

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2024.05.019

论著·基础

川陈皮素调节 RIP1/RIP3/MLKL 信号通路对慢性心力衰竭大鼠心肌坏死性凋亡的影响

张鹏, 林桂雄, 卓裕丰, 程宏基, 陈钦修, 谢文杰, 冯燕玲



基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金项目(2021B1551140064); 广州市科技计划项目(202102080548)

作者单位: 511400 广州市番禺区何贤纪念医院心内科

通信作者: 冯燕玲, E-mail: 38135628@qq.com

【摘要】 目的 探究川陈皮素(Nob)调节受体相互作用蛋白激酶 1/受体相互作用蛋白激酶 3/混合谱系激酶样结构域蛋白(RIP1/RIP3/MLKL)信号通路对慢性心力衰竭(CHF)大鼠心肌坏死性凋亡的影响及作用机制。方法 于 2022 年 9 月—2023 年 3 月在南方医科大学中心实验室进行实验。建立大鼠 CHF 模型,将造模成功的 75 只大鼠按随机数字表法分为模型组(CHF 组)、川陈皮素低剂量组(Nob-L 组, $7.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ Nob)、川陈皮素中剂量组(Nob-M 组, $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ Nob)、川陈皮素高剂量组(Nob-H 组, $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ Nob)和通路抑制剂 Necrostatin-1 组(Nec-1 组, $2.45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ Nec-1),每组 15 只。另取 15 只大鼠作为假手术组(Sham 组)只打开胸腔不进行结扎。干预 28 d 后,采用超声心动图检测左心室功能;酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-1 β (IL-1 β)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)和总抗氧化能力(T-AOC)水平;苏木精-伊红(HE)和马松(Masson)染色观察心肌组织病理变化及纤维化情况;原位末端转移酶标记技术(TUNEL)观察心肌组织凋亡情况;蛋白质印迹法(Western blot)检测心肌组织 RIP1、RIP3、MLKL 磷酸化水平及半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶(Caspase-8)蛋白表达。结果 与 Sham 组比较,CHF 组心肌组织部分细胞损伤坏死、结构紊乱、心肌细胞肿胀、有大量的炎性细胞浸润,心肌组织胶原蛋白沉积和纤维化增加,与 CHF 组比较,Nob-L 组、Nob-M 组、Nob-H 组和 Nec-1 组心肌纤维排列逐渐规则、心肌细胞肿胀、坏死及炎性细胞浸润减少、胶原沉积和纤维化减少。与 Sham 组比较,CHF 组左心室舒张末期内径(LVEDD)、左心室收缩末期内径(LVESD)、IL-1 β 、TNF- α 和 MDA 水平、细胞凋亡率、p-RIP1/RIP1、p-RIP3/RIP3、p-MLKL/MLKL 表达显著增加,左心室射血分数(LVEF)、左心室轴缩短分数(FS)、SOD 和 T-AOC 水平、Caspase-8 表达显著降低;与 CHF 组比较,Nob-L 组、Nob-M 组、Nob-H 组、Nec-1 组上述指标均改善($F/P = 102.557 / < 0.001, 117.684 / < 0.001, 364.401 / < 0.001, 268.087 / < 0.001, 124.566 / < 0.001, 229.003 / < 0.001, 193.585 / < 0.001, 182.164 / < 0.001, 142.657 / < 0.001, 140.900 / < 0.001, 169.680 / < 0.001, 103.485 / < 0.001, 108.277 / < 0.001, 200.435 / < 0.001$),且 Nob-L 组、Nob-M 组、Nob-H 组的干预效果呈剂量依赖性($P < 0.05$)。结论 Nob 可能通过抑制 RIP1/RIP3/MLKL 信号通路的激活,减轻炎症反应及氧化应激,抑制 CHF 大鼠的心肌坏死性凋亡,对 CHF 大鼠发挥保护作用。

【关键词】 慢性心力衰竭;川陈皮素;RIP1/RIP3/MLKL 信号通路;炎症反应;氧化应激;坏死性凋亡;大鼠**【中图分类号】** R541.6 **【文献标识码】** A

The effect of Nobiletin regulating the RIP1/RIP3/MLKL signaling pathway on myocardial necrotic apoptosis in rats with chronic heart failure Zhang Peng, Lin Guixiong, Zhuo Yufeng, Cheng Hongji, Chen Qinxiu, Xie Wenjie, Feng Yanling. Department of Internal Medicine-Cardiovascular, Panyu Hexian Memorial Hospital of Guangzhou, Guangdong Province, Guangzhou 511400, China

Funding program: Guangdong Basic and Applied Basic Research Fund Project (2021B1551140064); Guangzhou Science and Technology Plan Project (202102080548)

Corresponding author: Feng Yanling, E-mail: 38135628@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect and mechanism of Nobiletin (Nob) on necrotic apoptosis in chronic heart failure (CHF) rats by regulating the receptor interacting protein kinase 1/receptor interacting protein kinase 3/mixed lineage kinase like domain protein (RIP1/RIP3/MLKL) signaling pathway. **Methods** From September 2022 to March 2023, experiment was conducted in Central Laboratory of Southern Medical University. A CHF rat model was established, and 75 suc-

cessfully modeled rats were randomly divided into model group (CHF group), low-dose Nob group (Nob-L group, $7.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ Nob), medium dose Nob group (Nob-M group, $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ Nob), high-dose Nob group (Nob-H group, $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ Nob), and pathway inhibitor Nec-1 group (Nec-1 group, $2.45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ Nec-1) according to the random number table method, with 15 rats in each group. Another 15 rats were selected as the sham operation group (Sham group), with only the thoracic cavity opened and no ligation performed. Echocardiography was applied to detect and detect left ventricular function. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was applied to detect the levels of serum tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), and total antioxidant capacity (T-AOC). Hematoxylin eosin (HE) and Masson staining were applied to observe the pathological changes and fibrosis of myocardial tissue. The terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) was applied to observe the apoptosis of myocardial tissue. Western blot was applied to detect RIP1, RIP3, MLKL phosphorylation levels, and Caspase-8 protein expression. **Results** Compared with the Sham group, some cells in the myocardial tissue of the CHF group were damaged, necrotic, structurally disordered, with myocardial cell swelling, a large number of inflammatory cell infiltration, and collagen deposition and fibrosis in myocardial tissue increased, Compared with the CHF group, the myocardial fiber arrangement of the Nob-L group, Nob-M group, Nob-H group, and Nec-1 group gradually became regular, with myocardial cell swelling, necrosis, and the inflammatory cell infiltration decreased, collagen deposition and fibrosis decreased. Compared with the Sham group, the levels of left ventricular end diastolic diameter (LVEDD), left ventricular end systolic diameter (LVESD), IL-1 β , TNF- α and MDA, cell apoptosis rate, and the expression of p-RIP1/RIP1, p-RIP3/RIP3, and p-MLKL/MLKL proteins of the CHF group, Nob-L group, Nob-M group, Nob-H group and Nec-1 group were obviously increased ($P < 0.05$), the levels of left ventricular ejection fraction (LVEF), left ventricular axis shortening fraction (FS), SOD, T-AOC, and the expression of Caspase-8 protein of the CHF group, Nob-L group, Nob-M group, Nob-H group and Nec-1 group were obviously reduced ($F/P = 102.557 / < 0.001, 117.684 / < 0.001, 364.401 / < 0.001, 268.087 / < 0.001, 124.566 / < 0.001, 229.003 / < 0.001, 193.585 / < 0.001, 182.164 / < 0.001, 142.657 / < 0.001, 140.900 / < 0.001, 169.680 / < 0.001, 103.485 / < 0.001, 108.277 / < 0.001, 200.435 / < 0.001$), and the intervention effect of different dosage groups of Nob showed a dose-dependent relationship ($P < 0.05$). **Conclusion** Nob may alleviate inflammation and oxidative stress by inhibiting the activation of the RIP1/RIP3/MLKL signaling pathway, inhibit necrotic apoptosis in CHF rats, and exert a protective effect on CHF rats.

【Key words】 Chronic heart failure; Nobiletin; RIP1/RIP3/MLKL signaling pathway; Inflammatory response; Oxidative stress; Necrotic apoptosis; Rat

慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)是一种临床综合征,其特征是心脏的结构/功能异常导致的心脏收缩或舒张功能障碍。心力衰竭是各种心脏疾病的严重和终末阶段,是当今主要的心血管病之一,其发病率较高,对患者呼吸、生活质量等产生极大影响。目前通过改善生活方式、单独或联合使用利尿剂、血管紧张素转化酶抑制药、地高辛、伊伐布雷定等药物治疗心力衰竭,虽取得一定效果,但对 CHF 的治疗仍是一个巨大的挑战^[1]。川陈皮素(Nobiletin, Nob)是从柑橘类水果皮中获得的类黄酮,具有抗炎、抗氧化等广泛的药理活性^[2]。研究表明 Nob 能恢复受损的心脏收缩功能,减弱心肌细胞凋亡,改善大鼠心肌缺血和再灌注损伤^[3]。坏死性凋亡是一种受调节的坏死形式^[4],由受体相互作用蛋白激酶(receptor-interacting protein kinase, RIP)1 和 RIP3 与混合谱系激酶结构域样蛋白(mixed lineage kinase domain-like protein, MLKL)介导。RIP1 是引发坏死性凋亡的关键分子, RIP3 的表达与坏死性凋亡有关, MLKL 是 RIP3 的重要底物,也是在

坏死性凋亡中起一定作用的重要信号分子^[5]。据报道坏死性凋亡参与心血管疾病的发病机制,激活 RIP1/RIP3/MLKL 途径会促进坏死^[6-7]。Zhang 等^[8]的研究显示抑制 RIP1、RIP3 和 MLKL 表达,可抑制 RIP1/RIP3/MLKL 介导的心肌细胞坏死,能够改善心力衰竭中的心肌重塑和功能。Nob 能改善心功能不全,也能通过 NBP1 活性的功能调节抑制心肌细胞肥大和心力衰竭的发展,有望成为治疗心力衰竭的潜在药物^[9], RIP1/RIP3/MLKL 信号通路介导坏死性凋亡,因此,推测 Nob 可能通过调节 RIP1/RIP3/MLKL 信号通路对 CHF 大鼠心肌坏死性凋亡产生影响,基于此,本实验对其进行探究,为 CHF 的治疗提供理论依据,报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:SPF 级雄性大鼠 95 只,体质量(220 ± 10)g,购自上海吉辉实验动物饲养有限公司, [许可证:SCXK(沪)2022-0009];所有大鼠在温度($24 \pm$

2)℃,湿度 55%~60%,光照/黑暗循环 12 h 及自由采食饮水条件下适应性喂养。本实验经南方医科大学动物实验委员会批准[伦(审)2021-107]。

1.1.2 主要药物、试剂及仪器:Nob(HY-N0155)购自 MCE 公司;通路抑制剂 Necrostatin-1(S8037)购自 Scellck 公司;肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)(R980536)和白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)(R980521)酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测试剂盒购自上海麦克林生化科技股份有限公司;丙二醛(malondialdehyde, MDA)(CB10238-Ra)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)(CB10258-Ra)和总抗氧化能力(total antioxidation capability, T-AOC)(CB11081-Ra)ELISA 检测试剂盒购自上海科艾博生物技术有限公司;原位末端转移酶标记技术(TUNEL)检测试剂盒(P-CA-303)购自武汉普诺赛生命科技有限公司;一抗 RIP1(A7414)、p-RIP1(API230)、RIP3(A5431)、p-RIP3(API408)、MLKL(A19685)、p-MLKL(API244)、半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶(Caspase-8)(A0215)、 β -actin(AC038)和二抗山羊抗兔免疫球蛋白 G(IgG)(AS063)购自武汉爱博泰克生物科技有限公司。

小动物超声设备(6 LAB,北京益仁恒业科技有限公司)、光学显微镜(BX53M)OLYMPUS;共聚焦显微镜(Mica,德国 Leica 公司);Thermo-max 酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);蛋白电泳仪、转膜仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法 于 2022 年 9 月—2023 年 3 月在南方医科大学中心实验室进行实验。

1.2.1 CHF 大鼠模型建立及分组处理:根据参考文献[10]建立 CHF 大鼠模型。随机选取 80 只大鼠麻醉消毒后,打开胸腔,于左前降支冠状动脉起源点 3~4 mm 处结扎来诱导慢性心力衰竭症状。大鼠的左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF) < 60%,被认为成功建立 CHF 大鼠模型。因感染等原因,死亡 5 只,成功 75 只。另取 15 只大鼠作为假手术组(Sham 组)只打开胸腔不进行结扎,将造模成功的 CHF 大鼠 75 只按照随机数字表法分为模型组(CHF 组)、Nob 低剂量组(Nob-L 组)、Nob 中剂量组(Nob-M 组)、Nob 高剂量组(Nob-H 组)和通路抑制剂 Necrostatin-1 组(Nec-1 组),每组 15 只。Nob-L 组、Nob-M 组和 Nob-H 组,分别腹腔注射 $7.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、 $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 和 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的 Nob^[11], Nec-1 组腹腔注射 $2.45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的通路抑制剂 Necrostatin-1^[12]。Sham 组和 CHF 组大鼠腹腔注射等

量生理盐水,连续药物干预 28 d。

1.2.2 左心室功能检测:末次给药后,使用超声心动图检测并记录大鼠左心室舒张末期内径(left ventricular end diastolic diameter, LVEDD)、左心室收缩末期内径(left ventricular systolic diameter, LVESD)及 LVEF、左心室轴缩短分数(fractional shortening, FS)。

1.2.3 血清炎症因子水平检测:将大鼠麻醉,采取腹主动脉血 0.5 ml,离心(3 000 r/min, 10 min)收集上清液,严格按照 ELISA 试剂盒操作,检测血清中 TNF- α 、IL-1 β 水平。

1.2.4 心肌组织中氧化应激指标检测:各组随机取 5 只大鼠安乐死,取出心肌组织,磨碎匀浆,离心后取上清液,严格按照 ELISA 试剂盒操作,检测心肌组织中 MDA、SOD 和 T-AOC 水平。

1.2.5 心肌组织病理变化及纤维化检测:各组随机取 5 只大鼠处死,取出心肌组织,固定并进行石蜡包埋、切片、进行苏木精—伊红(hematoxylin-eosin, HE)和马松(Masson)染色,光学显微镜下拍照观察心肌组织病理变化及纤维化情况。

1.2.6 心肌组织凋亡检测:取 1.2.5 中石蜡切片,将切片与 TUNEL 染色液孵育 60 min,后与 4',6-二脒基-2-苯基吡啶溶液孵育 10 min 复染细胞核,共聚焦显微镜下拍照观察,并计算细胞凋亡率。

1.2.7 相关蛋白表达检测:各组剩余 5 只大鼠处死,使用放射性免疫沉淀法缓冲液裂解 1.2.4 中的心肌组织提取蛋白质,二喹啉甲酸试剂定量。将蛋白质样品进行 10% SDS-PAGE 凝胶,后转到聚偏氟乙烯膜上。5% 脱脂乳封闭 1 h(室温),将膜与一抗 RIP1、p-RIP1、RIP3、p-RIP3、MLKL、p-MLKL、Caspase-8 和 β -actin 在 4℃ 下过夜,后与第二抗体孵育 1 h(室温),增强型化学发光试剂显影。使用 Image J 软件量化蛋白质条带的强度。

1.3 统计学方法 应用 SPSS 20.0 软件分析。符合正态分布计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Nob 对 CHF 大鼠左心室功能的影响 与 Sham 组比较,CHF 组大鼠 LVEDD 和 LVESD 显著增加($P < 0.05$),LVEF 和 FS 显著降低($P < 0.05$)。与 CHF 组比较,Nob-L 组、Nob-M 组、Nob-H 组和 Nec-1 组 LVEDD 和 LVESD 显著降低($P < 0.05$),LVEF 和 FS 显著增加($P < 0.05$),且 Nob 不同剂量组的干预效果呈剂量依赖性,Nob-H 组与 Nec-1 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

表 1 Nob 对 CHF 大鼠左心室功能的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Effects of Nob on left ventricular function in CHF rats

组别	n	LVEDD(mm)	LVESD(mm)	LVEF(%)	FS(%)
Sham 组	15	8.12 ± 0.12	4.76 ± 0.32	87.37 ± 6.62	48.36 ± 3.27
CHF 组	15	13.75 ± 1.07 ^a	9.21 ± 0.83 ^a	48.62 ± 4.35 ^a	23.15 ± 1.48 ^a
Nob-L 组	15	11.94 ± 0.92 ^b	8.08 ± 0.67 ^b	56.43 ± 4.81 ^b	29.07 ± 2.51 ^b
Nob-M 组	15	10.51 ± 0.86 ^{bc}	6.73 ± 0.59 ^{bc}	69.28 ± 5.11 ^{bc}	36.42 ± 3.16 ^{bc}
Nob-H 组	15	9.32 ± 0.64 ^{bcd}	5.65 ± 0.54 ^{bcd}	81.05 ± 5.07 ^{bcd}	43.84 ± 3.92 ^{bcd}
Nec-1 组	15	9.28 ± 0.75 ^b	5.09 ± 0.71 ^b	84.54 ± 4.93 ^b	45.23 ± 2.84 ^b
F 值		102.557	117.684	140.900	169.680
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 Sham 组比较,^a $P < 0.05$;与 CHF 组比较,^b $P < 0.05$;与 Nob-L 组比较,^c $P < 0.05$;与 Nob-M 组比较,^d $P < 0.05$ 。

2.2 Nob 对 CHF 大鼠血清炎性因子水平的影响 与 Sham 组比较,CHF 组 IL-1 β 和 TNF- α 水平显著增加 ($P < 0.05$)。与 CHF 组比较,Nob-L 组、Nob-M 组、Nob-H 组和 Nec-1 组 IL-1 β 和 TNF- α 水平显著降低 ($P < 0.05$),且 Nob 不同剂量组的干预效果呈剂量依赖性,Nob-H 组与 Nec-1 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 2。

表 2 Nob 对 CHF 大鼠血清炎性因子水平的影响 ($\bar{x} \pm s, \text{ng/L}$)

Tab.2 Effect of Nob on serum inflammatory factor levels in CHF rats

组别	n	IL-1 β	TNF- α
Sham 组	15	65.79 ± 5.42	91.43 ± 10.27
CHF 组	15	217.62 ± 22.41 ^a	305.15 ± 26.48 ^a
Nob-L 组	15	165.37 ± 15.83 ^b	243.64 ± 21.53 ^b
Nob-M 组	15	138.91 ± 14.76 ^{bc}	172.59 ± 18.62 ^{bc}
Nob-H 组	15	86.43 ± 9.15 ^{bcd}	116.37 ± 13.86 ^{bcd}
Nec-1 组	15	81.54 ± 9.62 ^b	110.82 ± 15.35 ^b
F 值		364.401	268.087
P 值		<0.001	<0.001

注:与 Sham 组比较,^a $P < 0.05$;与 CHF 组比较,^b $P < 0.05$;与 Nob-L 组比较,^c $P < 0.05$;与 Nob-M 组比较,^d $P < 0.05$ 。

2.3 Nob 对 CHF 大鼠心肌组织中氧化应激指标的影响 与 Sham 组比较,CHF 组 MDA 水平显著增加 ($P < 0.05$),SOD 和 T-AOC 水平显著降低 ($P < 0.05$)。与 CHF 组比较,Nob-L 组、Nob-M 组、Nob-H 组和 Nec-1 组 MDA 水平显著降低 ($P < 0.05$),SOD 和 T-AOC 水平显著增加 ($P < 0.05$),且 Nob 不同剂量组的干预效果呈剂量依赖性,Nob-H 组与 Nec-1 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 3。

2.4 Nob 对 CHF 大鼠心肌组织病理变化及纤维化的影响 与 Sham 组比较,CHF 组心肌组织结构紊乱、心肌细胞肿胀、有大量的炎性细胞浸润,胶原蛋白沉积和纤维化增加。与 CHF 组比较,Nob-L 组、Nob-M 组、Nob-H 组和 Nec-1 组心肌纤维排列逐渐规则,心肌细

胞肿胀及炎性细胞浸润减少、胶原沉积和纤维化减少,见图 1 和图 2。

表 3 Nob 对 CHF 大鼠心肌组织中氧化应激指标的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.3 Effects of Nob on oxidative stress indicators in myocardial tissue of CHF rats

组别	n	MDA(nmol/ml)	SOD(U/ml)	T-AOC(U/mg)
Sham 组	5	1.62 ± 0.11	137.43 ± 7.89	34.62 ± 2.87
CHF 组	5	4.06 ± 0.28 ^a	74.65 ± 3.14 ^a	11.23 ± 0.96 ^a
Nob-L 组	5	3.35 ± 0.23 ^b	86.18 ± 3.56 ^b	17.85 ± 1.32 ^b
Nob-M 组	5	2.72 ± 0.19 ^{bc}	107.94 ± 5.28 ^{bc}	24.17 ± 1.68 ^{bc}
Nob-H 组	5	1.94 ± 0.12 ^{bcd}	124.29 ± 5.35 ^{bcd}	31.59 ± 2.15 ^{bcd}
Nec-1 组	5	1.73 ± 0.20 ^b	130.37 ± 6.62 ^b	32.34 ± 2.35 ^b
F 值		124.566	103.485	108.277
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:与 Sham 组比较,^a $P < 0.05$;与 CHF 组比较,^b $P < 0.05$;与 Nob-L 组比较,^c $P < 0.05$;与 Nob-M 组比较,^d $P < 0.05$ 。

2.5 Nob 对 CHF 大鼠心肌组织凋亡的影响 与 Sham 组比较,CHF 组细胞凋亡率显著增加 ($P < 0.05$)。与 CHF 组比较,Nob-L 组、Nob-M 组、Nob-H 组和 Nec-1 组细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$),且 Nob 不同剂量组的干预效果呈剂量依赖性,Nob-H 组与 Nec-1 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见图 3 和表 4。

表 4 Nob 对 CHF 大鼠心肌组织凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.4 The effect of Nob on myocardial tissue apoptosis in CHF rats

组别	n	细胞凋亡率(%)
Sham 组	5	3.47 ± 0.10
CHF 组	5	32.86 ± 2.75 ^a
Nob-L 组	5	26.15 ± 2.03 ^b
Nob-M 组	5	18.39 ± 1.64 ^{bc}
Nob-H 组	5	9.73 ± 0.78 ^{bcd}
Nec-1 组	5	7.92 ± 1.46 ^b
F 值		229.003
P 值		<0.001

注:与 Sham 组比较,^a $P < 0.05$;与 CHF 组比较,^b $P < 0.05$;与 Nob-L 组比较,^c $P < 0.05$;与 Nob-M 组比较,^d $P < 0.05$ 。

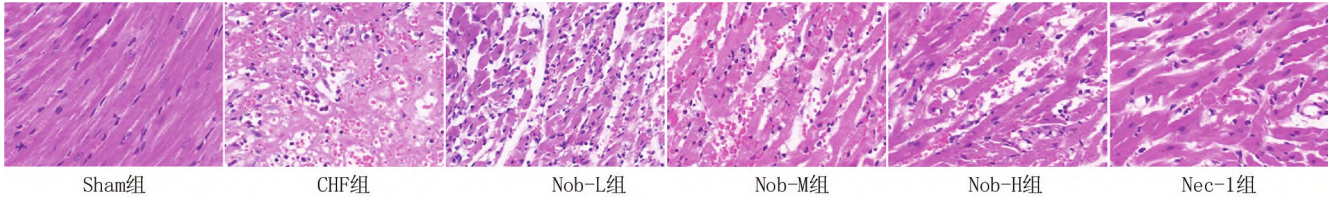


图 1 各组大鼠心肌组织病理变化(HE 染色, ×400)

Fig. 1 HE staining observation of pathological changes in myocardial tissue of rats in each group (× 400)

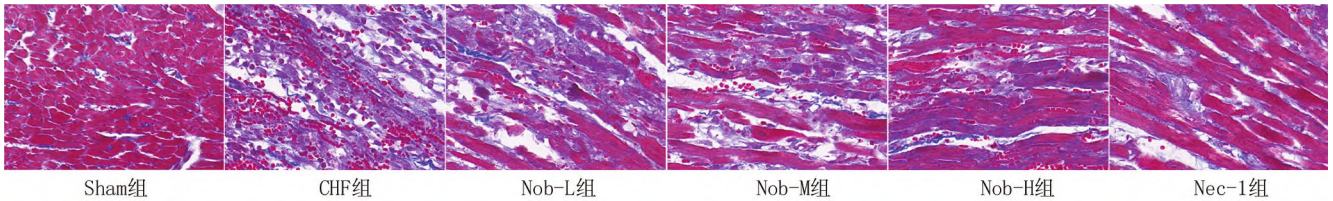


图 2 各组大鼠心肌组织纤维化情况(Masson 染色, ×400)

Fig. 2 Masson staining observation of myocardial tissue fibrosis in each group of rats (× 400)

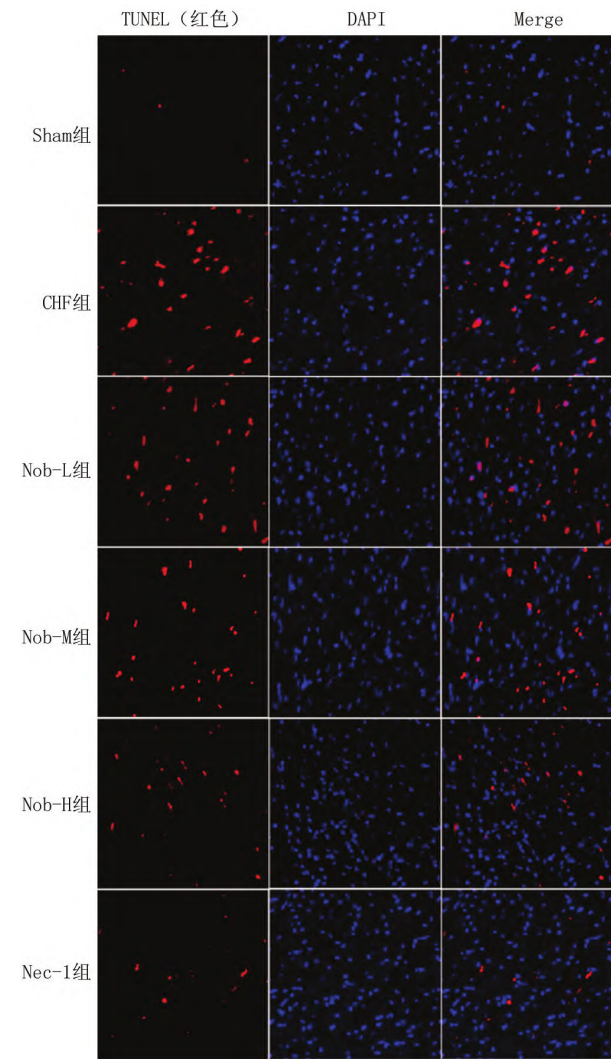
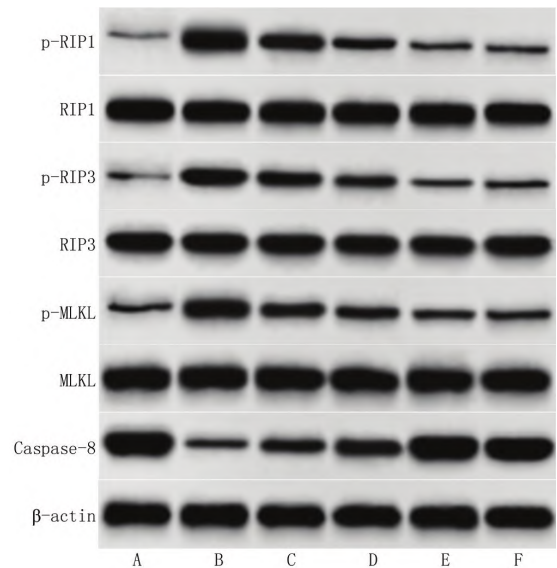


图 3 TUNEL 检测各组大鼠心肌组织凋亡情况

Fig. 3 TUNEL detection of myocardial tissue apoptosis in each group of rats

2.6 Nob 对 CHF 大鼠心肌组织 RIP1、RIP3、MLKL 和 Caspase-8 蛋白表达的影响 与 Sham 组比较, CHF 组 p-RIP1/RIP1、p-RIP3/RIP3、p-MLKL/MLKL 表达显著增加($P < 0.05$), Caspase-8 表达显著降低($P < 0.05$)。与 CHF 组比较, Nob-L 组、Nob-M 组、Nob-H 组和 Nec-1 组 p-RIP1/RIP1、p-RIP3/RIP3、p-MLKL/MLKL 表达显著降低 ($P < 0.05$), Caspase-8 表达显著增加 ($P < 0.05$), 且 Nob 不同剂量组的干预效果呈剂量依赖性, Nob-H 组与 Nec-1 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 4 和表 5。



注: A. Sham 组; B. CHF 组; C. Nob-L 组; D. Nob-M 组; E. Nob-H 组; F. Nec-1 组

图 4 Western-blot 检测各组大鼠心肌组织 RIP1、RIP3、MLKL 和 Caspase-8 蛋白水平

Fig. 4 Western blot detection of RIP1, RIP3, MLKL, and Caspase-8 protein levels in myocardial tissue of rats in each group

表 5 Nob 对 CHF 大鼠心肌组织 p-RIP1/RIP1、p-RIP3/RIP3、p-MLKL/MLKL 和 Caspase-8 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 5 Effects of Nob on the protein expression of p-RIP1/RIP1, p-RIP3/RIP3, p-MLKL/MLKL, and Caspase-8 in myocardial tissue of CHF rats

组别	n	p-RIP1/RIP1	p-RIP3/RIP3	p-MLKL/MLKL	Caspase-8
Sham 组	5	0.10 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.21 ± 0.02	1.36 ± 0.11
CHF 组	5	0.94 ± 0.10 ^a	0.89 ± 0.07 ^a	0.97 ± 0.11 ^a	0.25 ± 0.01 ^a
Nob-L 组	5	0.75 ± 0.08 ^b	0.67 ± 0.08 ^b	0.62 ± 0.05 ^b	0.51 ± 0.03 ^b
Nob-M 组	5	0.46 ± 0.05 ^{bc}	0.48 ± 0.05 ^{bc}	0.48 ± 0.03 ^{bc}	0.84 ± 0.06 ^{bc}
Nob-H 组	5	0.16 ± 0.02 ^{bcd}	0.24 ± 0.03 ^{bcd}	0.30 ± 0.03 ^{bcd}	1.29 ± 0.08 ^{bcd}
Nec-1 组	5	0.14 ± 0.01 ^b	0.19 ± 0.02 ^b	0.27 ± 0.02 ^b	1.31 ± 0.10 ^b
F 值		193.585	182.164	142.657	200.435
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 Sham 组比较,^a $P < 0.05$;与 CHF 组比较,^b $P < 0.05$;与 Nob-L 组比较,^c $P < 0.05$;与 Nob-M 组比较,^d $P < 0.05$ 。

3 讨论

Nob 是一种黄酮类化合物,主要从柑橘类植物的果皮中分离出来,具有抗炎和抗氧化活性,对心血管疾病发挥保护作用^[13]。研究显示,Nob 能通过抑制铁死亡减轻 2 型糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤^[14]。Nob 能改善大鼠心功能不全,减少氧化应激,抑制心肌细胞凋亡,从而减轻冠状动脉微栓塞诱导的心肌损伤^[15]。Nob 对心肌细胞具有抗肥大作用,在抑制 CHF 发展中具有治疗作用^[9]。

本研究采用结扎左前降支冠状动脉来诱导 CHF,该方法对心力衰竭病理的模拟较理想,在实验中比较常用,且操作简单,模型有效且可重复^[16]。研究显示 CHF 患者心脏压力升高,心室收缩障碍,最终导致 LVEDD 和 LVESD 升高,LVEF 和 LVFS 降低^[17]。本研究中 Nob 可降低 LVEDD 和 LVESD,增加 LVEF 和 FS,抑制心肌组织炎性浸润、胶原蛋白沉积、纤维化和心肌细胞凋亡,表明 Nob 能改善 CHF 大鼠心脏功能损伤及炎性反应,发挥保护作用。

炎症反应和氧化应激在 CHF 中起重要作用,炎症反应导致胶原蛋白沉积,过度的氧化应激导致心力衰竭的心肌重塑,氧化分子的减少和抗氧化物质的升高可以减轻心肌细胞损伤并缓解 CHF^[18-19]。有研究显示,坏死性凋亡可引发炎症反应和氧化应激的发生,TNF- α 在坏死性凋亡的启动中起关键作用,TNF- α 结合并激活肿瘤坏死因子受体 1 (tumor necrosis factor receptor 1, TNFR1),引起 RIP1 和 RIP3 的积累和磷酸化,而 RIP1/RIP3 作为程序性坏死中的关键信号分子,其形成的复合体启动下游信号 MLKL 转导并导致 MLKL 磷酸化,破坏细胞的完整性、促进坏死体的形成和触发坏死性凋亡,进而促进 TNF- α 、IL-1 β 等炎症因子及 ROS 的释放,增强炎症反应及氧化应激^[20-21]。Marunouchi 等^[22] 研究表明 Hsp90 抑制剂通过 RIP1、

RIP3 和 MLKL 活化来减轻 TNF- α 诱导的坏死细胞死亡。MDA、SOD 和 T-AOC 是心血管疾病常见的氧化应激指标,MDA 是氧化代谢产物,能反映氧自由基对正常细胞的损伤程度,SOD 可抑制氧化自由基损伤,T-AOC 反映机体的总抗氧化能力,及时调节氧化应激水平对 CHF 的治疗有重要作用^[23]。本研究中 Nob 治疗后 IL-1 β 、TNF- α 和 MDA 水平降低,SOD 和 T-AOC 水平增加,表明 Nob 可以抑制 CHF 大鼠体内炎症因子的分泌,增强抗氧化能力,缓解炎症反应及氧化损伤,进而改善 CHF 大鼠心脏功能,抑制 CHF 大鼠心肌坏死性凋亡,这与 Nob 所具有的抗炎及抗氧化作用一致。

坏死性凋亡(程序性坏死的一种形式)是由一组复杂的蛋白质协调的程序性过程,受 RIP1/RIP3/MLKL 途径调节,RIP1/RIP3/MLKL 信号通路的激活导致阳离子稳态的破坏、质膜破裂,最终导致细胞死亡^[24]。越来越多的证据表明,坏死性凋亡可与心血管疾病的发病机制有关,有研究显示 RIP1、RIP3 和 MLKL 的表达在 CHF 患者中显著上调,与疾病严重程度呈正相关,RIP1/RIP3/MLKL 信号通路的激活可能促进 CHF 的发生、发展,导致不良预后^[25]。研究表明 Caspase-8 的失活能将细胞死亡的方式从凋亡转变为坏死,而半胱天冬酶-8 的抑制诱导 RIPK1 和 RIPK3 磷酸化并形成原坏死复合物或坏死体,导致坏死性凋亡^[26]。Abulfadl 等^[27] 研究表明激活 RIPK1、RIPK3、MLKL,抑制 Caspase-8 表达,下调 TNF- α ,促进坏死性凋亡。Ma 等^[28] 研究表明心肌梗死后凋亡相关标志物 RIP1、RIP3 和 MLKL 的表达水平上调,通过抑制 RIP1/RIP3/MLKL 介导的坏死性凋亡预防缺血性心力衰竭。本研究中 CHF 组 p-RIP1、p-RIP3 和 p-MLKL 表达增加,Caspase-8 表达降低。与 CHF 组比较,Nob 可下调 p-RIP1、p-RIP3 和 p-MLKL 表达,上调 Caspase-8 蛋白表达,且 Nob 与通路抑制剂 Nec-1 表现出相似的作用

效果。表明 Nob 可能通过抑制 RIP1/RIP3/MLKL 信号通路激活,缓解机体炎性反应及氧化损伤,改善 CHF 大鼠心脏功能,抑制 CHF 大鼠坏死性凋亡。

综上所述,Nob 能减轻 CHF 大鼠炎性反应及氧化应激水平,增强机体抗氧化能力,抑制 CHF 大鼠坏死性凋亡,改善大鼠心肌损伤,其机制可能与抑制 RIP1/RIP3/MLKL 信号通路传导有关。本文初步探讨了 Nob 调节 RIP1/RIP3/MLKL 信号通路对 CHF 大鼠心肌坏死性凋亡的影响,为 CHF 的治疗提供一些思路。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

张鹏:设计实验方案,实施实验过程,论文撰写,论文修改;林桂雄、卓裕丰、程宏基:实施实验过程,资料搜集整理;陈钦修、谢文杰:进行统计学分析;冯燕玲:提出实验思路,分析实验数据,论文审核

参考文献

[1] 中华医学会心血管病学分会心力衰竭学组,中国医师协会心力衰竭专业委员会,中华心血管病杂志编辑委员会. 中国心力衰竭诊断和治疗指南 2018 [J]. 中华心血管病杂志,2018,46(10):760-789. DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-3758.2018.10.004.

[2] 王敏,卢怀海,庞旭阳,等. 川陈皮素对脑梗死缺血再灌注大鼠的保护作用及其机制研究[J]. 现代生物医学进展,2022,22(14):2642-2647. DOI:10.13241/j.cnki.pmb.2022.14.008.

[3] Zhang BF, Jiang H, Chen J, et al. Nobiletin ameliorates myocardial ischemia and reperfusion injury by attenuating endoplasmic reticulum stress-associated apoptosis through regulation of the PI3K/AKT signal pathway[J]. Int Immunopharmacol,2019,73(1):98-107. DOI:10.1016/j.intimp.2019.04.060.

[4] Guo X, Chen Y, Liu Q. Necroptosis in heart disease: Molecular mechanisms and therapeutic implications[J]. J Mol Cell Cardiol,2022,169(1):74-83. DOI:10.1016/j.yjmcc.2022.05.006.

[5] Xu B, Fang J, Wang J, et al. Inhibition of autophagy and RIP1/RIP3/MLKL-mediated necroptosis by edaravone attenuates blood spinal cord barrier disruption following spinal cord injury[J]. Biomed Pharmacother,2023,165(1):115165-115175. DOI:10.1016/j.biopha.2023.115165.

[6] Ying L, Benjanuwattra J, Chattipakorn SC, et al. The role of RIPK3-regulated cell death pathways and necroptosis in the pathogenesis of cardiac ischaemia-reperfusion injury[J]. Acta Physiol (Oxf),2021,231(2):13541-13552. DOI:10.1111/apha.13541.

[7] Zhou H, Liu L, Ma X, et al. RIP1/RIP3/MLKL-mediated necroptosis contributes to vinblastine-induced myocardial damage[J]. Mol Cell Biochem,2021,476(2):1233-1243. DOI:10.1007/s11010-020-03985-3.

[8] Zhang XJ, Li L, Wang AL, et al. GSK2795039 prevents RIP1-RIP3-MLKL-mediated cardiomyocyte necroptosis in doxorubicin-induced heart failure through inhibition of NADPH oxidase-derived oxidative stress[J]. Toxicol Appl Pharmacol,2023,463(1):116412-116422. DOI:10.1016/j.taap.2023.116412.

[9] Sunagawa Y, Funamoto M, Suzuki A, et al. A Novel target molecule of

nobiletin derived from citrus peels has a therapeutic potency against the development of heart failure[J]. Eur Cardiol,2017,12(2):105. DOI:10.15420/ecr.2017;23;14.

[10] 礼海,刘晓蕾,王懿,等. 参草通脉复方对慢性心力衰竭模型大鼠心肌重构及心肾功能的影响研究[J]. 实用心脑血管病杂志,2022,30(6):55-60. DOI:10.12114/j.issn.1008-5971.2022.00.146.

[11] Liu Z, Gao Z, Zeng L, et al. Nobiletin ameliorates cardiac impairment and alleviates cardiac remodeling after acute myocardial infarction in rats via JNK regulation[J]. Pharmacol Res Perspect,2021,9(2):00728-00738. DOI:10.1002/prp2.728.

[12] Liu H, Zhang M, Dong X, et al. Necrostatin-1 protects against ischemia/reperfusion injury by inhibiting receptor-interacting protein 1 in a rat flap model[J]. J Plast Reconstr Aesthet Surg,2019,72(2):194-202. DOI:10.1016/j.bjps.2018.10.019.

[13] Iampanichakul M, Poasakate A, Potue P, et al. Nobiletin resolves left ventricular and renal changes in 2K-1C hypertensive rats[J]. Sci Rep,2022,12(1):9289-9299. DOI:10.1038/s41598-022-13513-6.

[14] Huang Q, Tian L, Zhang Y, et al. Nobiletin alleviates myocardial ischemia-reperfusion injury via ferroptosis in rats with type-2 diabetes mellitus[J]. Biomed Pharmacother,2023,163(1):114795-114805. DOI:10.1016/j.biopha.2023.114795.

[15] Mao Q, Liang X, Wu Y, et al. Nobiletin protects against myocardial injury and myocardial apoptosis following coronary microembolization via activating PI3K/Akt pathway in rats[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol,2019,392(9):1121-1130. DOI:10.1007/s00210-019-01661-y.

[16] 张倩,卫晓红,陈洁,等. 慢性心力衰竭常用动物模型的研究进展及其在中医药研究中的应用[J]. 中国中药杂志,2023,48(3):614-624. DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.20220918.201.

[17] 樊弘,左丹,蒋芳萍. 慢性心力衰竭左室超声测量参数与心功能分级的关系研究[J]. 川北医学院学报,2022,37(12):1546-1549. DOI:10.3969/j.issn.1005-3697.2022.12.008.

[18] Suetomi T, Miyamoto S, Brown JH. Inflammation in non-ischemic heart disease: Initiation by cardiomyocyte CaMKII and NLRP3 inflammasome signaling[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol,2019,317(1):H877-H890. DOI:10.1152/ajpheart.00223.2019.

[19] Liu P, Pan Q. Butein inhibits oxidative stress injury in rats with chronic heart failure via ERK/Nrf2 signaling[J]. Cardiovasc Ther,2022,2022(1):8684014-8684024. DOI:10.1155/2022/8684014.

[20] Hu Y, Pan H, Peng J, et al. Resveratrol inhibits necroptosis by mediating the TNF- α /RIP1/RIP3/MLKL pathway in myocardial hypoxia/reoxygenation injury[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai),2021,53(4):430-437. DOI:10.1093/abbs/gmab012.

[21] Kang P, Wang J, Fang D, et al. Activation of ALDH2 attenuates high glucose induced rat cardiomyocyte fibrosis and necroptosis[J]. Free Radic Biol Med,2020,146(1):198-210. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2019.10.416.

[22] Marunouchi T, Nishiumi C, Iinuma S, et al. Effects of Hsp90 inhibitor on the RIP1-RIP3-MLKL pathway during the development of heart failure in mice [J]. Eur J Pharmacol,2021,898(1):173987-

173997. DOI:10.1016/j.ejphar.2021.173987.
- [23] 王军,杨洋,李天发,等.加倍剂量的瑞舒伐他汀对老年慢性心力衰竭患者心功能和氧化应激反应程度的影响及用药安全性分析[J].临床和实验医学杂志,2019,18(7):709-712. DOI:10.3969/j.issn.1671-4695.2019.07.012.
- [24] Corsetti G,Chen-Scarabelli C,Romano C,et al. Autophagy and oncosis/necroptosis are enhanced in cardiomyocytes from heart failure patients[J]. Med Sci Monit Basic Res,2019,25(1):33-44. DOI:10.12659/MSMBR.913436.
- [25] 陈永锋,李小荣,赖薇薇,等. RIP1/RIP3-MLKL 信号通路对慢性心力衰竭的发生、发展及预后相关[J]. 南方医科大学学报,2021,41(10):1534-1539. DOI:10.12122/j.issn.1673-4254.2021.10.12.
- [26] Piamsiri C,Maneechote C,Siri-Angkul N,et al. Targeting necroptosis as therapeutic potential in chronic myocardial infarction[J]. J Biomed Sci, 2021, 28(1):25-35. DOI:10.1186/s12929-021-00722-w.
- [27] Abulfadl YS, El Ela YA, Al Khaiyat AM, et al. Cyclophosphamide enfeebles myocardial isometric contraction force via RIP1/RIP3/MLKL/TRPM7-mediated necroptosis[J]. Biomed Pharmacother, 2023, 163(1):114819-114829. DOI:10.1016/j.biopha.2023.114819.
- [28] Ma F,Zhu Y,Chang L,et al. Hydrogen sulfide protects against ischemic heart failure by inhibiting RIP1/RIP3/MLKL-mediated necroptosis[J]. Physiol Res,2022,71(6):771-781. DOI:10.33549/physiolres.934905.

(收稿日期:2023-10-21)

作者·编者·读者

撰写医学论文主体部分的要求

- 前言** 概述研究的背景、目的、研究思路、理论依据、研究方法、预期结果和意义等。仅提供与研究主题紧密相关的参考文献,切忌写成文献综述。一般以 200~300 个汉字为宜,占全文字数的 5% 左右。
- 资(材)料与方法** 实验研究论文常写成“材料与方法”,临床研究论文常写成“资料与方法”。
 - 研究对象**:研究对象为人,需注明时间、地点、分组方法、一般情况、选择标准与排除标准等,并说明经所在单位伦理委员会批准,研究对象知情同意。研究对象为实验动物,需注明动物的名称、种系、雌雄、年龄、饲养条件、健康状况及合格证号等。
 - 药品、试剂及仪器、设备**:药品及化学试剂使用通用名称,并注明剂量、单位、纯度、批号、生产单位及给药途径。仪器、设备应注明名称、型号、规格、生产单位、精密度或误差范围,无须描述工作原理。
 - 观察指标与方法**:选用相应观察指标,详述新创的方法及改良方法的改进之处,以备他人重复。采用他人方法,以引用参考文献的方式给出即可。
- 统计学方法** 说明所使用的统计学软件及版本,明确资料的表达及统计学方法的选择。用 $\bar{x} \pm s$ 表达服从或近似服从正态分布的计量资料,可采用 t 检验、方差分析;用 $M(Q_1, Q_3)$ 表达呈偏态分布的计量资料或生存时间资料,可采用秩和检验,若考虑协变量的影响,可采用协方差分析;用频数或率(%)表达计数资料或等级资料,可采用卡方检验或秩和检验。
- 结果** 是指与设计的观察指标相对应的实(试)验所得数据、观察记录,经过综合分析和统计学处理的结果,而不是原始数据,更不是原始记录。按逻辑顺序在正文的文字、表格和图中描述所获得的结果。结果的叙述应实事求是,简洁明了,数据准确,层次清楚,逻辑严谨。以数据反映结果时,应注意不能只描述导数(如百分数),还应同时给出以计算导数的绝对数。一般应对所得数据进行统计学处理,并给出具体的统计检验值,如: $t=2.85, P<0.01$ 。
- 讨论** 是对研究结果的科学解释与评价,是研究所形成的科学理论,不必重述结果部分具体数据或资料。着重讨论研究结果的创新之处及从中导出的结论,包括理论意义、实际应用价值、局限性,及其对进一步研究的启示。应将本研究结果与其他有关的研究相比较,并将本研究结论与目的联系起来讨论,同时列出相关参考文献。