基础研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003865

柠檬苦素调节RIP1/RIP3/MLKL信号通路对心肌梗死大鼠心肌细胞坏死性凋亡的影响

田晰晰[1]，吴剑飞[2]，韩思梁[3]，张伊超[3]，马　竞[3]
（1.河北大学附属医院教育处，保定　071000；2.河北大学附属医院肝胆外科，保定　071000；
3.河北大学附属医院心血管内科，保定　071000）

【摘　要】目的：探究柠檬苦素（limonin，LIM）调节受体相互作用蛋白激酶-1（receptor-interacting protein 1，RIP1）/受体相互作用蛋白激酶-3（receptor-interacting protein 3，RIP3）/混合谱系激酶结构域样蛋白（mixed-lineage kinase domain-like protein，MLKL）信号通路对心肌梗死（myocardial infarction，MI）大鼠心肌细胞坏死性凋亡的影响。**方法：**将60只SD大鼠采用随机数字表法分为5组（每组n=12）：假手术组（Sham组）、MI模型组（Model组）、低剂量LIM组（LIM-L组，25 mg/kg LIM）、高剂量LIM组（LIM-H组，50 mg/kg LIM）和LIM高剂量+Nec-1组（LIM-H+Nec-1组，50 mg/kg LIM+0.6 mg/kg Nec-1）。通过结扎大鼠心脏冠脉的方式构建大鼠MI模型。测定大鼠心功能变化。伊红-苏木精染色（hematoxylin-eosin staining，HE）观察大鼠心肌组织病理学变化。2，3，5-三苯基氯化四氮唑（2，3，5-triphenyltetrazolium chloride，TTC）-伊文斯蓝（evans blue，EB）法检测大鼠心肌梗死面积。末端标记法（terminal-deoxynucleoitidyl transferase mediated nick end labeling，TUNEL）检测大鼠心肌细胞坏死性凋亡情况。实时荧光定量PCR（real time fluorescence quantitative PCR，RT-qPCR）、Western blot实验检测大鼠心肌组织RIP1/RIP3/MLKL信号通路相关mRNA与蛋白的表达及凋亡相关蛋白表达。**结果：**Model组大鼠较Sham组左室射血分数（left ventricular ejection fraction，LVEF）、左室收缩压（left ventricular systolic pressure，LVSP）、心肌组织B淋巴细胞瘤-2（B-cell lymphoma-2，Bcl-2）表达降低（均P<0.001），左室收缩末期容积（left ventricular end-systolic volume，LVESV）、左室舒张末压（left ventricular end-diastolic pressure，LVEDP）、左室舒张末期容积（left ventricular end-diastolic volume，LVEDV）、心肌梗死面积、细胞凋亡率、心肌组织RIP1、RIP3、MLKL mRNA和蛋白水平、Bcl-2相关X蛋白（Bcl-2 associated X protein，Bax）、胱天蛋白酶3（cysteinyl aspartate-specific proteinase 3，Caspase3）蛋白表达均明显升高（均P<0.001），HE病理切片显示大鼠心肌细胞肿大、排列紊乱，出现坏死和大量炎性细胞浸润。与Model组相比，LIM-H组大鼠相应指标变化与上述相反（RIP1 mRNA：P=0.002，RIP3 mRNA：P=0.008，其余指标均P<0.001），大鼠心肌组织病理学损伤和炎性细胞浸润减轻。Nec-1促进了LIM对MI大鼠心肌细胞坏死性凋亡的减轻作用。**结论：**LIM可能通过下调RIP1/RIP3/MLKL信号通路减轻MI大鼠心肌细胞坏死性凋亡。

【关键词】柠檬苦素；受体相互作用蛋白激酶-1/受体相互作用蛋白激酶-3/混合谱系激酶结构域样蛋白信号通路；心肌梗死；坏死性凋亡
【中图分类号】R542.2　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2023-11-16

Impact of limonin on necrotic apoptosis of myocardial cells in rats with myocardial infarction by regulating the receptor-interacting protein 1/receptor-interacting protein 3/mixed-lineage kinase domain-like protein signaling pathway

Tian Xixi[1]，*Wu Jianfei*[2]，*Han Siliang*[3]，*Zhang Yichao*[3]，*Ma Jing*[3]
（*1. Department of Education，Affiliated Hospital of Hebei University；2. Department of Hepatobiliary Surgery，Affiliated Hospital of Hebei University；3. Department of Cardiovascular Medicine，Affiliated Hospital of Hebei University*）

【Abstract】*Objective*：To investigate the impact of limonin（LIM）on the necrotic apoptosis of myocardial cells in rats with myocardial infarction（MI）by regulating the receptor-interacting protein 1（RIP1）/receptor-interacting protein 3（RIP3）/mixed-lineage kinase domain-like protein（MLKL）signaling pathway. ***Methods*：**A total of 60 Sprague-Dawley rats were randomly divided into sham-operation group（Sham group），MI model group（Model group），low-dose LIM group（LIM-L group，25 mg/kg LIM），high-dose LIM

作者介绍：田晰晰，Email：cissy_815@126.com，
研究方向：急诊医学、医学教育管理。
通信作者：马　竞，Email：332442964@qq.com。
基金项目：保定市科学技术局资助项目（编号：2241ZF296）。
优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20250522.1406.004（2025-05-23）

group（LIM-H group，50 mg/kg LIM），and high-dose LIM+RIP1 inhibitor Nec-1 group（LIM-H+Nec-1 group，50 mg/kg LIM+0.6 mg/kg Nec-1），with 12 rats in each group. A rat model of MI was established by ligation of the coronary artery. The changes of cardiac function were examined for each group；HE staining was used to observe the pathological changes of myocardial tissue；the 2，3，5-triphenyltetrazolium chloride-Evans blue method was used to measure myocardial infarct area；the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling method was used to observe the necrotic apoptosis of myocardial cells；quantitative real-time PCR and Western blot were used to measure the expression levels of mRNAs and proteins associated with the RIP1/RIP3/MLKL signaling pathway and the expression of apoptosis-related proteins. ***Results***：Compared with the Sham group，the Model group had significant reductions in left ventricular ejection fraction，left ventricular systolic pressure，and the expression level of B-cell lymphoma-2（Bcl-2）in myocardial tissue（all $P<0.001$）and significant increases in left ventricular end-systolic volume，left ventricular end-diastolic pressure，left ventricular end-diastolic volume，myocardial infarct area，cell apoptosis rate，the mRNA and protein expression levels of RIP1，RIP3，and MLKL in myocardial tissue，and the protein expression levels of Bcl-2 associated X protein and cysteinyl aspartate-specific proteinase 3 in myocardial tissue（all $P<0.001$），as well as swelling and disordered arrangement of myocardial cells with necrosis and massive inflammatory cell infiltration on HE pathological sections. Compared with the Model group，the LIM-H group showed reverse changes in the above indicators（RIP1 mRNA：$P=0.002$，RIP3 mRNA：$P=0.008$，and the other indexes P were all <0.001），with alleviations of myocardial histopathological injury and inflammatory cell infiltration. Nec-1 promoted the effect of LIM in alleviating the necrotic apoptosis of myocardial cells in MI rats. ***Conclusion***：LIM may alleviate the necrotic apoptosis of myocardial cells in MI rats by downregulating the RIP1/RIP3/MLKL signaling pathway.

【Key words】limonin；receptor-interacting protein 1/receptor-interacting protein 3/mixed-lineage kinase domain-like protein signaling pathway；myocardial infarction；necrotic apoptosis

心肌梗死（myocardial infarction，MI）是冠心病中常见的严重类型，在国内外发生率和死亡率均居高不下[1-2]。心肌细胞坏死性凋亡常发生在梗死中心区、边缘区甚至较远的正常心肌组织，若心肌细胞坏死性凋亡不被干预，将会出现进行性的心肌细胞丢失、细胞胶原支架断开以及心室壁厚度减小，最终演变成严重的心力衰竭[3-4]。因此，寻找新的安全有效的药物来调节 MI 患者心肌细胞坏死性凋亡对于提高 MI 患者生存率和预后具有重要意义。柠檬苦素（limonin，LIM）是橙子、柠檬种子和果皮中的主要活性成分之一，属于四环三萜类化合物，研究者们发现其具有保肝、抗癌、抗炎、抗菌、抗病毒、降血脂和抗糖尿病等药理作用[5-6]。但关于 LIM 在 MI 心肌细胞坏死性凋亡过程中的作用还鲜有报道。受体相互作用蛋白激酶-1（receptor-interacting protein 1，RIP1）/受体相互作用蛋白激酶-3（receptor-interacting protein 3，RIP3）/混合谱系激酶结构域样蛋白（mixed-lineage kinase domain-like protein，MLKL）信号通路是细胞凋亡的关键控制的信号通路，其调控作用决定着细胞的存活与凋亡[7]。当程序性坏死被激活时，MLKL 被 RIP3 磷酸化并寡聚，然后易位至细胞质膜来执行程序性坏死[8]。有研究发现，RIP1/RIP3/MLKL 信号通路相关蛋白在慢性心力衰竭患者中的表达明显增加，且与慢性心力衰竭的严重程度呈正相关，说明慢性心力衰竭的发生发展和预后可能与 RIP1/RIP3/MLKL 信号通路的激活相关[9]。基于此，本研究通过结扎大鼠心脏冠脉的方式构建大鼠 MI 模型，探究 LIM 对 MI 大鼠心肌细胞坏死性凋亡的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 本研究使用 60 只 SPF 级雄性 SD 大鼠（体重 200~230 g），由辰欣药业股份有限公司提供[实验动物生产许可证号：SYXK（鲁）2022-0014]。所有动物饲养于标准化 SPF 级环境中（温度 22~25 ℃，相对湿度 40%~60%，12 h/12 h 光暗循环，通风良好），自由摄食饮水。适应性饲养 1 周后用于实验。本实验方案经本院动物伦理委员会批准（批准号：2023-0024），严格遵循动物实验 3R（替代、减少、优化）原则。

1.1.2 主要试剂与仪器 柠檬苦素（纯度≥98%，批号：NMKS2021081）由南京春秋生物工程有限公司提供；RIP1 抑制剂 Nec-1（批号：ab411880）购自美国 Alexis 生物技术公司；伊文斯蓝（evans blue，EB，批号：2022563）、2，3，5-三苯基氯化四氮唑（2，3，5-triphenyltetrazolium chloride，TTC，批号：00332543）、伊红-苏木精染色（hematoxylin-eosin staining，HE）试剂盒（批号：24532023）、BCA 蛋白定量试剂盒（批号：235420）均购自北京索莱宝科技有限公司；戊巴比妥钠（批号：WS20224523）、Trizol 试剂（批号：523649）均购自美国

Sigma 公司；末端标记法（terminal-deoxynucleoitidyl transferase mediated nick end labeling，TUNEL）试剂盒（批号：8253548）、反转录试剂盒（批号：331598）均购自武汉普健生物科技有限公司；兔源 RIP1（批号：ab218933）、RIP3（批号：ab541630）、MLKL（批号：ab217274）、Bcl-2 相关 X 蛋白（Bcl-2 associated X protein，Bax；批号：ab8226）、B 淋巴细胞瘤-2（B-cell lymphoma-2，Bcl-2；批号：ab76311）、胱天蛋白酶 3（cysteinyl aspartate-specific proteinase 3，Caspase3；批号：ab239883）、磷酸甘油醛脱氢酶（reduced glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase，GAPDH；批号：ab258423）蛋白一抗和相应羊抗兔二抗（批号：ab205718）均购自 Abcam 公司；小动物呼吸机（TKR-200C）购自美国 Harvard Apparatus 公司。

1.2 *方法*

1.2.1 MI 模型的建立 参考文献方法，采用结扎大鼠心脏冠脉的方式构建大鼠 MI 模型[10]。所有大鼠麻醉后仰卧位固定，进行气管插管和心电图监测。于胸骨左侧 3~4 个肋骨间行 1 cm 的纵行切口，暴露心脏。在大鼠平左心耳底部结扎左前降支近端，之后关闭胸腔。参考文献中的标准，本研究 MI 模型构建成功[2]。

1.2.2 动物分组与给药 将 60 只成功建模的 SD 大鼠随机分为 5 组（每组 n=12）：心肌梗死模型组（Model 组）、LIM 低剂量组（25 mg/kg LIM，LIM-L 组）、LIM 高剂量组（50 mg/kg LIM，LIM-H 组）和 LIM 高剂量+Nec-1 组（50 mg/kg LIM+0.6 mg/kg Nec-1，LIM-H+Nec-1 组），另设假手术组（Sham 组）。术后 24 h 开始干预：LIM 每日灌胃给药 1 次，Nec-1 每日腹腔注射 1 次，持续 7 d；Model 组和 Sham 组分别给予等体积生理盐水灌胃和腹腔注射，LIM-L 组和 LIM-H 组腹腔注射等体积生理盐水作为对照。

1.2.3 多普勒诊断仪检查大鼠心功能变化 末次给药 24 h 后，大鼠腹腔注射 3% 戊巴比妥钠（30 mg/kg）麻醉，使用多普勒诊断仪记录大鼠左室射血分数（left ventricular ejection fraction，LVEF）、左室舒张末期容积（left ventricular end-diastolic volume，LVEDV）、左室收缩末期容积（left ventricular end-systolic volume，LVESV）、左室舒张末压（left ventricular end-diastolic pressure，LVEDP）、左室收缩压（left ventricular systolic pressure，LVSP）。

1.2.4 HE 染色观察大鼠心肌组织病理学变化 末次给药 24 h 后，每组采用颈椎脱臼法随机处死 6 只大鼠，解剖取出心脏，将一部分心肌组织进行固定，制备病理切片，HE 染色后观察心肌病理学变化。另一部分放在-80 ℃储存。

1.2.5 2,3,5-三苯基氯化四氮唑-伊文思蓝（2,3,5-Triphenyltetrazolium Chloride-Evans Blue Staining，TTC-EB）法检测大鼠心肌梗死面积 末次给药 24 h 后，采用颈椎脱臼法处死剩余大鼠，经颈总动脉逆向注射 EB 溶液，解剖取心脏洗涤后进行冻存。次日进行切片，浸入 1% TTC 溶液中，固定后计算大鼠心肌梗死面积。

1.2.6 TUNEL 法检测大鼠心肌细胞坏死性凋亡 取心肌病理切片，按 TUNEL 试剂盒操作，加入 TUNEL 反应液 50 μL，在室温中反应 1 h，加入 DAB 显色，经苏木精复染、脱水、透明后用 20% 甘油缓冲液封片。在显微镜下观察每张切片 5 个不同视野内细胞的凋亡情况，计算细胞凋亡率。

1.2.7 实时荧光定量 PCR（real time fluorescence quantitative PCR，RT-qPCR）实验检测大鼠心肌组织 RIP1、RIP3、MLKL mRNA 的表达 取 1.2.4 冻存的大鼠心肌组织，加入 Trizol 试剂提取心肌组织总 RNA，使用试剂盒 SYBR Green RT-PCR 试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA，并进行扩增。引物序列设计如表 1 所示。以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算大鼠心肌组织的 *RIP1*、*RIP3* 和 *MLKL* mRNA 的相对表达量。

表 1 引物设计序列

基因名称	引物序列（5'~3'）
RIP1	上游引物：GTCCTGGTTTGCTCCTTCCC
	下游引物：GTCTCCTTTCCTCCTCTCTGTTG
RIP3	上游引物：ATGTCTTCTGTCAAGTTATGGCCTAC
	下游引物：CTTGTGGAAGGGCTGCCAGCCCCTACC
MLKL	上游引物：GGGAACACTCCACGGAAACA
	下游引物：GATCTTGCAGTCTCTCGGGG
GAPDH	上游引物：GCTCTCTGCTCCTCCTGTTC
	下游引物：ACGACCAAATCCGTTGACTC

1.2.8 Western blot 检测大鼠心肌 RIP1/RIP3/MLKL 信号通路、凋亡蛋白表达 提取 1.2.4 中冻存的心肌总蛋白，将蛋白进行凝胶电泳、封闭，与一抗 RIP1、RIP3、MLKL、Bax、Bcl-2、Caspase3、GAPDH 于 4 ℃下孵育过夜，次日加入相应二抗（1∶5 000）室温孵育 2 h，进行显影，观察并拍照蛋白条带，以 GAPDH 为内参，利用 Image Lab 软件分析目标蛋白的灰度值。

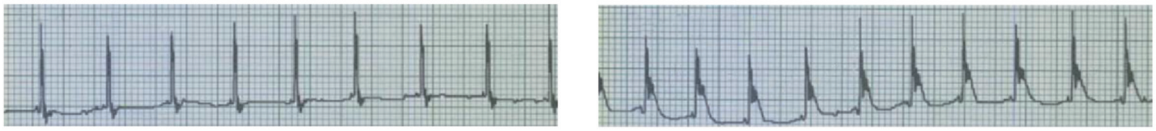
1.3 *统计学方法*

本研究采用 GraphPad Prism 7.0 软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。多组间比较采用单因素方差分析，若差异有统计学意义，则进一步采用 LSD-t 检验进行两两比较，检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 *LIM 对大鼠心功能的影响*

图 1 为 Sham 组和 Model 组大鼠的心电图，Model 组大鼠心电图 J 点位置抬高，说明大鼠 MI 模型建立成功。单因素方差分析显示各组心功能指标差异有统计学意义（均 P<0.001）。Model 组较 Sham 组 LVEF[（36.59 ± 4.23）% vs.（75.45 ± 5.20）%]、LVSP[（108.16 ± 5.36）mmHg vs.（152.28 ± 6.89）mmHg]显著降低，LVESV[（2.76 ± 0.18）mL vs.（0.58 ± 0.08）mL]、LVEDP[（17.96 ± 2.58）mmHg vs.（4.47 ± 0.56）mmHg]、LVEDV[（1.76 ± 0.18）mL vs.（0.23 ± 0.04）mL]显著升高（均 P<0.001）。LIM-H 组较 Model 组各指标显著改善（均 P<0.001），且优于 LIM-L 组（均 P<0.001）。LIM-H+Nec-1 组较 LIM-H 组进一步改善（P<0.001），其中 LVEDV[（0.35 ± 0.04）mL]接近 Sham 组水平（表 2）。



Sham组　　Model组

图1　Sham组与Model组大鼠心电图

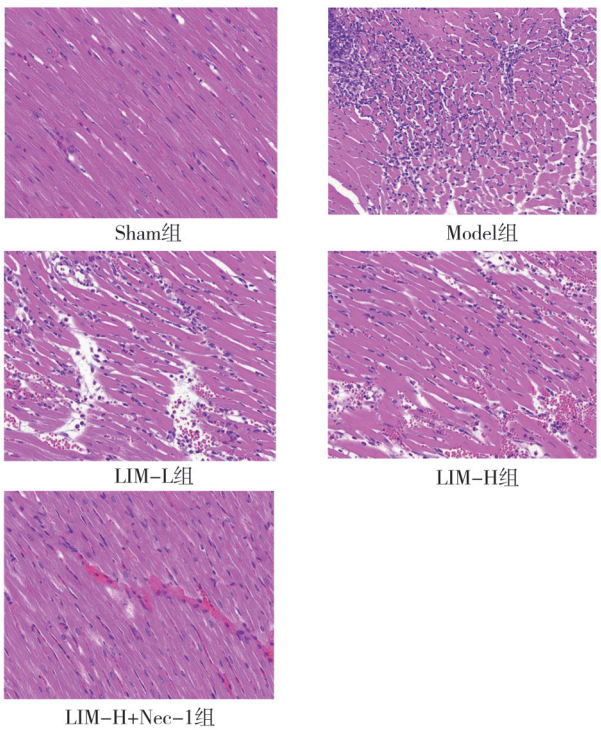
表2　大鼠心功能比较（$\bar{x}\pm s$，n=6）

组别	LVEF（%）	LVSP（mmHg）	LVESV（mL）	LVEDP（mmHg）	LVEDV（mL）
Sham组	75.45 ± 5.20	152.28 ± 6.89	0.58 ± 0.08	4.47 ± 0.56	0.23 ± 0.04
Model组	36.59 ± 4.23[a]	108.16 ± 5.36[a]	2.76 ± 0.18[a]	17.96 ± 2.58[a]	1.76 ± 0.18[a]
LIM-L组	36.28 ± 4.18	109.83 ± 6.25	2.63 ± 0.17	17.14 ± 2.23	1.65 ± 0.17
LIM-H组	58.64 ± 5.47[bc]	134.05 ± 8.54[bc]	1.52 ± 0.10[bc]	11.20 ± 1.34[bc]	0.87 ± 0.08[bc]
LIM-H+Nec-1组	71.13 ± 5.05[d]	148.79 ± 8.82[d]	0.73 ± 0.08[d]	6.04 ± 0.72[d]	0.35 ± 0.04[d]
F值	87.743	49.281	374.600	80.366	214.578
P值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：a，与Sham组相比，P<0.05；b，与Model组相比，P<0.05；c，与LIM-L组相比，P<0.05；d，与LIM-H组相比，P<0.05

2.2　LIM对大鼠心肌组织病理学变化的影响

Sham组大鼠心肌细胞排列紧密规整，形态正常，无明显坏死和炎性浸润。Model组大鼠心肌细胞排列疏松无序，有大量坏死细胞。LIM-H组大鼠心肌细胞炎性浸润、坏死和损伤减轻程度明显，LIM-L组大鼠心肌组织炎性细胞较多，心肌细胞坏死和损伤较重。与LIM-H组相比，LIM-H+Nec-1组大鼠心肌细胞病理损伤减轻，细胞坏死减少，炎性细胞浸润减少，见图2。



Sham组　Model组　LIM-L组　LIM-H组　LIM-H+Nec-1组

图2　HE染色观察大鼠心肌组织病理学变化（400×）

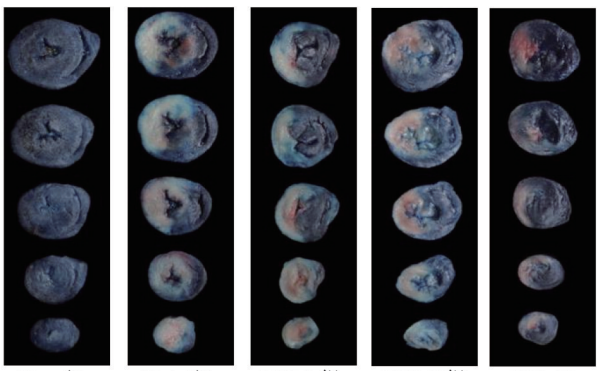
2.3　LIM对大鼠心肌梗死面积的影响

如表3和图3所示，单因素方差分析显示各组心肌梗死面积差异有统计学意义（F=254.169，P<0.001）。具体表现为：Model组较Sham组心肌梗死面积明显增加[(42.15 ± 3.82)% vs. (0.00 ± 0.00)%，P<0.001]；LIM-H组较Model组明显减少[(26.48 ± 2.74)% vs. (42.15 ± 3.82)%，P<0.001]，且优于LIM-L组（P<0.05）；随着LIM剂量增加，梗死面积呈剂量依赖性减少（P<0.001）；LIM-H+Nec-1组较LIM-H组进一步减少[(10.37 ± 1.44)% vs. (26.48 ± 2.74)%，P<0.001]。

表3　各组大鼠心肌梗死面积的比较（$\bar{x}\pm s$，n=6）

组别	心肌梗死面积（%）
Sham组	0.00 ± 0.00
Model组	42.15 ± 3.82[a]
LIM-L组	40.83 ± 4.07[a]
LIM-H组	26.48 ± 2.74[bc]
LIM-H+Nec-1组	10.37 ± 1.44[d]
F值	254.169
P值	<0.001

注：a，与Sham组相比，P<0.05；b，与Model组相比，P<0.05；c，与LIM-L组相比，P<0.05；d，与LIM-H组相比，P<0.05



Sham组　Model组　LIM-L组　LIM-H组　LIM-H+Nec-1组

图3　TTC-EB染色观察大鼠心肌梗死

2.4　LIM 对大鼠心肌细胞坏死性凋亡的影响

如表4和图4所示，单因素方差分析显示各组心肌细胞凋亡率差异有统计学意义（F=159.345，P<0.001）。Model组凋亡率明显高于Sham组[(32.63±3.35)% vs. (3.17±0.45)%，P<0.001]；LIM-H组(20.42±2.10)%较Model组明显降低（P<0.001），且明显低于LIM-L组[(30.97±3.58)%，P<0.05]；LIM-H+Nec-1组(11.13±1.24)%较LIM-H组进一步降低（P<0.001）。

表4　各组大鼠心肌细胞凋亡率的比较（$\bar{x}\pm s$，n=6）

组别	细胞凋亡率(%)
Sham组	3.17±0.45
Model组	32.63±3.35[a]
LIM-L组	30.97±3.58
LIM-H组	20.42±2.10[bc]
LIM-H+Nec-1组	11.13±1.24[d]
F值	159.345
P值	<0.001

注：a，与Sham组相比，P<0.05；b，与Model组相比，P<0.05；c，与LIM-L组相比，P<0.05；d，与LIM-H组相比，P<0.05

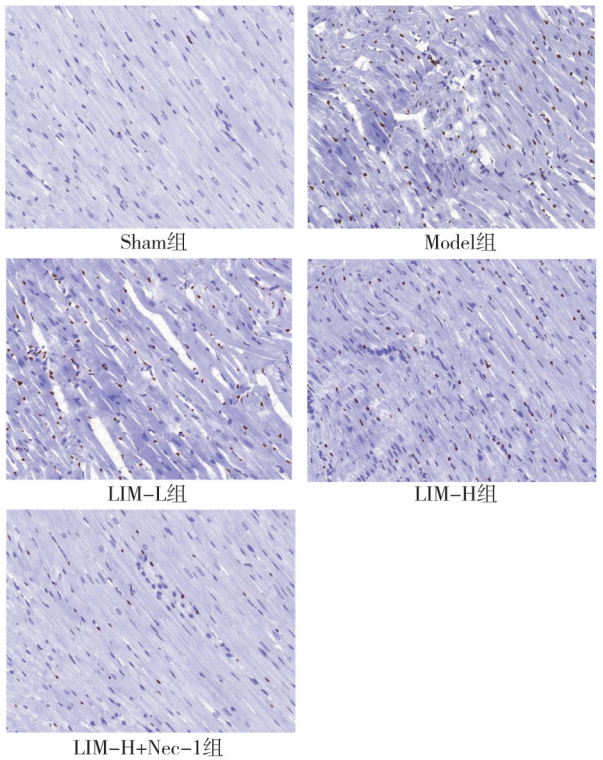
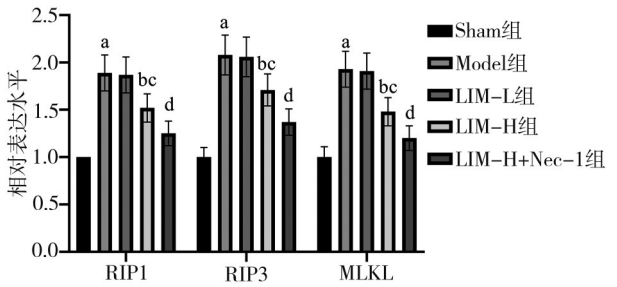


图4　TUNEL染色观察大鼠心肌细胞坏死性凋亡(400×)

2.5　LIM 对大鼠心肌组织 RIP1、RIP3、MLKL mRNA 表达的影响

如图5所示，与Sham组相比，Model组大鼠心肌组织RIP1、RIP3、MLKL mRNA表达明显升高（t_D=14.592，P<0.001；t_D=15.444，P<0.001；t_D=14.483，P<0.001）；LIM-H组大鼠较Model组大鼠心肌组织RIP1、RIP3、MLKL mRNA表达降低（t_D=6.066，P=0.002；t_D=5.291，P=0.008；t_D=7.008，P<0.001），LIM-L组差异无统计学意义（P>0.05）。LIM-H组较LIM-L组大鼠心肌组织RIP1、RIP3、MLKL mRNA表达明显降低（t_D=5.738，P=0.004；t_D=5.005，P=0.013；t_D=6.696，P=0.001）。LIM-H+Nec-1组较LIM-H组大鼠心肌组织RIP1、RIP3、MLKL mRNA表达明显降低（t_D=4.427，P=0.033；t_D=4.862，P=0.016；t_D=4.360，P=0.036）。

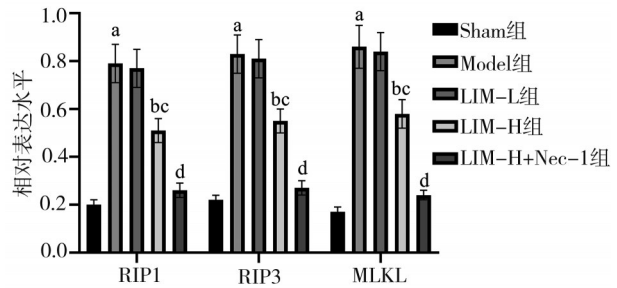


注：a与Sham组相比，P<0.05；b，与Model组相比，P<0.05；c，与LIM-L组相比，P<0.05；d，与LIM-H组相比，P<0.05

图5　大鼠心肌组织RIP1、RIP3、MLKL mRNA表达的比较

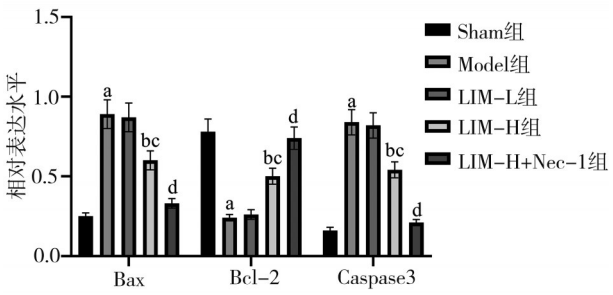
2.6　LIM 对大鼠心肌组织 RIP1/RIP3/MLKL 信号通路和凋亡相关蛋白表达的影响

如图6、7、8所示，与Sham组相比，Model组大鼠心肌RIP1、RIP3、MLKL、Bax、Caspase3表达升高（t_D=25.082，P<0.001；t_D=25.932，P<0.001；t_D=27.490，P<0.001；t_D=24.132，P<0.001；t_D=29.353，P<0.001），Bcl-2表达降低（t_D=24.069，P<0.001）；LIM-H组大鼠较Model组心肌RIP1、RIP3、MLKL、Bax、Caspase3表达降低（t_D=11.903，P<0.001；t_D=11.903，P<0.001；t_D=11.156，P<0.001；t_D=10.935，P<0.001；t_D=12.950，P<0.001），Bcl-2表达升高（t_D=11.589，P<0.001），LIM-L组较Model组各指标差异无统计学意义（P>0.05）。LIM-H组较LIM-L组大鼠心肌蛋白变化与上述相同（t_D=11.053，P<0.001；t_D=11.053，P<0.001；t_D=10.359，P<0.001；t_D=10.181，P<0.001；t_D=12.087，P<0.001；t_D=10.698，P<0.001）。与LIM-H组相比，LIM-H+Nec-1组大鼠心肌RIP1、RIP3、MLKL、Bax、Caspase3表达降低（t_D=10.628，P<0.001；t_D=11.903，P<0.001；t_D=13.546，P<0.001；t_D=10.181，P<0.001；t_D=14.245，P<0.001），Bcl-2表达升高（t_D=10.698，P<0.001）。



注：a，与Sham组相比，P<0.05；b，与Model组相比，P<0.05；c，与LIM-L组相比，P<0.05；d，与LIM-H组相比，P<0.05

图6　大鼠心肌RIP1/RIP3/MLKL信号通路蛋白表达比较



注：a，与Sham组相比，$P<0.05$；b，与Model组相比，$P<0.05$；c，与LIM-L组相比，$P<0.05$；d，与LIM-H组相比，$P<0.05$

图7　大鼠心肌凋亡相关蛋白表达比较

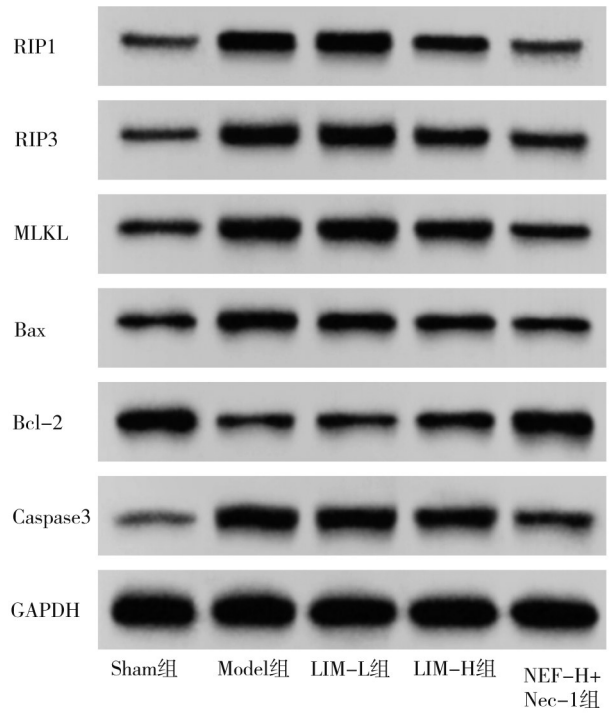


图8　Western blot检测大鼠心肌RIP1/RIP3/MLKL信号通路、凋亡蛋白的表达

3　讨　论

MI的发病机制较为复杂，目前主要认为其涉及冠状动脉闭塞引起的心肌组织缺氧、缺血，其也能造成心脏功能病理性损伤，严重者造成患者死亡[13]。对于MI的防治一直是心血管疾病相关领域的研究热点。目前，临床针对MI的治疗方式主要有溶栓治疗、介入治疗和药物治疗等，这些治疗方法虽然能初步缓解患者MI，降低患者死亡率，但MI会导致患者心肌功能受损，进而引发心力衰竭、心律失常等并发症，使患者预后不佳[14-15]。因此，寻找新型药物减轻MI患者心肌细胞坏死性凋亡，对于临床提高MI患者生存率和预后尤为重要。冠状动脉左前降支结扎法是在徐氏方法基础上进行改良，采用这种方法建立MI模型成功率更高[16]。本研究结果显示，与Sham组相比，Model组大鼠LVEF、LVSP、Bcl-2蛋白表达明显降低，LVESV、LVEDP、LVEDV、心肌梗死面积、细胞凋亡率、Bax、Caspase3蛋白表达均升高，HE染色显示大鼠心肌组织损伤严重，说明MI大鼠心功能下降，心肌组织出现损伤和心肌细胞坏死性凋亡。

LIM是1种天然物质，具有广泛的药理学作用如抗炎、抗氧化、抗菌、抗肿瘤等。研究者们近期还发现LIM对于心、脑损伤具有一定的保护作用。Shi YS等[17]研究发现在大脑和肝脏缺血再灌注损伤中，LIM通过抑制氧化应激反应，促进核转录因子红细胞2型相关因子2和NAD(P)H:醌氧化还原酶1的表达来保护缺血再灌注损伤诱导的血脑屏障破坏和神经功能受损。Wang YW等[18]研究发现LIM改善了急性冠状动脉缺血相关MI引起的心功能障碍，而rno-miR-10a-5p-IGLON5/LMX1A轴可能是MI诱导心功能障碍、LIM对心脏保护的有效靶点和途径。本研究结果显示，与Model组相比，LIM-H组大鼠LVEF、LVSP、Bcl-2蛋白表达均升高，LVESV、LVEDP、LVEDV、心肌梗死面积、细胞凋亡率、Bax、Caspase3蛋白表达均降低，HE病理切片显示大鼠的心肌细胞坏死和病理性损伤减轻。这说明LIM减轻了MI大鼠心肌细胞坏死性凋亡和心肌损伤，提高了心功能。

RIP1/RIP3/MLKL信号通路是细胞坏死性凋亡过程中的重要调节通路，当细胞程序性坏死被诱导激活时，MLKL会被RIP3磷酸化并寡聚，之后蛋白易位到细胞质膜来执行细胞程序性坏死，而RIP1/RIP3是程序性坏死中的关键信号分子，其形成的复合物会启动下游信号MLKL转导，发生自磷酸化触发细胞坏死性凋亡。Zhou HL等[19]研究发现长春碱能在体内诱导心肌损伤，其可能与激活RIP1/RIP3/MLKL信号通路有关。Wu YJ等[20]研究发现RIP1/RIP3/MLKL信号通路的抑制剂Nec-1能够治疗实验性自身免疫性心肌炎，减轻心肌细胞坏死性凋亡。本研究发现Model组较Sham组大鼠心肌组织RIP1、RIP3、MLKL mRNA与蛋白表达升高；LIM干预后上述mRNA与蛋白表达均降低。本研究用RIP1/RIP3/MLKL信号通路抑制剂Nec-1来干预高

剂量的LIM组大鼠，结果发现Nec-1促进了LIM对MI大鼠心肌细胞坏死性凋亡的减轻作用。

综上所述，LIM可能通过下调RIP1/RIP3/MLKL信号通路减轻MI大鼠心肌细胞坏死性凋亡。本研究可能为MI的临床治疗和病理机制研究提供了科学依据和参考。

参 考 文 献

[1] Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Fourth universal definition of myocardial infarction (2018)[J]. J Am Coll Cardiol, 2018, 72(18): 2231-2264.

[2] 赵 雯,张 勇,张 波,等. 红花黄色素调节NF-κB/NLRP3信号通路对心肌梗死大鼠心肌细胞焦亡和炎性损伤的影响[J]. 河北医学,2023,29(1):25-31.

Zhao W, Zhang Y, Zhang B, et al. Influences of safflower yellow on cardiomyocyte pyroptosis and inflammatory injury in rats with myocardial infarction by regulating NF-κB/NLRP3 signaling pathway[J]. Hebei Med, 2023,29(1):25-31.

[3] Chen LL, Li ST, Zhu JY, et al. Mangiferin prevents myocardial infarction-induced apoptosis and heart failure in mice by activating the Sirt1/FoxO3a pathway[J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(6): 2944-2955.

[4] 陈 丰,陈志清,钟桂玲,等. 葛根素预处理对心肌梗死模型大鼠HMGB1的表达及心肌细胞凋亡的影响[J]. 广西医科大学学报,2020,37(8):1404-1409.

Chen F, Chen ZQ, Zhong GL, et al. Effects of puerarin pretreatment on HMGB1 expression and cardiomyocyte apoptosis in rats with myocardial infarction[J]. J Guangxi Med Univ, 2020, 37(8): 1404-1409.

[5] 肖玉洪,安祯祥. 柠檬苦素对大鼠肝纤维化的影响及机制初探[J]. 中国药房,2022,33(24):2968-2972.

Xiao YH, An ZX. Effect of limonin on liver fibrosis in rats and preliminary exploration of its mechanism[J]. China Pharm, 2022, 33(24): 2968-2972.

[6] 晏 敏,周 宇,贺肖寒,等. 柑橘籽中柠檬苦素及类似物的生物活性研究进展[J]. 食品与发酵工业,2018,44(2):290-296.

Yan M, Zhou Y, He XH, et al. Research progress on the bioactivity of limonin and its analogues in citrus[J]. Food Ferment Ind, 2018, 44(2): 290-296.

[7] Chen X, Zhu RF, Zhong JJ, et al. Mosaic composition of RIP1-RIP3 signalling hub and its role in regulating cell death[J]. Nat Cell Biol, 2022, 24(4): 471-482.

[8] Cai ZY, Liu ZG. Detection of MLKL oligomerization during programmed necrosis[J]. Methods Mol Biol, 2018, 1857: 85-92.

[9] 陈永锋,李小荣,赖薇薇,等. RIP1/RIP3-MLKL信号通路与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.

Chen YF, Li XR, Lai WW, et al. RIP1/RIP3-MLKL signaling pathway correlates with occurrence, progression and prognosis of chronic heart failure[J]. J South Med Univ, 2021, 41(10): 1534-1539.

[10] 杨 钤,张轶欧,贾力莉,等. 心肌梗死大鼠模型的建立及疾病进程评价[J]. 中国组织工程研究,2022,26(23):3733-3737.

Yang Q, Zhang YO, Jia LL, et al. Establishment and disease progression in a rat myocardial infarction model[J]. Chin J Tissue Eng Res, 2022, 26(23): 3733-3737.

[11] Xiong W, Feng SY, Wang H, et al. Identification of candidate genes and pathways in limonin-mediated cardiac repair after myocardial infarction[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 142: 112088.

[12] 钟春荣,符传艺,杨 杰. RIP1/RIP3通路在大鼠急性脑梗死中的作用[J]. 实用医学杂志,2018,34(17):2872-2875.

Zhong CR, Fu CY, Yang J. Study on the role of RIP1/RIP3 pathway in acute cerebral infarction[J]. J Pract Med, 2018, 34(17): 2872-2875.

[13] 张 驰,徐 莉,任浩进,等. 基于Notch1/Hes1信号通路探讨葛根素对心肌梗死大鼠心肌细胞凋亡和心室重构的影响[J]. 中国老年学杂志,2023,43(3):623-627.

Zhang C, Xu L, Ren HJ, et al. Effects of puerarin on myocardial apoptosis and ventricular remodeling in rats with myocardial infarction based on Notch1/Hes1 signaling pathway[J]. Chin J Gerontol, 2023, 43(3): 623-627.

[14] 赵学飞,陈 凯. 冬凌草甲素对大鼠心肌梗死后心肌细胞凋亡和纤维化及NLRP3炎性通路的影响[J]. 现代中西医结合杂志,2022,31(15):2064-2071,2180.

Zhao XF, Chen K. Effects of oridonin on myocardial cell apoptosis, fibrosis and NLRP3 inflammatory pathway after myocardial infarction in rats[J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med, 2022, 31(15): 2064-2071, 2180.

[15] Jenča D, Melenovský V, Stehlik J, et al. Heart failure after myocardial infarction: incidence and predictors[J]. ESC Heart Fail, 2021, 8(1): 222-237.

[16] 熊 雁,唐艺加. circTRRAP敲低通过调节miR-323-3p/SMAD2轴在急性心肌梗死中的作用研究[J]. 重庆医科大学学报,2025,50(3):1-10.

Xiong Y, Tang YJ. CircTRRAP knockdown in acute myocardial infarction by regulating miR-323-3p/SMAD2 axis pmol/gprot[J]. Journal of Chongqing Medical University, 2025, 50(3): 1-10.

[17] Shi YS, Zhang Y, Liu B, et al. Nomilin protects against cerebral ischemia-reperfusion induced neurological deficits and blood-brain barrier disruption via the Nrf2 pathway[J]. Food Funct, 2019, 10(9): 5323-5332.

[18] Wang YW, Zhao MH, He SJ, et al. Necroptosis regulates tumor repopulation after radiotherapy via RIP1/RIP3/MLKL/JNK/IL8 pathway[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 461.

[19] Zhou HL, Liu LJ, Ma XL, et al. RIP1/RIP3/MLKL-mediated necroptosis contributes to vinblastine-induced myocardial damage[J]. Mol Cell Biochem, 2021, 476(2): 1233-1243.

[20] Wu YJ, Zheng ZZ, Cao XT, et al. RIP1/RIP3/MLKL mediates myocardial function through necroptosis in experimental autoimmune myocarditis[J]. Front Cardiovasc Med, 2021, 8: 696362.

（责任编辑：周一青）

本文引用格式：

田晰晰,吴剑飞,韩思梁,等. 柠檬苦素调节RIP1/RIP3/MLKL信号通路对心肌梗死大鼠心肌细胞坏死性凋亡的影响[J]. 重庆医科大学学报,2025,50(8):1096-1102.