

学校编码：10384

分类号密级

学号：21620120153777

UDC

廈門大學

博士学位论文

细胞坏死过程中的细胞代谢调控  
及机理研究

The mechanism of cell metabolism regulation in necrosis

杨镇滔

指导教师姓名：韩家淮教授

专业名称：生物化学及分子生物学

论文提交日期：2015年7月

论文答辩时间：2015年8月

学位授予日期：2015年

答辩委员会主席：

评阅人：

2015年7月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（ ）课题（组）的研究成果，获得（ ）课题（组）经费或实验室的资助，在（ ）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

本人声明该学位论文不存在剽窃、抄袭等学术不端行为，并愿意承担因学术不端行为所带来的一切后果和法律责任。

声明人（签名）：

指导教师（签名）：

---

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

200 年 月 日

## 摘要

细胞程序性死亡是由细胞内信号决定的自主有序的细胞死亡方式，对正常细胞群的稳定、机体的免疫反应、肿瘤的抑制等都有非常重要的作用。根据细胞死亡形态学上的差异，可以将细胞死亡方式分为细胞凋亡和细胞坏死。

我们通过研究发现，细胞坏死过程中会发生细胞有氧呼吸的强烈激活，而细胞凋亡过程不会发生。对细胞有氧呼吸的抑制可以明显抑制细胞坏死，而对细胞凋亡没有作用，这表明细胞坏死和凋亡对细胞代谢的依赖程度具有明显差异。

RIP3 作为细胞坏死过程中的关键调控因子，在细胞代谢的激活中具有重要作用。在 RIP1/RIP3/MLKL 坏死复合体形成过程中，RIP3 会通过直接磷酸化的方式激活线粒体代谢的关键酶-丙酮酸脱氢酶复合体 (PDC), 促进丙酮酸代谢产生乙酰辅酶 A 而进入三羧酸循环，从而激活细胞有氧呼吸。细胞有氧呼吸激活后在电子传递链上产生大量活性氧 (ROS)，ROS 的产生在细胞内形成氧化性环境而进一步促进坏死复合体的形成，构成正反馈调节，并最终导致细胞坏死。

该论文发现丙酮酸脱氢酶复合物作为 RIP3 的下游底物参与激活细胞有氧呼吸，促进细胞坏死。RIP3 介导的丙酮酸脱氢酶的活性调控，可能为丙酮酸脱氢酶活性异常所引起的相关疾病的治疗提供参考。

**关键词：**细胞凋亡；细胞坏死；有氧呼吸；坏死复合体；活性氧

## Abstract

Programmed cell death is a kind of organized cell suicide regulated by intracellular signals, which is very important to cell population homeostasis, immune response and tumorigenesis inhibition. According to the different morphology, programmed cell death can be divided into apoptosis and necroptosis.

In our study we found that aerobic respiration was activated in necrotic cells, but not in apoptotic cells. Inhibitors and loss-of-function experiments indicated that aerobic respiration contributed to necrosis, but not apoptosis. As a key regulator of necroptosis, RIP3 plays major roles in the activation of cell metabolism. In the process of necrosome(RIP1/RIP3/MLKL) formation, RIP3 phosphorylates and activates pyruvate dehydrogenase complex(PDC), which enhanced the use of pyruvate in the tricarboxylic acid cycle and increased aerobic respiration and ROS production.

Necrosome, PDC and ROS worked as a positive feedback loop to induce downstream effect and necrosis.

The molecular mechanism of PDC activation by RIP3 may provide a new perspective to design drugs for PDC disorder related diseases.

**Key words:** apoptosis; necrosis; aerobic respiration; necrosome; ROS

# 目录

摘要.....	I
Abstract.....	2
Table of content	6
第一章前言.....	9
1.1 细胞程序性死亡简介 .....	9
1.1.1 细胞凋亡与细胞坏死 .....	9
1.1.2 细胞坏死机制 .....	10
1.1.3 细胞坏死的生理学意义 .....	17
1.2 丙酮酸脱氢酶复合体 .....	18
1.2.1 丙酮酸脱氢酶复合体简介 .....	18
1.2.2 丙酮酸脱氢酶复合体的活性调控 .....	20
1.2.3 丙酮酸脱氢酶复合体活性调节的生理意义 .....	22
1.3 靶向基因修饰技术 .....	23
1.3.1 TALEN 介导的靶向基因修饰技术 .....	23
1.3.2 CRISPR 介导的基因编辑技术 .....	25
1.4 立题背景 .....	26
第二章材料与amp;方法.....	27
2.1 实验材料 .....	27
2.2 实验仪器 .....	27
2.3 分子克隆相关实验方法 .....	28
2.3.1 质粒载体 .....	28
2.3.2 DNA 电泳及片段回收 .....	30
2.3.3 DNA 连接反应 .....	30
2.3.4 质粒转化感受态细胞 .....	30
2.3.5 中量提取质粒 .....	31
2.3.6 基因组提取 .....	31
2.3.7 RNA 提取.....	32
2.3.8 RNA 的逆转录.....	32
2.3.9 实时荧光定量 PCR.....	32
2.4 细胞培养及相关实验 .....	33

2.4.1 细胞培养基及相关溶液的配制 .....	33
2.4.2 细胞培养 .....	33
2.4.3 磷酸钙转染法 .....	33
2.4.4 病毒感染 .....	34
2.4.5 电转染 .....	34
2.4.6 流式细胞术检测细胞存活率 .....	35
2.5 蛋白纯化及蛋白质相关实验 .....	35
2.5.1 原核细胞中融合蛋白的纯化 .....	35
2.5.2 免疫共沉淀 (Co-immunoprecipitation, co-IP) .....	36
2.5.3 蛋白质免疫印迹 (Western blot) .....	37
2.5.4 $\gamma$ - $P^{32}$ -ATP 放射性激酶反应实验 .....	38
2.6 细胞代谢相关实验 .....	39
2.6.1 Seahorse 细胞能量代谢分析仪测定细胞酵解产酸速率和有氧呼吸速率 .....	39
2.6.2 丙酮酸脱氢酶复合体活性测定 .....	40
2.6.3 丙酮酸脱氢酶复合体体外激活实验及酶活性测定 .....	41
第三章结果与讨论 .....	43
3.1 细胞坏死和细胞凋亡过程中的细胞代谢情况存在差别 .....	43
3.1.1 L929 细胞坏死过程中糖酵解和有氧呼吸均被激活 .....	43
3.1.2 坏死性刺激下 L929 细胞的有氧呼吸激活依赖于 RIP3 .....	44
3.1.3 小鼠胚胎成纤维细胞坏死过程中会发生依赖于 RIP3 的有氧呼吸激活 .....	44
3.1.4 巨噬细胞系 RAW264.7 细胞坏死过程中会发生依赖于 RIP3 的有氧呼吸激活 .....	45
3.1.5 人源 HeLa 细胞的坏死过程会发生有氧呼吸激活 .....	46
3.1.6 坏死性刺激诱导的有氧呼吸激活依赖于 RIP3 的激酶活性 .....	47
3.1.7 细胞凋亡过程不会发生有氧呼吸的激活 .....	47
3.2 细胞有氧呼吸的激活参与细胞坏死 .....	49
3.2.1 抑制酵解产酸过程不影响细胞坏死 .....	49
3.2.2 抑制有氧呼吸过程可以抑制细胞坏死 .....	50
3.2.3 促进有氧呼吸过程可以加速细胞坏死 .....	54
3.2.4 去除 L929 细胞线粒体可抑制细胞坏死 .....	56
3.2.5 抑制有氧呼吸不影响细胞凋亡 .....	57
3.2.6 模型: 糖代谢与细胞坏死的相关性 .....	58

3.3 坏死性刺激下 RIP3 激活丙酮酸脱氢酶复合体 .....	59
3.3.1 L929 细胞坏死过程中会出现依赖于 RIP3 的 PDC 激活 .....	60
3.3.2 细胞坏死过程中的 PDC 激活不是由于 PDC-E1 $\alpha$ 的去磷酸化 .....	61
3.3.3 体外实验中 RIP3 可直接激活 PDC .....	62
3.3.4 NIH3T3-A 细胞凋亡时 PDC 不激活, 而过表达 RIP3 的 NIH3T3-A 细胞坏死时发生 PDC 激活 .....	63
3.3.5 人源细胞 HeLa 细胞的坏死过程会发生 PDC 激活 .....	65
3.4 RIP3 与丙酮酸脱氢酶复合体存在相互作用 .....	65
3.4.1 坏死性刺激诱导 RIP3 与 PDC 相互作用 .....	66
3.4.2 共转染实验中 RIP3 与 PDC-E1 $\alpha$ , PDC-E1 $\beta$ , PDC-E3 直接相互作用 .....	67
3.5 RIP3 直接磷酸化 PDC-E3 .....	68
3.5.1 RIP3 磷酸化 PDC-E3, 不能磷酸化 PDC-E1 $\alpha$ , PDC-E1 $\beta$ , PDC-E2 .....	68
3.5.2 PDC-E3 被 RIP3 磷酸化的位点位于第 86 位-170 位氨基酸片段上 .....	69
3.6 MLKL 参与 RIP3 对 PDC 的激活 .....	70
3.6.1 <i>MLKL</i> KO L929 细胞中坏死性刺激不能激活有氧呼吸 .....	70
3.6.2 <i>MLKL</i> KO L929 细胞中坏死性刺激不能激活 PDC .....	71
3.6.3 <i>MLKL</i> KO L929 细胞中 RIP3 不能与 PDC 相互作用 .....	71
3.6.4 MLKL 参与 RIP3 的线粒体定位 .....	72
3.7 坏死小体形成与 PDC 激活构成正反馈调节 .....	73
3.7.1 抑制 PDC 活性影响坏死小体的形成 .....	73
3.7.2 ROS 清除剂 BHA 可抑制坏死小体的形成 .....	75
3.7.3 模型: 坏死小体形成与 PDC 激活的正反馈调节 .....	76
3.8 小结与讨论 .....	76
附录 1 图表索引 .....	78
附录 2 缩略语及中英文对照 .....	81
参考文献 .....	85
致谢 .....	92



## Table of content

Abstract in Chinese .....	I
Abstract in English.....	2
Table of content.....	6
Chapter 1 Introduction .....	9
1.1 Programmed cell death .....	9
1.1.1 Apoptosis and necrosis .....	9
1.1.2 Mechanism of necrosis .....	10
1.1.3 The physiological impact of necrosis .....	17
1.2 Pyruvate dehydrogenase complex .....	18
1.2.1 Introduction of pyruvate dehydrogenase complex .....	18
1.2.2 The regulation of pyruvate dehydrogenase complex.....	18
1.2.3 The physiological impact of pyruvate dehydrogenase complex regulation .....	20
1.3 Targeted genome editing .....	22
1.3.1 Targeted genome editing with TALEN .....	23
1.3.2 Targeted genome editing with CRISPR .....	25
1.4 Background .....	26
Chapter 2 Materials and methods .....	27
2.1 Drugs and reagents .....	27
2.2 Instruments .....	27
2.3 Experiments and methods for DNA .....	28
2.3.1 Plasmid vector .....	28
2.3.2 Agarose gel electrophoresis and recovery of DNA .....	30
2.3.3 DNA ligation .....	30
2.3.4 Transformation of DNA into competent cells .....	30
2.3.5 Midi-prep of plasmid DNA by alkaline lysis .....	31
2.3.6 Genome isolation.....	31
2.3.7 RNA isolation.....	32
2.3.8 Reverse transcription of RNA .....	32
2.3.9 Real-time PCR.....	32
2.4 Experiments and methods for cells.....	33

---

2.4.1	Medium and solutions for cell culture	33
2.4.2	Cell culture and passage	33
2.4.3	Calcium phosphate transfection	33
2.4.4	Lentivirus infection	34
2.4.5	Electro-transfection	34
2.4.6	Determination of survival rate by flow cytometer	35
2.5	Experiments and methods for protein	35
2.5.1	Fusion protein purification from e.coli	35
2.5.2	Co- immunoprecipitation	36
2.5.3	Western blot	37
2.5.4	$\gamma$ -P <sup>32</sup> -ATP kinase assay	38
2.6	Experiments and methods for cell metabolism	39
2.6.1	Measurement of OCR and ECAR with seahorse XF analyzer	39
2.6.2	PDC activity assay	40
2.6.3	In-vitro activation of PDC	41
Chapter 3	Result and discussion	43
3.1	Differences in cell metabolism between apoptosis and necrosis	43
3.1.1	Glycolysis and aerobic respiration are both activated in necrotic L929 cells	43
3.1.2	Necrotic stimulation induced aerobic respiration activation is RIP3-dependent	44
3.1.3	Necrotic stimulation induces RIP3 dependent aerobic respiration activation in MEF	44
3.1.4	Necrotic stimulation induces RIP3 dependent aerobic respiration activation in RAW264.7 cells	45
3.1.5	Necrotic stimulation activates aerobic respiration in human cell line HeLa	46
3.1.6	Necrotic stimulation induced aerobic respiration activation needs RIP3 kinase activity	47
3.1.7	Aerobic respiration is not activated in cell apoptosis	47
3.2	Aerobic respiration contributes to necrosis	49
3.2.1	Inhibiting glycolysis can not block cell necrosis	49
3.2.2	Inhibiting aerobic respiration attenuates cell necrosis	50
3.2.3	Enhancing aerobic respiration can promote necrosis	54
3.2.4	Mitochondria depletion in L929 cells attenuates necrosis	56

---

3.2.5 Inhibiting aerobic respiration can not block cell apoptosis .....	57
3.2.6 Proposed model of relationship between glucose metabolism and necrosis .....	58
3.3 RIP3 activate PDC in necrotic cells .....	59
3.3.1 Necrotic stimulation activates PDC in a RIP3 dependent manner in L929 cells ....	60
3.3.2 PDC-E1 $\alpha$ is not dephosphorylated in necrosis related PDC activation.....	61
3.3.3 RIP3 directly activate PDC in vitro.....	62
3.3.4 PDC is activated in necrosis, but not apoptosis.....	63
3.3.5 PDC is activated in necrotic HeLa cells .....	65
3.4 RIP3 interacts with PDC .....	65
3.4.1 Necrotic stimulation induces RIP3 to interact with PDC .....	66
3.4.2 RIP3 interacts with PDC-E1 $\alpha$ , PDC-E1 $\beta$ and PDC-E3 in co-transfection experiments .....	67
3.5 RIP3 phosphorylates PDC-E3.....	68
3.5.1 RIP3 phosphorylates PDC-E3 but not PDC-E1 $\alpha$ , PDC-E1 $\beta$ or PDC-E2.....	68
3.5.2 Phosphorylation site of PDC-E3 locates on 86 -170 amino acid of PDC-E3.....	69
3.6 MLKL is required for PDC activation by RIP3 .....	70
3.6.1 Necrotic stimulation can not activate aerobic respiration in <i>MLKL</i> KO L929 cells .	70
3.6.2 Necrotic stimulation can not activate PDC in <i>MLKL</i> KO L929 cells .....	71
3.6.3 RIP3 can not interact with PDC in <i>MLKL</i> KO L929 cells .....	71
3.6.4 MLKL is required for mitochondria translocation of RIP3.....	72
3.7 Positive feedback between necrosome formation and PDC activation .....	73
3.7.1 Inhibiting PDC activity blocks necrosome formation .....	73
3.7.2 ROS scavenger BHA blocks necrosome formation.....	75
3.7.3 Proposed model of the positive feedback regulation.....	76
3.8 Discussion .....	76
Appendix 1 Index of figures and tables .....	78
Appendix 2 Abbreviations .....	81
Reference .....	85
Acknowledgement .....	92

## 第一章 前言

### 1.1 细胞程序性死亡简介

细胞程序性死亡是由细胞内遗传机制决定的自主有序的细胞死亡方式，对正常细胞群的稳定、机体的免疫反应、肿瘤的抑制等都有非常重要的作用。根据细胞死亡形态学上的差异，可以将细胞死亡方式分为细胞凋亡(apoptosis)和细胞坏死(necroptosis)<sup>[1, 2]</sup>。

针对细胞凋亡的研究由来已久，这使细胞凋亡成为目前研究最为清楚的细胞死亡方式；在细胞凋亡过程中，一连串分子像按照编好的程序一般精确传递信号介导细胞走向死亡。而长久以来，细胞坏死被认为有别于细胞凋亡，是一种不受调节的，被动的死亡方式。最近的一系列研究揭示了细胞坏死受到特定的信号分子的调控，属于细胞程序性死亡的一种<sup>[3-5]</sup>，被称为细胞程序性坏死(necroptosis)。

#### 1.1.1 细胞凋亡与细胞坏死

细胞凋亡是细胞在生长发育过程中或一定刺激条件下，受内在基因严格调控的主动性自杀过程。细胞凋亡的主要特征有：(1) 细胞质皱缩，细胞体积变小；(2) 核染色质断裂、凝集，核酸片段化，细胞内核酸内切酶被活化，将染色质DNA切割为核小体大小整数倍的片段，产生不同长度的寡聚核小体片段；(3) 细胞以出芽方式形成凋亡小体；(5) 整个细胞凋亡过程中细胞膜保持完整，不释放内容物，不引起炎症反应(图 1.1)。

细胞坏死曾被普遍认为是一种细胞在外界强烈的物理或化学条件刺激下的被动死亡方式，是不受调控的，然而近年的研究表明这种观点并不正确，细胞坏死也是受到精确调控的程序性死亡方式。细胞坏死的主要特征有：(1) 胞质透明化，细胞器膨胀破裂；(2) 细胞核皱缩，染色质DNA降解；(3) 胞膜通透性增加，胞内水泡不断增大，细胞结构完全消失，细胞肿胀直至最后破裂；(4) 细胞

质膜破裂，释放内含物，引起周围组织的炎症反应（图 1.1）。这些特征与细胞凋亡具有显著差别。

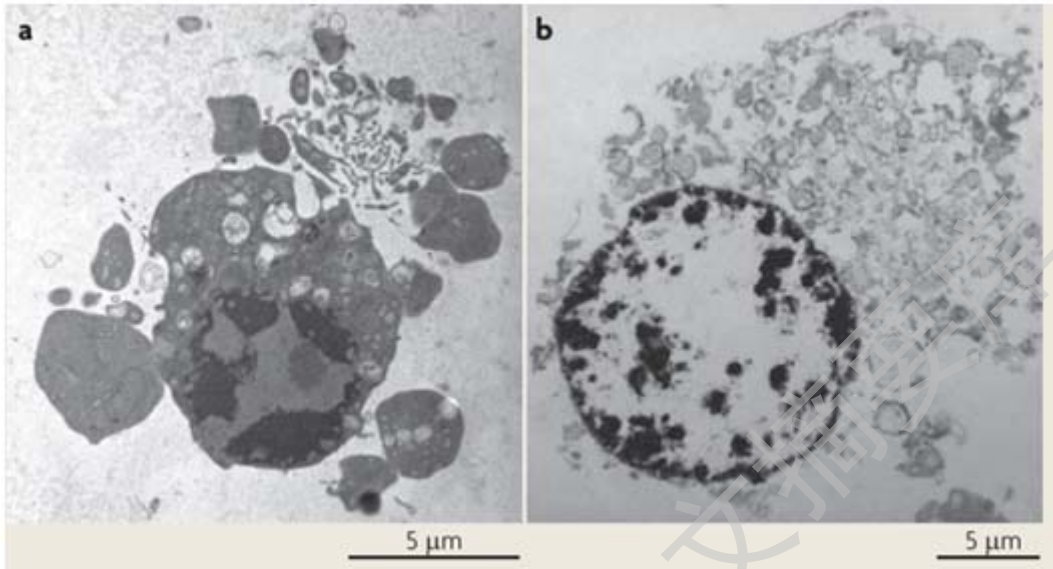


图 1. 1 细胞凋亡和细胞坏死的形态学区别

Fig. 1.1 The morphology difference between apoptotic and necrotic cell  
(by Peter Vandenabeele, 2010<sup>[6]</sup>)

### 1.1.2 细胞坏死机制

细胞坏死可由多种刺激引起。细胞表面的死亡受体（Death Receptor）家族、病原识别受体（Pathogen-Recognition Receptor, PRR）家族可以通过其配体诱导细胞坏死，病毒、细菌及细胞内部损伤也可以引发细胞坏死。本文对于细胞坏死的研究集中于 TNF- $\alpha$  等死亡受体的配体所诱导的细胞程序性坏死。

#### 1.1.2.1 细胞坏死的信号传导

死亡受体（Death receptor）家族是一类在细胞表面的跨膜受体，包括 TNF 受体 I (TNFR1)、Fas (又称 CD95)、TNF 相关凋亡诱导配体受体 1 和 2 (TRAILR1, 2) 等。早期的研究表明，死亡受体介导的信号通路是调节细胞凋亡的外源性信号，与线粒体介导的细胞凋亡的内源性信号相对应<sup>[7]</sup>。通常，死亡受体和对应的配体结合后，通过一系列信号传导，经过线粒体内源性信号通路的放大，可以强

烈的诱导细胞凋亡。但是在某些细胞株中(比如 L929 小鼠成纤维细胞), 这些刺激却可以引起细胞坏死<sup>[7-10]</sup>。

TNF, TRAIL 和 FasL 都可以通过其相应的受体 (TNFR1, TRAILR, Fas) 诱导细胞坏死<sup>[8]</sup>。下文中将以 TNF 为例进行介绍。TNF 可以形成同源三聚体, 三聚化的 TNF 与 TNFR1 结合时会促进 TNFR1 寡聚化而形成同源三聚体。TNFR1 的寡聚化导致其胞内结构域出现构象变化, 从而募集一个含有死亡结构域的蛋白-肿瘤坏死因子 1 型受体相关的死亡结构域蛋白 (TNFR1 associated death domain protein, TRADD)。作为一个与受体相互作用的重要连接蛋白 (adaptor protein), TRADD 随后会募集 RIP1, TRAF2, cIAP 等蛋白而形成复合物 I (complex I)。之后会发生 TNFR1 的内吞, 复合体 I 从细胞膜上脱落进入胞质内。此时, 细胞可能面临两种命运: (1) TRADD 和 RIP1 募集 Caspase 8 和 FADD, 形成含有 TRADD, RIP1, Caspase 8, FADD, 的复合体 IIa (complex IIa)。complex IIa 通过 Caspase 8 诱导细胞凋亡。(2) 当 Caspase 8 活性受到抑制, 且细胞内存在 RIP3 时, TRADD, RIP1 可以募集 FADD, Caspase 8, RIP3 而形成复合体 IIb (complex IIb), 从而诱导细胞坏死。

#### 1.1.2.1.1 复合体 I

当 TRADD 被募集到 TNFR1 之后, 会迅速募集 RIP1, cIAP1/2, TRAF2/5, 在细胞膜的内侧形成复合体 I<sup>[11]</sup>。TRAF2 蛋白含有 RING 结构域, 具有泛素连接酶 E3 (E3 ubiquitin ligase E3) 活性, 负责将泛素连接到特定的底物上。根据泛素连接的氨基酸所在物质, 可以分为 K48 和 K63 泛素化。通常 K48 泛素化导致蛋白被蛋白酶体识别而降解, 而 K63 泛素化参与蛋白信号传导, 不过也存在特例。Chen. ZJ 等人认为, TRAF2 与泛素结合酶 E2 一起共同催化 RIP1 的丝氨酸 377 发生 K63 多聚泛素化<sup>[12]</sup>。不过, 后来 Bertrand 等人进一步完善了这个模型, 他们的研究发现 RIP1 K63 多聚泛素化的直接执行者是 cIAP1 和 cIAP2<sup>[13]</sup>。在复合体 I 形成之后, cIAP1 和 cIAP2, 以及 TRAF2 共同参与 RIP1 K377 位点的 K63 泛素化; 生长因子  $\beta$  活化激酶 1 (growth factor  $\beta$  activated kinase 1, TAK1) 复合体通过其相互作用蛋白 TAB2/3 上的新型锌指结构域 (novel zinc finger domain, NZF domain) 与 RIP1-K63 的多聚泛素链相结合并被激活。IKK (Inhibitor

of  $\text{kB}$  kinase) 复合体通过 NEMO 也被募集到 RIP1-K63 多聚泛素连接链上后, 活化的 TAK1 会通过磷酸化而激活  $\text{IKK}\beta$ 。被激活的  $\text{IKK}\beta$  磷酸化 I $\text{kB}$  而导致其泛素化降解, 解除其对 NF $\kappa$ B 二聚体的抑制, 从而促进 NF $\kappa$ B 入核行使转录调节功能。TNF 刺激引起的 NF $\kappa$ B 激活被认为有利于细胞的存活<sup>[14]</sup>。

### 1.1.2.1.2 复合体 II

复合体 I 形成后, 激活 NF $\kappa$ B, 促进细胞的存活。在某些条件下, 比如 TNF 和 Smac mimetic 处理细胞时 (Smac mimetic 可抑制 cIAP1/2), RIP1 会从 TNFR1 上解离, 通过募集 FADD 和 Caspase 8 而重新组装成复合体 II a, 而诱导 Caspase 8 依赖的细胞凋亡。当 Caspase 8 活性被抑制时 (比如 Caspase 抑制剂 zVAD 处理细胞), RIP3 可以被募集到复合体 II 中, 形成新的含有 RIP3 的复合体 II b。复合体 II b 可以诱导 RIP1 和 RIP3 依赖的细胞坏死, 故又被称为坏死小体 (necrosome)<sup>[15]</sup>。复合体 I 与复合体 II 之间的转化示意图见图 1.2。

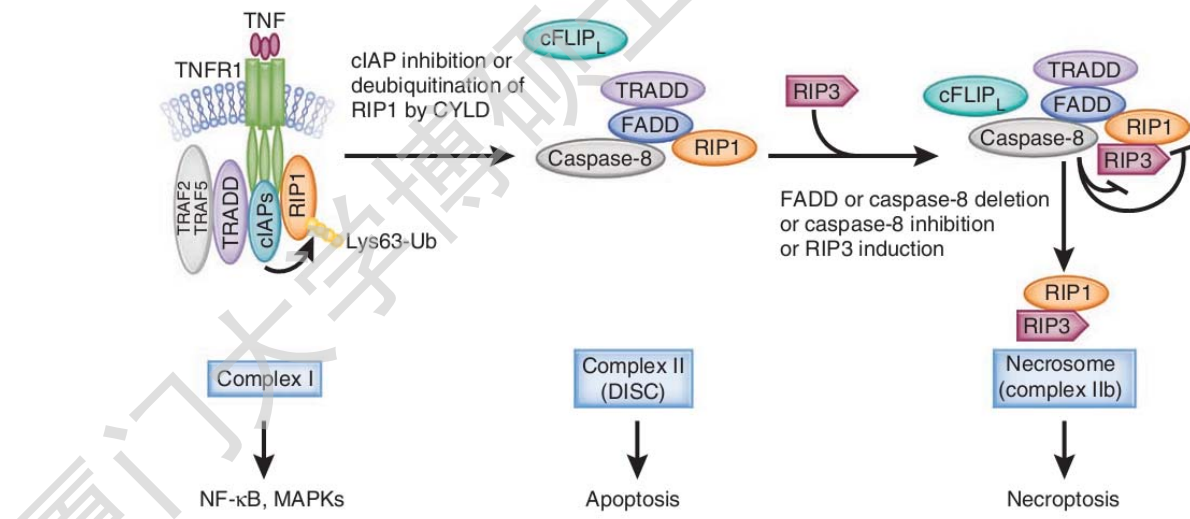


图 1.2 TNF 诱导下的复合体 I 和复合体 II<sup>[15]</sup>

Fig. 1.2 Model of complex I and II induced by TNF

细胞坏死的信号传导过程中, RIP1、RIP3 以及 MLKL 是核心的信号蛋白, 其具体机理将在本文的后续部分详细介绍。

### 1.1.2.2 RIP1 是细胞坏死过程中的重要蛋白

(Receptor-interacting protein kinase, RIPK) 受体相互作用蛋白激酶是一类具有丝氨酸、苏氨酸激酶活性的蛋白。在研究 TNF 等细胞因子诱导细胞坏死的机制过程中, Holler 等人于 2002 年发现在 FasL 处理下, 人源的原代 T 细胞会发生坏死, 且这种细胞坏死依赖于受体相互作用蛋白激酶 1 (Receptor-interacting Protein Kinase 1, RIP1)。通过 RNA 干扰技术敲低 RIP1 的表达能够抑制细胞坏死, 且 RIP1 的激酶活性是细胞坏死过程所必须的<sup>[9]</sup>, 表达激酶活性缺失的 RIP1 (D138N 和 K45A) 的基因敲进的小鼠细胞完全抵抗细胞坏死<sup>[16, 17]</sup>。除了在细胞坏死中的作用外, RIP1 还具有另一个重要功能是在 TNF 诱导下激活 NF- $\kappa$ B 信号通路<sup>[18, 19]</sup>, 从而激活抗凋亡信号, 促进细胞的生存。

在小鼠体内, RIP1 基因敲除会导致胚胎致死<sup>[19]</sup>, 而在 caspase-8 和 RIP3 双敲除的背景下, RIP1 缺失导致的胚胎致死情况会消失<sup>[16, 20, 21]</sup>, 在 caspase-8 或者 RIP3 单敲除的情况下, RIP1 缺失仍然导致胚胎致死。这说明在体内, RIP1 的存在可能参与抑制凋亡和坏死。

RIP1 既能够参与激活 NF- $\kappa$ B 信号通路促进细胞生存, 也能够介导死亡信号诱导细胞死亡, 且在小鼠体内, RIP1 的正常表达还可以抑制细胞凋亡。因此, RIP1 是一个功能复杂且在决定细胞是生存还是死亡中具有重要地位的蛋白<sup>[22]</sup>。

### 1.1.2.3 RIP3 是决定细胞走向凋亡还是坏死的关键蛋白

在细胞程序性死亡研究领域, 一直存在着一个重要的科学问题, 即同一种刺激物在不同细胞中能诱导不同类型的死亡方式。比如, TNF 可以诱导入源乳腺癌细胞株 MCF-7 和杂交瘤衍生细胞 PC60 等发生细胞凋亡, 而在小鼠成纤维细胞 L929 中 TNF 却导致细胞坏死。甚至在两株不同来源的 NIH-3T3 细胞中, TNF 可以分别导致细胞凋亡和细胞坏死。在 2009 年, Zhang, D.W. 等人经研究发现, RIP3 的表达与否决定了 TNF 刺激下的 NIH-3T3 细胞的死亡类型, 表达 RIP3 的细胞走向坏死而不表达 RIP3 的细胞走向凋亡<sup>[4]</sup>。在此同时, Cho, Y.S. 和 He, S. 等人也分别发现 RIP3 是细胞坏死过程中的关键蛋白, 坏死性刺激下 RIP1 会与 RIP3 形成复合体传递信号, 最终导致细胞坏死<sup>[3, 5]</sup>。



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库