下进行，并使用CO_2杀死小鼠。

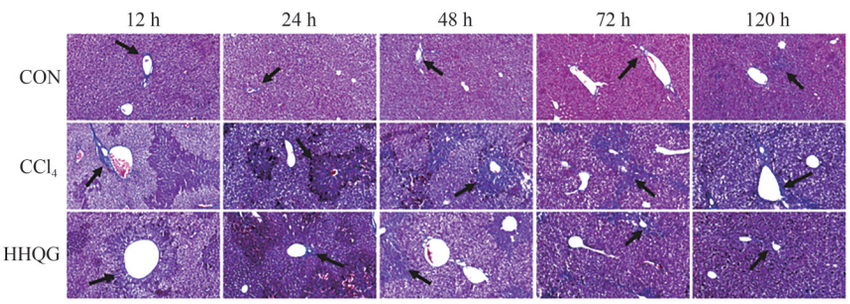
3 结果

3.1 HHQG对CCl_4诱导急性肝损伤小鼠肝组织病理形态与血清酶学指标的保护效应

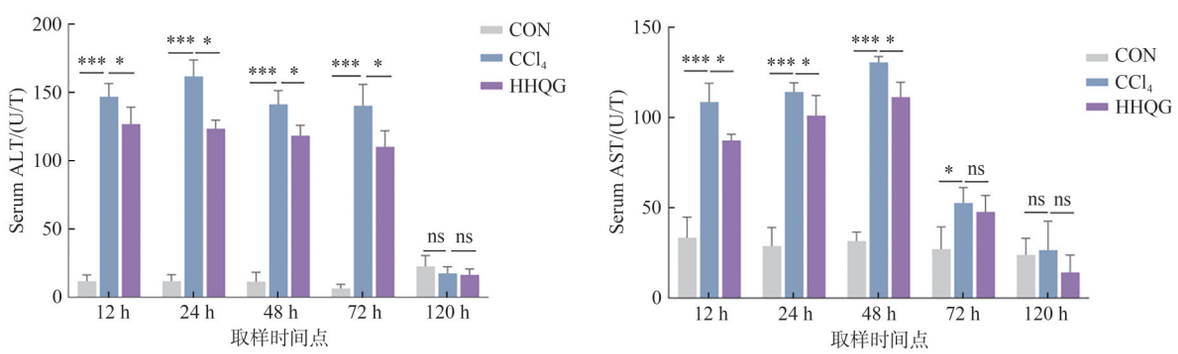
HE染色结果如图1(a)所示,CCl_4模型组在早期(12～24 h)即引起明显的肝小叶结构紊乱,肝细胞排列无序,大面积细胞肿胀、空泡变性及细胞断裂坏死,中央静脉周围可见明显炎性细胞浸润和局灶性出血。Masson染色结果见图1(b),CCl_4模型组在12～24 h已出现周中心区胶原沉积,且在48～72 h进一步增强,提示早期基质重塑或纤维化趋势。中期(48～72 h)病变达高峰,坏死范围扩大、炎性浸润加重。至120 h,模型组炎性反应与坏死程度较前期有所缓解,但周中心区仍可见较对照更明显的胶原沉积。



(a) CCl_4诱导急性肝损伤不同采样时间点肝组织HE染色



(b) CCl_4诱导急性肝损伤不同采样时间点肝组织Masson染色



(c) CCl_4诱导急性肝损伤不同采样时间点的血清ALT、AST水平

*表示$P<0.05$,***表示$P<0.001$,ns表示无统计学意义。

图1 HHQG对急性肝损伤小鼠组织病理及生化指标的作用

Fig. 1 Effects of HHQG on histopathology and biochemical indicators of acute liver injury in mice

血清学结果如图1(c)所示,模型组在12、24、48、72 h的ALT和AST较对照组显著升高($P<0.001$),至120 h两项指标与对照组差异不显著,提示CCl_4诱导的肝细胞损伤在12～72 h为高峰,随后趋于恢复。HHQG干预组在损伤早期即表现出显著保护作用:在48～72 h阶段与模型组相比,肝组织病理损伤程度明显减轻,中央静脉周围炎性浸润和胶原沉积减少。同时血清ALT和AST水平显著降低($P<0.05$)。随着损伤延续至120 h,HHQG组肝组织结构基本恢复正常,未见明显炎症反

应或纤维化，血清肝功能指标亦恢复至接近正常水平。上述结果表明，HHQG能显著减轻CCl_4所致急性肝损伤，尤其在早期发挥保护作用，可能与抑制炎症反应、减少胶原沉积并促进肝功能恢复相关。

3.2　不同时间点RNA-seq与实验验证揭示HHQG缓解肝损伤氧化应激的作用机制

对肝损伤模型组与HHQG干预组在12、24、48、72、120 h的转录组（RNA-seq）进行比较，差异表达基因以$|\log_2 F_C| \geqslant 1$且$P<0.05$筛选并用于通路富集分析。

针对mtCU各组分的不同时间点转录组分析结果，如表1所示。*Mcu*、*Mcur1*、*Micu1*、*Micu3*在模型组各时间点均未见显著差异，而*Micu2*在48 h和72 h呈显著差异表达（$P<0.05$）。如表2所示，HHQG组在48 h和72 h时*Micu2*表达呈下降趋势，然而该变化未达到预先设定的差异筛选阈值。

表1　mtCU各组分在对照组和模型组的不同时间点的转录组表达数据

Table 1　Transcriptome expression data of mtCU components at different time points in the control and model groups

基因	时间点	模型组			对照组						$\log_2 F_C$	P值
		M1	M2	M3	C1	C2	C3	C4	C5	C6		
Mcu	12 h	79.95	28.71	124.30	113.89	42.54	51.30	56.46	113.40	61.02	0.08	0.89
	24 h	105.68	89.70	54.23	119.60	44.37	53.71	58.86	118.11	63.11	0.13	0.81
	48 h	50.52	89.45	71.05	115.46	42.60	52.06	56.83	113.30	61.02	−0.06	0.90
	72 h	41.71	62.90	80.52	112.35	41.61	50.61	55.52	110.34	59.74	−0.21	0.68
	120 h	39.52	46.61	53.08	103.77	38.34	46.48	51.08	102.47	55.36	−0.51	0.35
Mcur1	12 h	410.46	316.48	348.05	591.02	600.22	425.83	486.04	473.13	439.04	−0.49	0.04
	24 h	549.77	454.54	398.59	620.62	626.17	445.80	506.68	492.76	454.06	−0.16	0.49
	48 h	456.60	511.95	413.93	599.15	601.08	432.08	489.21	472.69	439.05	−0.13	0.55
	72 h	476.99	534.65	437.66	583.00	587.10	420.04	477.88	460.35	429.82	−0.03	0.90
	120 h	218.79	475.44	417.39	538.46	541.04	385.77	439.66	427.51	398.32	−0.29	0.33
Micu1	12 h	623.35	606.12	558.34	544.85	645.90	341.18	429.57	491.73	351.07	0.35	0.21
	24 h	471.23	620.10	557.22	572.13	673.83	357.17	447.82	512.12	363.08	0.17	0.54
	48 h	527.85	448.94	424.67	552.34	646.83	346.18	432.38	491.26	351.08	−0.01	0.98
	72 h	453.41	441.49	345.45	537.45	631.79	336.54	422.36	478.44	343.70	−0.15	0.60
	120 h	479.99	417.18	261.26	496.40	582.22	309.08	388.58	444.31	318.51	−0.13	0.68
Micu2	12 h	582.91	441.95	462.00	172.38	179.59	421.98	416.29	393.19	370.89	0.60	0.11
	24 h	227.53	321.49	260.31	181.01	187.36	441.77	433.97	409.50	383.57	−0.33	0.38
	48 h	798.57	751.04	873.30	174.75	179.85	428.17	419.01	392.82	370.89	1.30	0.00
	72 h	877.81	722.17	783.76	170.04	175.67	416.25	409.30	382.57	363.10	1.31	0.00
	120 h	376.86	350.17	386.17	157.05	161.89	382.29	376.56	355.28	336.49	0.33	0.38
Micu3	12 h	142.24	142.32	0.00	153.91	25.21	261.65	155.00	114.33	154.54	−0.60	0.55
	24 h	154.77	119.20	86.77	161.62	26.30	273.92	161.59	119.08	159.82	−0.32	0.58
	48 h	91.97	122.64	127.24	156.03	25.24	265.49	156.01	114.22	154.54	−0.35	0.54
	72 h	58.04	55.19	125.32	151.82	24.66	258.10	152.40	111.24	151.29	−0.83	0.17
	120 h	183.13	131.10	110.33	140.23	22.72	237.04	140.21	103.31	140.20	0.11	0.84

注：F_C为差异倍数（Fold change）。

表 2 mtCU 各组分在 HHQG 组和模型组的不同时间点的转录组表达数据

Table 2 Transcriptome expression data of mtCU components at different time points in the HHQG group and model group

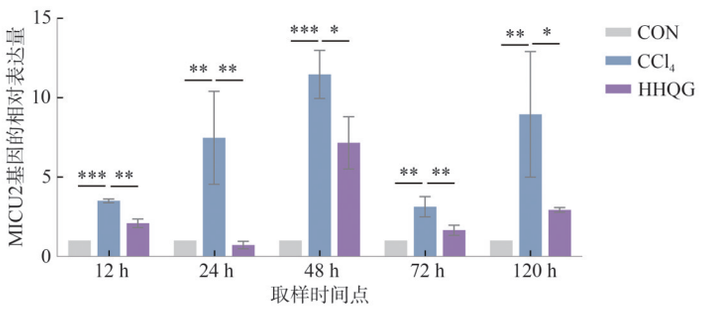
基因	时间点	HHQG 组			模型组			$\log_2F_C$	P 值
		HHQG1	HHQG2	HHQG3	M1	M2	M3		
Mcu	12 h	175.85	144.25	131.68	118.21	41.31	180.53	0.41	0.56
	24 h	97.41	99.10	143.54	180.78	153.49	92.85	−0.33	0.49
	48 h	103.98	49.31	101.64	72.95	128.93	102.50	−0.25	0.65
	72 h	13.89	124.77	151.10	56.77	85.95	110.97	0.19	0.77
	120 h	116.79	91.07	84.36	47.37	56.25	63.16	0.81	0.19
Mcur1	12 h	624.86	811.52	511.15	606.85	455.31	505.48	0.31	0.37
	24 h	832.43	1005.85	749.61	940.43	777.75	682.41	0.11	0.67
	48 h	810.29	685.86	808.38	659.37	737.93	597.10	0.21	0.38
	72 h	512.70	787.40	583.82	649.17	730.61	603.20	−0.07	0.76
	120 h	400.72	560.50	516.96	262.29	573.78	496.58	0.15	0.69
Micu1	12 h	774.82	863.41	709.18	921.62	872.00	810.88	−0.15	0.59
	24 h	810.69	1028.65	938.01	806.08	1061.03	953.99	−0.02	0.92
	48 h	930.95	720.60	866.73	762.26	647.11	612.59	0.32	0.19
	72 h	1007.72	606.02	734.92	617.08	603.30	476.11	0.47	0.06
	120 h	539.66	307.16	404.49	575.41	503.46	310.83	−0.15	0.68
Micu2	12 h	363.31	595.67	345.26	861.83	635.82	670.97	−0.73	0.05
	24 h	597.35	573.78	508.38	389.21	550.09	445.66	0.28	0.31
	48 h	1373.38	1384.05	1212.11	1153.20	1082.57	1259.75	0.18	0.37
	72 h	1382.78	1002.34	842.50	1194.68	986.85	1080.20	−0.02	0.94
	120 h	390.65	543.11	449.91	451.78	422.60	459.43	0.05	0.86
Micu3	12 h	78.55	145.29	332.82	210.30	204.75	0.00	0.42	0.72
	24 h	160.21	59.46	230.27	264.74	203.97	148.55	−0.46	0.38
	48 h	138.32	116.55	18.82	132.81	176.78	183.54	−0.85	0.17
	72 h	95.97	206.55	143.98	78.99	75.41	172.73	0.45	0.34
	120 h	94.64	135.78	200.08	219.53	158.21	131.27	−0.24	0.63

注:F_C 为差异倍数(Fold change)。

基于上述转录组提示,我们在中期重点选取 24、48、72 h 时相对代表性的氧化应激/线粒体稳态相关基因进行 qPCR 验证。qPCR 结果,如图 2 所示,与 RNA-seq 趋势一致,在模型组中,MICU2 在 48 h 和 72 h 显著上调($P<0.01$);而 HHQG 干预显著抑制了 MICU2 的异常上调,HHQG 组在 48 h 和 72 h 的 MICU2 转录水平均较 M 组显著降低($P<0.05$),并趋于接近对照水平。综上,转录组与 qPCR 联合分析表明,MICU2 在肝损伤中期(48~72 h)表达显著升高,HHQG 能在中期显著下调 MICU2 的过度表达。这些结果提示,HHQG 可能通过调控 MICU2 介导的线粒体钙稳态,减轻氧化应激并促进组织修复,构成其缓解肝损伤的潜在机制之一。

为将分子水平变化与功能性生化指标相结合,我们检测了肝组织中代表性的氧化应激指标(SOD 活

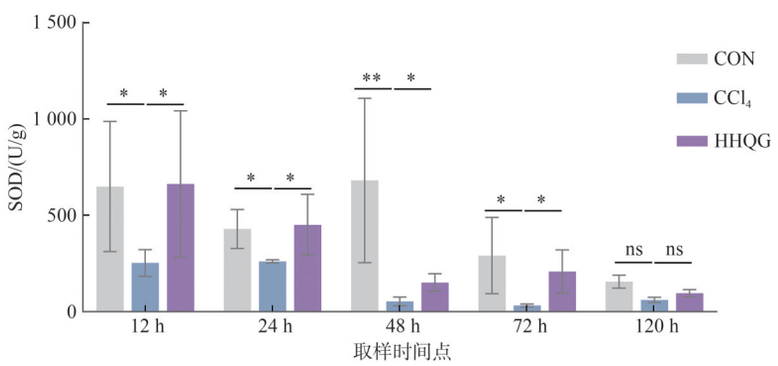
性、MDA 含量）。如图3所示，与对照组相比，模型组在12～72 h SOD活性显著降低（$P<0.05$），至120 h时恢复至与对照组无显著差异；而MDA含量在12～48 h显著升高（$P<0.01$），于120 h则无显著变化，提示抗氧化体系在损伤的早中期受损并随后部分恢复。经HHQG干预后，大多数检测时间点的SOD活性较模型组显著恢复（$P<0.05$），而MDA含量在12～72 h明显下降（$P<0.01$）；尽管在120 h观察到指标趋于改善，但组间差异已不具有统计学意义。上述结果表明，CCl_4所致肝损伤伴随氧化应激水平升高和抗氧化系统功能下降，HHQG可在早中期通过增强抗氧化酶活性并降低脂质过氧化产物来缓解氧化损伤。



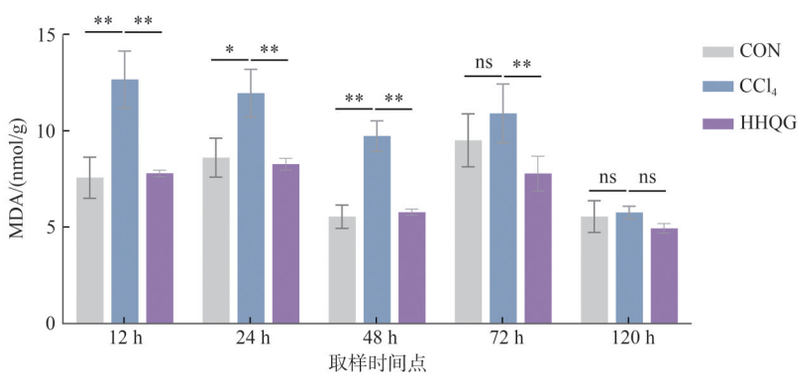
*表示$P<0.05$，**表示$P<0.01$，***表示$P<0.001$。

图2　CCl_4诱导肝损伤中MICU2的mRNA表达及HHQG干预的qPCR定量分析结果

Fig. 2　qPCR quantitative analysis results of MICU2 mRNA expression in CCl_4-induced liver injury and HHQG intervention



（a）不同采样时间点肝脏组织SOD活性及HHQG干预效果



（b）不采样时间点肝脏组织MDA含量及HHQG干预效果

*表示$P<0.05$，**表示$P<0.01$，ns表示无统计学意义。

图3　小鼠肝脏组织氧化应激相关指标分析

Fig. 3　Analysis of oxidative stress-related indicators in mouse liver tissues

综上，RNA-seq联合qPCR与生化检测表明，CCl_4诱导的急性肝损伤过程中，线粒体功能紊乱、线粒体钙稳态异常（以MICU2在中期下调为代表）、ROS过度生成及抗氧化防御受损构成一个时间

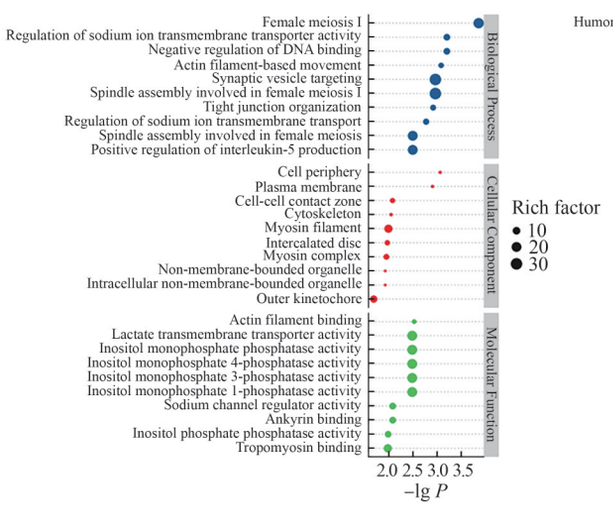
依赖的病理网络。HHQG可通过恢复MICU2表达并调控氧化应激与解毒相关通路，从分子到生化层面缓解氧化损伤并促进肝组织修复。

3.3 从蛋白质组学与动物实验探讨HHQG缓解肝损伤氧化应激的作用机制

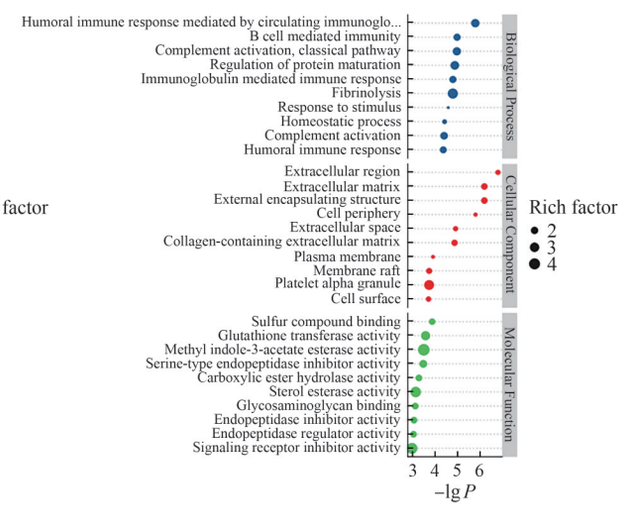
本研究旨在阐明HHQG在CCl_4诱导的急性肝损伤中对氧化应激相关蛋白的调控机制。为此，我们对损伤后48 h的肝组织开展了蛋白质组学分析（筛选阈值：$|\log_2 F_C| \geqslant \log_2 1.2$且$P<0.05$），并结合免疫组织化学对MICU2进行了时相验证。

在差异表达蛋白鉴定方面，与对照组相比，模型组共鉴定出1 578种差异表达蛋白（DEPs），其中1 087种上调、491种下调；与模型组比较，HHQG处理组鉴定出265种DEPs，上调122种、下调143种。

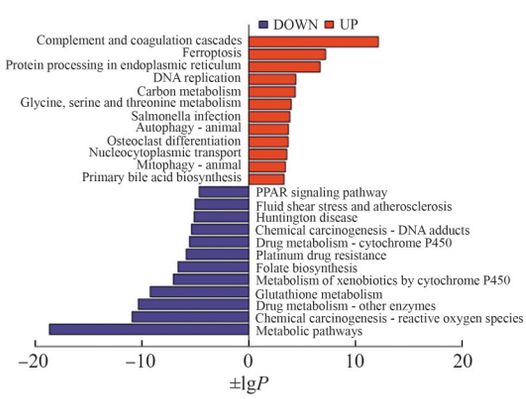
模型组的功能注释（GO）结果如图4（a）所示，生物过程主要富集于补体激活（经典途径）、应激反应及稳态调节，分子功能以调节谷胱甘肽转移酶活性和丝氨酸内肽酶抑制为主，细胞组分主要定位于细胞外基质/细胞外空间。HHQG组的GO富集分析结果如图4（b）所示，生物过程主要与钠离子跨膜转运调控和白细胞介素-5生成的正向调节相关，细胞组分主要涉及细胞外周、细胞膜、细胞间接触区与细胞骨架，分子功能主要包括肌动蛋白丝结合、乳酸跨膜转运、肌醇单磷酸酶活性及钠通道调节等。



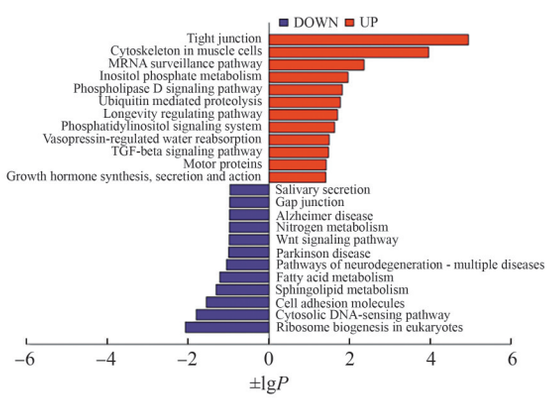
（a）模型组GEPs的GO富集分析



（b）HHQG组GEPs的GO富集分析



（c）模型组DEPs的KEGG富集分析



（d）HHQG组DEPs的KEGG富集分析

图4 CCl_4诱导肝损伤后48 h的模型组和HHQG干预组的蛋白质组学分析（$n=3$）

Fig. 4 Proteomic analysis of the model group and HHQG intervention group 48 hours after CCl_4-induced liver injury ($n=3$)

模型组的KEGG通路富集分析结果如图4(c)所示，上调通路显著富集铁死亡、内质网蛋白加工、泛自噬/线粒体自噬等，提示铁介导的脂质过氧化、内质网应激及自噬清除机制在损伤中被激活，可能加剧或反映氧化应激损伤；下调通路包含谷胱甘肽代谢、Chemical carcinogenesis-ROS、药物代谢-细胞色素P450及外源物质代谢等，表明抗氧化/解毒能力受损，ROS清除与代谢功能紊乱。HHQG干预组的KEGG通路富集分析结果如图4(d)所示，上调通路富集于泛素介导的蛋白水解、磷脂酶D、TGF-β与磷脂酰肌醇信号等，提示其可增强受损蛋白清除、调节与抗氧化相关的信号并有利于细胞应答与修复；下调通路包括与氧化应激、脂质过氧化和DNA损伤相关的病理通路(如阿尔茨海默病、帕金森病相关通路)、Wnt信号、脂肪酸/鞘脂代谢及胞质DNA感应通路，提示HHQG对这些促损伤通路具有抑制作用。

免疫组织化学结果如图5所示，对照组肝组织中MICU2表达极低或近乎未检出。在CCl_4诱导的肝损伤中，MICU2于24～48 h明显上调，并在该期达到峰值，随后在72～120 h逐步回落。MICU2蛋白的表达时相与转录组中MICU2 mRNA在中期(48～72 h)变化相一致，提示MICU2可能在肝损伤中期参与线粒体钙稳态及相关氧化应激反应的调控。

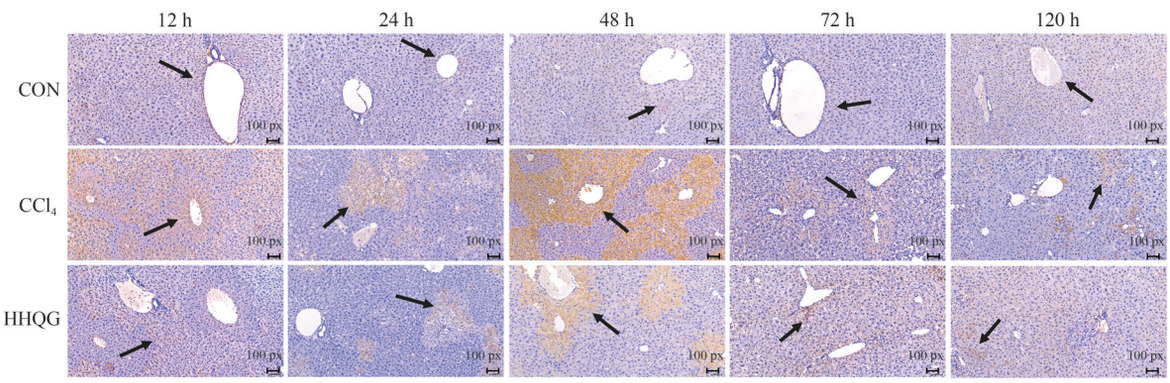


图5　CCl_4诱导肝损伤中MICU2蛋白表达及HHQG干预的免疫组化分析

Fig. 5　Immunohistochemical analysis of MICU2 protein expression and HHQG intervention in CCl_4-induced liver injury

3.4　肝损伤过程中MICU2表达与氧化应激水平之间的相关性分析

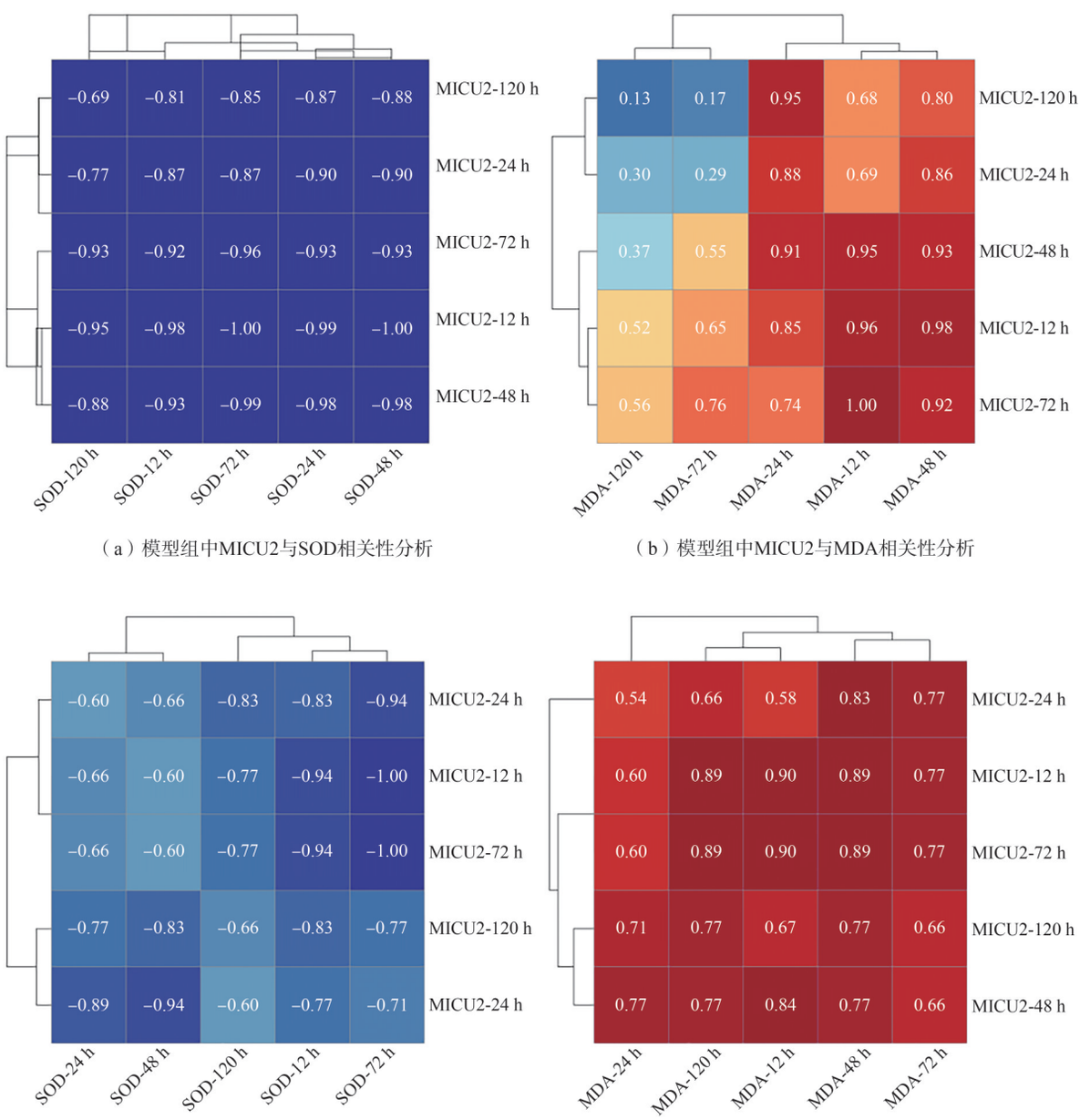
为评估MICU2与氧化应激的关联，进行Pearson相关性分析。如图6(a)所示，在模型组各时间点，MICU2与SOD呈负相关，相关系数－0.69～－1.00，表明MICU2表达升高伴随SOD活性下降，反之亦然。鉴于SOD为关键抗氧化酶，该负相关提示模型状态下MICU2的异常升高可能与抗氧化防御受损相关。如图6(b)所示，MICU2与MDA呈正相关，相关系数0.68～0.98，表明MICU2表达升高时脂质过氧化产物MDA水平亦升高。SOD为主要抗氧化酶，MDA反映脂质过氧化程度，上述相关模式提示，在病理状态下MICU2的高表达可能与抗氧化防御受损及脂质过氧化加重相关。

在HHQG干预组，相关关系发生逆转，如图6(c)所示，每个时间点MICU2与MDA呈负相关，相关系数－0.66～－0.84。如图6(d)所示，MICU2与SOD呈正相关，相关系数0.54～0.90，该变化表明HHQG可通过调节MICU2表达，使MICU2与抗氧化酶活性同向变化并抑制脂质过氧化，从而有助于缓解CCl_4诱导的氧化损伤。综上，MICU2与SOD、MDA之间的相关性在模型组与HHQG组间呈相反模式，支持MICU2在氧化应激调控中的重要作用，并提示其可能为HHQG发挥抗氧化保护的关键靶点。

3.5　分子对接预测HHQG关键活性成分对MICU2蛋白的调控位点与结合特性

为预测HHQG中活性成分是否可直接作用于线粒体钙通道调控子MICU2，利用前期研究[24]筛

选出来的5种治疗肝损伤的关键化合物(Apigenin、Emodin、Genistein、Kaempferol和Quercetin),采用PCSB PDB数据库中获得的MICU2三维结构作为受体模型,采用AutoDock Vina进行盲对接,搜索整个蛋白表面以识别可能的配体结合位点,并对得分靠前的结合构象进一步分析了分子间相互作用类型和关键残基。对接结果如图7所示,MICU2上存在两个反复出现的结合口袋:大口袋(体积约11219 Å^3,中心≈−4,40,115)和次大口袋(体积约7 397 Å^3,中心≈2,11,110)。多数配体的最佳位点集中于这两处,说明它们是受体上较稳健的结合位点。Vina打分排序为:Apigenin(−8.3)≈Emodin/Kaempferol/Quercetin(−8.2)>Genistein(−8.0),但差异≤0.3 kcal/mol,处于Vina误差范围内。



(a)模型组中MICU2与SOD相关性分析 (b)模型组中MICU2与MDA相关性分析

(c)HHQG组中MICU2与MDA相关性分析 (d)HHQG组中MICU2与SOD相关性分析

图6 不同组间不同采样时间点MICU2与SOD和MDA相关性分析

Fig. 6 Correlation analysis between MICU2 and SOD and MDA at different sampling time points across groups

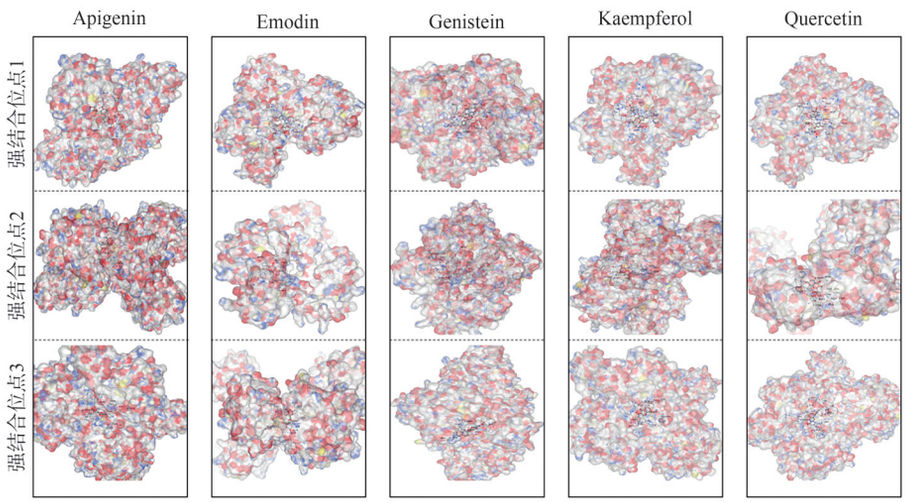


图 7　HHQG 关键活性成分与 MICU2 蛋白分子对接展示

Fig. 7　Molecular docking display of key active components of HHQG and MICU2 protein

4　讨论

本研究通过组织病理学、生化检测、转录组与蛋白质组学以及分子对接，系统揭示了复方 HHQG 对 CCl_4 诱导急性肝损伤的保护作用及可能机制。病理与血清学结果表明 CCl_4 所致损伤在 12～72 h 达高峰，HHQG 在早中期可显著减轻坏死、炎症和早期胶原沉积，并促进 ALT/AST、SOD、MDA 等指标的恢复，提示其主要作用于损伤发生后的早中期。

蛋白质组学显示 HHQG 可上调泛素-蛋白酶体相关通路并下调与氧化应激/脂质病理相关路径，提示 HHQG 有利于受损蛋白及细胞器的清除，缓解 ER 应激与自噬相关负担，两者合力促进组织修复。这种“限制损伤信号-增强代偿修复”的双向调控，解释了 HHQG 在短期内能够显著降低组织损伤并促进功能恢复的现象。

同时，本研究发现，MICU2 在中期（48～72 h）异常上调，且在模型组与 SOD、MDA 之间呈明显的负相关/正相关模式，提示 MICU2 上调可能与线粒体钙负荷增加、线粒体功能受损及 ROS 生成相关。HHQG 抑制 MICU2 上调并伴随 SOD 活性恢复与 MDA 下降，提示 HHQG 的抗氧化保护作用，部分通过调控线粒体钙通量与相关代谢通路，进而抑制铁死亡/脂质过氧化的激活。这一假说与文献[25]中线粒体钙过载促进氧化应激与细胞死亡的观点相符，但现有数据仍以相关性为主，需进一步功能验证。

分子对接提示 HHQG 若干活性成分与 MICU2 存在潜在结合位点，提供了小分子直接调节 MICU2 的可能性。但对接结果仅为预测结果，无法反映结合亲和力、动力学或膜/构象环境影响，需通过 SPR、ITC 等生物物理方法及体外细胞实验、位点突变来验证直接结合与功能影响。

尽管本研究通过多组学与多手段揭示了 MICU2 在 CCl_4 诱导急性肝损伤中的重要性，但仍存在若干局限需在后续工作中补充：目前结论主要基于时序表达、相关性分析与分子对接，尚缺乏 siRNA/CRISPR 敲降或过表达等功能性干预以证明因果；线粒体内 Ca^{2+} 动力学、ROS 动态、膜电位及呼吸代谢等功能性指标的实时监测不足，难以直接证实 MICU2 对线粒体稳态和氧化损伤的作用；分子对接依赖 AlphaFold 与短时 MD，需以 SPR/ITC 等体外结合实验及位点突变在细胞水平验证配体-靶标相互作用；观察到的转录与蛋白表达时序不一致提示可能存在翻译或降解等转录后调控，需要进一步解析；以整体肝组织测定可能掩盖不同细胞类型的特异性响应，拟引入单细胞或空间组学提高时空分辨率；此外，本研究仅限于急性模型，尚未评估在慢性纤维化或代谢性肝病中的疗效与安全性；为更全面刻画细胞死亡与自噬通路，还应补充铁死亡（ACSL4、GPX4）与自噬通量等标志物。

参考文献:

[1] LIU H H,LI A J. MiR-340 suppresses CCl_4-induced acute liver injury through exerting anti-inflammation targeting Sigirr[J]. European Review for Medical and Pharmacological Sciences,2020,24(20):10687-10695.

[2] BENNET R,ERIKSSON M,ZETTERSTRÖM R. Increasing incidence of neonatal septicemia:Causative organism and predisposing risk factors[J]. Acta Paediatrica Scandinavica,1981,70(2):207-210.

[3] ROHLEN N,THIMME R. Acute liver failure[J]. Dtsch Med Wochenschr,2025,150(7):371-384.

[4] LUO F X,ZHU B W,WU D,et al. Construction of phlorotannin-based nanoparticles for alleviating acute liver injury[J]. ACS Applied Materials & Interfaces,2023,15(40):47338-47349.

[5] ASSANI A D,BOLDEANU L,SILOŞI I,et al. Pregnancy under pressure:Oxidative stress as a common thread in maternal disorders[J]. Life,2025,15(9):1348.

[6] CHOI E K,LIM D G. Hepatic ischemia-reperfusion injury with respect to oxidative stress and inflammatory response:A narrative review[J]. J Yeungnam Med Sci,2023,40(2):115-122.

[7] 锡林其木格,吴玉小. 古日古木-13味丸在蒙医临床中的应用[J]. 中国民族医药杂志,2020,26(7):72-73.

[8] 杨宏昕,白音夫,常亮,等. 红花清肝十三味对CCl_4诱导大鼠肝损伤纤维化的作用[J]. 西北药学杂志,2018,33(3):349-352.

[9] 包旭,卞康坤,肖海军,等. 红花清肝十三味丸通过抑制炎性细胞浸润改善小鼠肝损伤的研究[J]. 畜牧与饲料科学,2024,45(1):1-10.

[10] SHAMSELDIN H E,ALASMARI A,SALIH M A,et al. A null mutation in MICU2 causes abnormal mitochondrial calcium homeostasis and a severe neurodevelopmental disorder[J]. Brain,2017,140(11):2806-2813.

[11] CUI C C,YANG J B,FU L W,et al. Progress in understanding mitochondrial calcium uniporter complex-mediated calcium signalling:A potential target for cancer treatment[J]. British Journal of Pharmacology,2019,176(9):1190-1205.

[12] 杨洁,闾宏伟. 线粒体钙单向转运体和线粒体应激关系的研究进展[J]. 生命科学研究,2016,20(2):178-182.

[13] 吴诗慧,龙潇云,赵邯涛,等. 独活醇提物对四氯化碳诱导小鼠急性肝损伤的保护作用及机制[J]. 中草药,2024,55(17):5867-5874.

[14] 李连辉,杨迪,臧开来,等. 跨膜蛋白166在肝脏脂质代谢中的作用及其机制[J]. 精准医学杂志,2025,40(4):283-289.

[15] 胡一帆,陈妙洋,熊清芳,等. 影像学和组织学诊断胆石症合并非酒精性脂肪性肝病的一致性研究[J]. 中国全科医学,2024,27(28):3546-3551.

[16] 董浩,江海圳,李超,等. 小鼠NR1D1基因过表达载体的构建及其生物信息学分析[J]. 吉林大学学报(医学版),2022,48(1):94-103.

[17] ZHANG X D,LI C X,WANG L C,et al. Analysis of *Centranthera grandiflora* benth transcriptome explores genes of catalpol,acteoside and azafrin biosynthesis[J]. International Journal of Molecular Sciences,2019,20(23):6034.

[18] PERTEA M,PERTEA G M,ANTONESCU C M,et al. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads[J]. Nat Biotechnol,2015,33(3):290-295.

[19] 刘问. 嗜水气单胞菌感染青鱼肝脏的蛋白质组学分析[J]. 水生生物学报,2019,20(23):330-339.

[20] 王祖文,沈以红,黄先智,等. 桑叶生物碱对肝纤维化小鼠的改善作用及机制[J]. 食品科学,2021,42(3):173-178.

[21] 周慧雨,牛立云,刘慧蒙,等. 药食同源组合物对小鼠急性酒精性肝损伤保护作用研究[J]. 食品与发酵工业,2023,49(20):259-264.

[22] ROBERT A,CROTTÈS D,BOURGEAIS J,et al. MICU2 up-regulation enhances tumor aggressiveness and metabolic reprogramming during colorectal cancer development[J]. PLoS Biol,2024,22(10):e3002854.

[23] LIU Y,GRIMM M,DAI W T,et al. CB-Dock:A web server for cavity detection-guided protein-ligand blind docking[J]. Acta Pharmacologica Sinica,2020,41(1):138-144.

[24] WANG L,BAO Y L,TONG H,et al. Traditional Mongolian medicine (HHQG) attenuates CCl_4-induced acute liver injury through inhibiting monocyte/macrophage infiltration via the p-P38/p-JNK pathway[J]. Journal of Ethnopharmacology,2022,293:115152.

[25] SANTULLI G,XIE W J,REIKEN S R,et al. Mitochondrial calcium overload is a key determinant in heart failure[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2015,112(36):11389-11394.

[26] LIU H, WANG R, OUYANG H J, et al. Cadmium induced mouse spermatogonia apoptosis via mitochondrial calcium overload mediated by IP3R-MCU signal pathway[J]. Toxicology, 2023, 486: 153448.

（责任编委　那顺布和）

Mechanism of Honghua Qinggan Shisanwei Pills in Regulating MICU2 to Alleviate Oxidative Stress and Protect Against Liver Injury

ZHAO Linyun[1], ZHANG Xin[1], XI Zimeng[1], ZHANG Quan[1], SU Shuting[2], NING Chang[2], MA Chunli[1], BAO Yulong[1]

(1. *School of Basic Medicine, Inner Mongolia Medical University, Hohhot* 010110, *China*; 2. *The First Clinical Medical College of Inner Mongolia Medical University, Inner Mongolia Medical University, Hohhot* 010110, *China*)

Abstract: To investigate the protective effects of Honghua Qinggan Shisanwei Pills (HHQG) against carbon tetrachloride (CCl_4)-induced acute liver injury in mice and to elucidate the underlying molecular mechanisms, with a particular focus on the role of mitochondrial calcium uniporter 2 (MICU2) in oxidative stress regulation. Histopathological changes were evaluated by hematoxylin and eosin and Masson's trichrome staining, together with serum biochemical parameters and hepatic oxidative stress markers. Time-series RNA sequencing was performed across multiple phases (12–120 h) and key genes were validated by quantitative PCR. Differentially expressed proteins were identified by proteomic analysis and further examined by functional enrichment and time-dependent immunohistochemistry. Pearson correlation analysis was used to assess the relationships between MICU2 expression and oxidative stress indicators. Molecular docking (AutoDock Vina) was conducted to predict the binding of major active components of HHQG (apigenin, emodin, genistein, kaempferol, and quercetin) to MICU2. CCl_4 exposure induced marked hepatic structural damage, inflammatory infiltration, and early collagen deposition between 12 and 72 h, accompanied by peak elevations in serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST). HHQG treatment significantly alleviated histopathological injury, suppressed inflammation and collagen accumulation, and partially or completely restored ALT, AST, superoxide dismutase (SOD), and malondialdehyde (MDA) levels. MICU2 expression was significantly increased during the mid-phase of injury (48–72 h), whereas HHQG effectively suppressed this abnormal upregulation. In the model group, MICU2 expression showed a significant negative correlation with SOD activity and a positive correlation with MDA levels ($P<0.05$); notably, these correlations were reversed following HHQG intervention. Proteomic analysis supported the regulatory effects of HHQG on detoxification, protein quality control, and antioxidant defense. Molecular docking identified two potential binding pockets on MICU2, with all five compounds exhibiting favorable binding affinities, among which apigenin showed the strongest interaction. HHQG protects against CCl_4-induced acute liver injury by enhancing antioxidant capacity and modulating MICU2-associated mitochondrial calcium homeostasis, highlighting MICU2 as a potential molecular target underlying the hepatoprotective effects of HHQG.

Key words: Honghua Qinggan Shisanwei Pills (HHQG); MICU2; oxidative stress; acute liver injury