

TNF- α 对成骨细胞程序性坏死的影响及相关机制的研究

刘 凯¹ 卓鸿武¹ 刘建忠² 柯典闪^{2*}

1.厦门大学附属福州第二医院骨科,福建福州 350007;2.福建中医药大学附属康复医院 福建省康复产业研究院老年康复科,福建福州 350001

[摘要] 目的 分析 TNF- α 对成骨细胞程序性坏死的影响并分析其机制。方法 分离并常规培养小鼠乳鼠成骨细胞,采用 TNF- α 干预诱导细胞程序性坏死,Nec-1 干预抑制细胞坏死。并采用正常培养的成骨细胞为正常对照组。MTT 法检测细胞增殖情况;Tunel 和 Caspase 3 双染法检测细胞的程序性坏死情况;Western blot 检测细胞 RIP1、RIP3、MLKL 蛋白表达水平。结果 与正常对照组比较,TNF- α 组增殖活性降低,程序性坏死数量增加($P < 0.05$);与 TNF- α 组比较,TNF- α +Nec-1 组增殖活性显著增加,程序性坏死数量降低($P < 0.05$);随着时间延长,各组之间的差异更加显著($P < 0.05$)。与正常对照组比较,TNF- α 组 RIP3、MLKL 蛋白表达降低($P < 0.05$);TNF- α +Nec-1 组 RIP3、MLKL 蛋白表达高于 TNF- α 组($P < 0.05$)。结论 TNF- α 能够抑制成骨细胞增殖,促进细胞发生程序性坏死,这可能是通过降低成骨细胞的 RIP3、MLKL 蛋白表达来完成的。

[关键词] 肿瘤坏死因子 α ;成骨细胞;程序性坏死

[中图分类号] R684 [文献标识码] A [文章编号] 1673-7210(2018)03(c)-0018-05

Effect and its related mechanism of TNF- α on programmed necrosis of osteoblasts

LIU Kai¹ ZHUO Hongwu¹ LIU Jianzhong² KE Dianshan^{2*}

1.Department of Orthopedics, Fuzhou Second Hospital of Xiamen University, Fujian Province, Fuzhou 350007, China; 2.Department of Geriatrics Rehabilitation, Fujian Institute of Rehabilitation Industry Affiliated Rehabilitation Hospital of Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fujian Province, Fuzhou 350001, China

[Abstract] **Objective** To explore the effect and its related mechanism of TNF- α on programmed necrosis of osteoblasts. **Methods** Mice osteoblasts were isolated and cultured from suckling mice, and TNF- α was used to induce programmed necrosis of osteoblasts, Nec-1 was used to inhibit cell necrosis. Normal cultured osteoblasts were used as normal control group, and MTT assay was used to detect the cell proliferation. Tunel and Caspase 3 double staining was used to detect the programmed necrosis of osteoblasts. The expression of RIP1, RIP3 and MLKL were detected by Western blot. **Results** Compared with the normal control group, the proliferation activity of TNF- α group was decreased and the number of programmed necrosis was increased ($P < 0.05$). After the Nec-1 treatment, the proliferative activity was significantly increased compared with TNF- α group, and the number of programmed necrosis was decreased ($P < 0.05$). As time went on, the differences between the groups became more pronounced ($P < 0.05$). Compared with the normal control group, expression of RIP3 and MLKL protein in TNF- α group was significantly lower than that in normal control ($P < 0.05$). After the Nec-1 treatment, the expression of RIP3 and MLKL protein had significantly differences compared with TNF- α group ($P < 0.05$). **Conclusion** TNF- α can inhibit osteoblast proliferation and promote programmed necrosis of osteoblasts, which may be accomplished by reducing the expression of RIP3 and MLKL proteins in osteoblasts.

[Key words] TNF- α ; Osteoblasts; Programmed necrosis

骨质疏松症是一种全身性骨代谢性疾病,绝经后骨质疏松是以雌激素缺乏诱导破骨细胞生成成为特征

[基金项目] 福建省科技厅科技平台建设项目(2015Y2001);福建省福州市科技计划项目(2017-S-130-6)。

*通讯作者

的疾病,是一种炎症过程^[1-2]。绝经后骨质疏松产生的原因与雌激素水平下降,炎症因子表达升高有关,他们的变化可促进破骨细胞增殖分化及细胞融合,也可抑制破骨细胞凋亡,导致骨吸收增加,最终导致成骨细胞及破骨细胞偶联失衡,诱发骨质疏松^[3]。肿瘤坏死因

子 α (TNF- α)能与细胞膜上肿瘤坏死因子受体(TNFR1)结合,激活多条信号通路,从而引起细胞炎症反应或者细胞死亡^[4]。核转录因子- κ B(NF- κ B)作为TNF- α 直接激活的下游转录因子,在TNF信号通路中起着不可或缺的作用。细胞程序性坏死是一类因病理而产生的被动死亡,发生程序性坏死的细胞表现为细胞膜通透性增高,细胞肿胀,细胞器变形或肿大,最后细胞破裂,因此被认为是无序的过程,无从进行调控^[5]。研究指出,程序性细胞坏死的发生发展与TNFR家族有关^[6-7]。本研究选取成骨细胞,采用TNF- α 进行干预,分析TNF- α 对成骨细胞程序性坏死的影响及机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

MTT(美国Sigma公司);RPMI-1640培养基(美国Gibco公司),胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司);Tunel试剂盒(江苏碧云天生物有限公司),兔抗鼠受体相互作用蛋白1(RIP1)、RIP3、混合谱系激酶结构区域样蛋白(MLKL)多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司),Caspase 3多克隆抗体(proteintech有限公司),兔抗鼠 β -actin单克隆抗体(美国Sigma公司)。

1.2 主要设备

培养箱(Thermo公司),二氧化碳孵箱(SANYO公司),倒置显微镜(Nikon公司),台式低温高速离心机(Beckman公司),-80℃冰箱(SANYO公司)。

1.3 实验动物

出生2~3 d的清洁级SD小鼠乳鼠30只,购自上海斯莱克公司实验动物中心,实验动物合格证号(1131800667)。

1.4 实验方法

1.4.1 成骨细胞的分离培养及鉴定 成骨细胞采用胰蛋白酶和型胶原酶消化方法的从乳鼠颅骨中提取。将细胞消化成单细胞悬液,然后调整浓度到 2×10^5 个/mL浓度。吹打均匀后,接种到培养瓶中,置于37℃,含5% CO₂培养箱内进行培养。48 h换液,弃去悬浮的死细胞,每隔2 d换液。通过细胞形态,骨钙化结节染色和碱性磷酸酶细胞化学染色三方面对成骨细胞进行鉴定。

1.4.2 细胞培养 采用含有10%新生牛血清的DMEM培养基,置于5% CO₂、37℃饱和湿度培养箱中培养。将培养的细胞用0.25%的胰酶消化,以 10^5 个/L接种于24孔板,待细胞长至70%~80%融合状态时,用不含血清的培养液饥饿培养24 h。待原代细胞长满瓶壁后,弃去原培养液,加入0.25%胰酶溶液3~5 min至

细胞收缩变圆,加入适量培养液并用弯吸管吹打细胞,使之脱落并分散成单细胞悬液。

1.4.3 实验处理及分组 将处于对数生长期的第3代成骨细胞以 1×10^4 个/mL均匀接种于6孔培养板,每孔2 mL,置于37℃、5% CO₂培养箱培养。TNF- α 溶于灭菌的PBS溶液中,配制成TNF- α 存储液,混匀分装,-80℃保存。正常对照组细胞正常培养,TNF- α 组细胞给予10 μ mol/L的TNF- α 干预,培养4~6 h后换液,48 h后处理细胞。TNF- α +Nec-1组细胞除采用TNF- α 进行干预外,给予程序性坏死和凋亡抑制剂Nec-1干预培养的成骨细胞,继续培养48 h。

1.4.3 MTT法检测成骨细胞的增殖活性变化 收集对数期生长的成骨细胞,用培养液调整细胞悬液的浓度,以 8×10^4 个/孔种植于细胞培养板上,设定温度37℃、5% CO₂培养箱中培养。12、24、48 h后检测细胞活性。加入MTT溶液20 μ L(5 mg/mL),孵育4 h,终止培养,每孔加150 μ L二甲基亚砷,振荡10 min,在酶联免疫检测仪570 nm处测量各孔的吸光度(A值)。以A为纵坐标,以时间(h)为横坐标,绘制生长曲线。

1.4.4 Caspase3和Tunel双染法检测组成骨细胞的程序性坏死情况 成骨细胞铺板,给予相应的药物治疗后,PBS洗3遍,然后采用福尔马林固定10 min,之后采用山羊血清封闭20 min后,孵育Caspase 3一抗(1:100)4℃过夜,第2天恢复到室温后,再放置30 min,PBS冲洗后,孵育FITC标记的绿色荧光二抗,洗涤后进行常规Tunel染色,按试剂盒说明书进行。采用3%过氧化氢甲醇中浸洗10 min,用0.2% Triton 孵育5 min后,用PBS洗2次,切片组织上每块组织滴加50 μ L的Tunel反应液,37℃避光孵育1 h,PBS洗3次后,在荧光显微镜下拍照。Caspase 3阴性Tunel阳性的细胞为坏死细胞。随机选取10个视野,计算坏死细胞百分比。

1.4.5 Western blot检测成骨细胞RIP1、RIP3、MLKL蛋白表达的变化 加0.1 mg/mL PMSF、抑肽酶和磷酸转移酶抑制剂裂解细胞,加0℃ RIPA裂解液50 μ L,用细胞刮仔细刮取蛋白,4℃环境下以12 000 r/m离心30 min,吸取上清,分装后置于-80℃超低温冰箱冻存。取提取的细胞蛋白质样品加入等体积的2倍上样缓冲液,100℃煮沸5 min,在5%积层胶和10% SDS-PAGE凝胶上进行电泳分离待测蛋白。10 V半干式电转膜至PVDF膜上,根据分子量Marker观察蛋白质转移情况。TBST摇床上洗5 min,37℃用5%脱脂奶粉封闭2 h,加入抗兔一抗(β -actin、RIP1、RIP3、MLKL,稀释为1:1000)4℃孵育过夜,TBST洗涤后,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗,室温

下摇床孵育 1 h, TBST 洗涤后, 采用 ECL 法进行化学发光, 然后用 Alphalmager TM 2200 进行图像分析, 结果以各目的蛋白与 β -actin 的灰度比值表示。

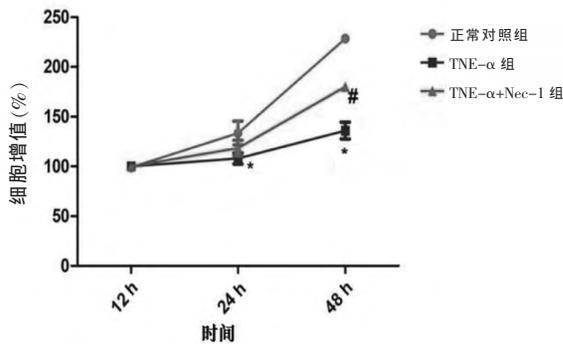
1.5 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行数据分析, 计量资料数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 重复测量资料采用重复测量方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成骨细胞的增殖活性变化

处理 24 h 后, TNF- α 组细胞增殖能力均低于正常对照组 ($P < 0.05$), TNF- α +Nec-1 组成骨细胞增殖能力高于 TNF- α 组 ($P < 0.05$)。处理 48 h 后, 各组细胞增殖趋势没有变化, 但各组间差异进一步放大 ($P < 0.05$)。见图 1。



与正常对照组比较, * $P < 0.05$, 与 TNF- α 组比较, # $P < 0.05$

图 1 成骨细胞的增殖活性变化 (n=10)

2.2 TUNEL 和 Caspase 3 双染法检测成骨细胞的程序性坏死情况

TNF- α 组细胞程序性坏死数量高于正常对照组 ($P < 0.05$); TNF- α +Nec-1 组成骨细胞程序性坏死数量低于 TNF- α 组 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 2 成骨细胞程序性坏死情况 (n=10)

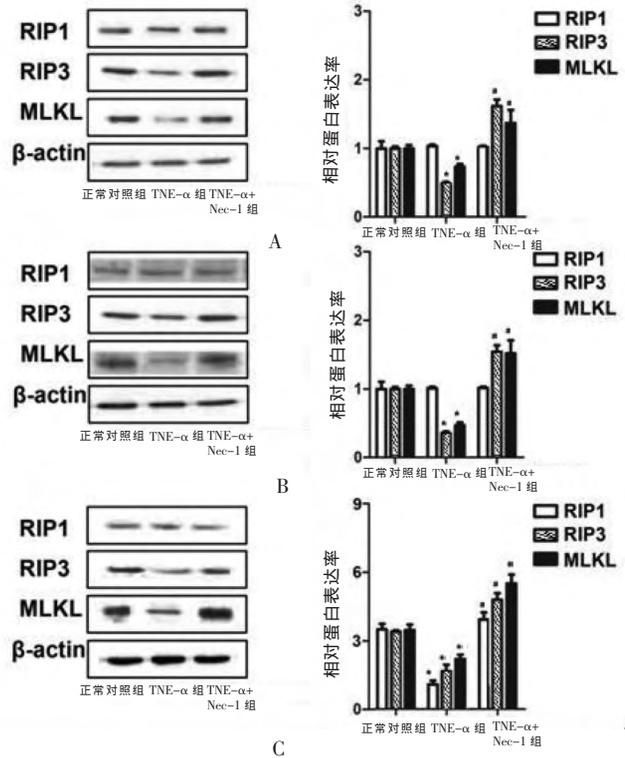
组别	12 h	24 h	48 h
正常对照组	5.63 \pm 0.25	6.89 \pm 0.35	8.03 \pm 0.67
TNF- α 组	15.87 \pm 2.07*	19.89 \pm 2.24*	23.64 \pm 2.47*
TNF- α +Nec-1 组	6.13 \pm 0.21#	7.20 \pm 0.18#	8.17 \pm 0.21#

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$, 与 TNF- α 组比较, # $P < 0.05$

2.3 成骨细胞 RIP1、RIP3、MLKL 蛋白的表达

在处理 12 h 和 24 h 时, 与正常对照组比较, TNF- α 组成骨细胞 RIP1 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而 RIP3、MLKL 蛋白表达降低 ($P < 0.05$); 与 TNF- α 组比较, TNF- α +Nec-1 组成骨细胞 RIP1 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$), RIP3、MLKL 蛋白表达明显上

调 ($P < 0.05$)。到 48 h 时, TNF- α 组 RIP1 表达明显低于正常对照组, TNF- α +Nec-1 组成骨细胞 RIP1 表达高于 TNF- α 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 2。



A: 12 h; B: 24 h; C: 48 h; 与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与 TNF- α 组比较, # $P < 0.05$; RIP1: 受体相互作用蛋白 1; RIP3: 受体相互作用蛋白 3; MLKL: 混合谱系激酶结构区域样蛋白

图 2 各组成骨细胞 RIP1、RIP3、MLKL 蛋白的表达 (n=10)

3 讨论

随着人口的老龄化, 骨质疏松症已成为中老年人骨痛、骨折的主要原因。目前, 治疗骨质疏松的主要药物是雌激素和二磷酸盐为代表的抗骨吸收的药物, 但治疗效果不尽如人意。探索骨质疏松症的发生机制, 寻求更为有效的治疗方式是近几年来研究者的关注重点。

细胞的死亡机制一直是生物医学研究的核心热点之一, 目前公认的主要细胞死亡类型有“坏死”“凋亡”和“自噬”三种^[8]。特别是凋亡和自噬均需要能量和合成新的蛋白质, 是一个细胞自我调控的主动过程, 因此也被称为“程序性死亡”^[9], 而细胞程序性坏死, 则是一个被动的过程。其中由 TNF- α 介导的细胞坏死的分子机制及其在炎症等病理过程中的作用研究较多。本研究重点分析 TNF- α 对成骨细胞程序性细胞死亡的影响及机制。

本研究选取小鼠乳鼠, 分离培养成骨细胞, 采用

TNF- α 干预的动物作为模型动物处理,加入程序性坏死和凋亡抑制剂 Nec-1 干预的动物作为实验动物处理,正常对照组为常规培养成骨细胞。首先检测成骨细胞的增殖活性变化,TNF- α 组细胞的增殖活性较正常对照组降低,TNF- α +Nec-1 组在相同时间段的细胞增殖活性高于 TNF- α 组,但低于正常对照组,随着时间延长,TNF- α +Nec-1 组细胞增殖活性略有升高。有研究指出,程序性坏死过程可被 RIP1 激酶抑制剂 Nec-1 阻断,Nec-1 是最早鉴定的坏死抑制剂,可特异性抑制 RIP1 的激酶活性^[10-11]。提示 TNF- α 能够抑制成骨细胞的增殖活性,细胞程序性和凋亡抑制剂 Nec-1 能够对 TNF- α 的抑增殖效应产生一定的抑制作用。本研究进一步检测成骨细胞的程序性坏死情况,TNF- α 组的细胞程序性坏死数量高于正常对照组,细胞出现损伤;TNF- α +Nec-1 组成骨细胞程序性坏死数量低于 TNF- α 组,但高于正常对照组;随着时间延长,TNF- α +Nec-1 组细胞程序性坏死数量略有升高。研究表明,细胞坏死是一种受到精密调控的“新型”程序性细胞死亡方式^[12]。当细胞凋亡不能正常发生而细胞必须死亡时,坏死可以作为凋亡的“替补”方式被激活。相关研究提示,程序性细胞坏死在中风、心肌梗死、缺血/再灌注损伤、动脉硬化等多种人类疾病病理学中发挥着重要的作用^[13-15]。在非酒精性脂肪性肝病患者中程序性坏死升高,脂肪型肝炎的动物模型中 TNF- α 导致的氧化应激损伤有 RIP3 依赖的肝细胞程序性坏死发生^[16]。本研究结果提示,TNF- α 能够促进成骨细胞的发生程序性细胞坏死,Nec-1 能够抑制成骨细胞的程序性坏死发生。为了研究 TNF- α 对成骨细胞程序性细胞死亡的影响机制,本研究最后检测成骨细胞 RIP1、RIP3、MLKL 蛋白的表达,相同时间段比较,在 12 h 和 24 h 各组成骨细胞 RIP1 表达无明显改变;TNF- α 组 RIP3、MLKL 蛋白表达正常对照组,TNF- α +Nec-1 组 RIP3、MLKL 蛋白表达高于 TNF- α 组。既往研究指出,程序性细胞坏死主要由 TNFR 家族以及 Toll 样受体家族启动,并通过和受体蛋白相互作用的两个蛋白激酶 RIP1 和 RIP3 传递死亡信号,募集并磷酸化 MLKL,而 MLKL 作为细胞死亡的执行者,最终会导致坏死的发生,坏死的细胞会向周围释放其内容物,这些内容物作为 DAMPs 可刺激周围细胞发生炎症反应,激活机体免疫应答^[17-18]。研究表明,TNF- α 既可以通过激活 NF- κ B 诱导细胞生存途径,也可以通过 RIP1 诱导 Caspases 依赖性的细胞凋亡,RIP1 在该信号通路中的功能相当是下游信号通路的一个支架蛋白是不依赖于其激酶活性的^[19]。当 RIP3 和 MLKL 的表达水平足够高时,RIP3 和 RIP1

会通过它们各自的 RHIM 结构域相互结合,活化的 RIP3 募集 MLKL,激活坏死途径^[20]。本研究结果表明,TNF- α 可能是通过降低成骨细胞的 RIP3、MLKL 蛋白表达来达到抑制成骨细胞增殖,促进成骨细胞发生程序性坏死的目的,而 Nec-1 能够对 TNF- α 的效应产生一定的抑制作用。

可见,TNF- α 能够抑制成骨细胞的增殖活性,促进成骨细胞的发生程序性细胞坏死,细胞程序性和凋亡抑制剂 Nec-1 能够对 TNF- α 的抑增殖和促凋亡效应产生一定的抑制作用,这可能是通过降低成骨细胞的 RIP3、MLKL 蛋白表达来完成的。骨质疏松症在临床上较为常见,发病率高,如何通过进一步的研究及分析寻找更为有效的治疗手段对临床治疗来说至关重要。未来可进一步从分子、基因角度进行分析,探索更多的细胞因子、蛋白基因与骨质疏松症发生发展的关系及相关的信号通路调控,以求探索到更佳的诊疗方向,促进患者恢复健康。

[参考文献]

- [1] Tella SH, Gallagher JC. Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2014, 142(1): 155-170.
- [2] Liu Y, Cao Y, Zhang S, *et al.* Romosozumab treatment in postmenopausal women with osteoporosis: a Meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Climacteric*, 2018, 21(2): 189-195.
- [3] Spartalis M, Papagianni A. Receptor activator of nuclear factor κ B ligand/osteoprotegerin axis and vascular calcifications in patients with chronic kidney disease [J]. *World J Nephrol*, 2016, 5(1): 1-5.
- [4] Ma M, Luo S, Chen X, *et al.* Immune system-related differentially expressed genes, transcription factors and microRNAs in post-menopausal females with osteopenia [J]. *Scand J Immunol*, 2015, 81(3): 214-220.
- [5] Subramaniam M, Pitel KS, Bruinsma ES, *et al.* TIEG and estrogen modulate SOST expression in the murine skeleton [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(4): 3540-3551.
- [6] Huang J, Yu S, Ji C, *et al.* Structural basis of cell apoptosis and necrosis in TNFR signaling [J]. *Apoptosis*, 2015, 20(2): 210-215.
- [7] Bertrand MJ, Milutinovic S, Dickson KM, *et al.* cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination [J]. *Mol Cell*, 2008, 30(6): 689-700.
- [8] Galluzzi L, Kroemer G. Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis [J]. *Cell*, 2008, 135(7): 1161-1163.

(下转第 40 页)

- struggle in the penumbra [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2003, 62(4): 329-339.
- [43] Tsubokawa T, Yamaguchi -Okada M, Calvert JW, *et al.* Neurovascular and neuronal protection by E64d after focal cerebral ischemia in rats [J]. *J Neurosci Res*, 2006, 84(4): 832-840.
- [44] Anagli J, Abounit K, Stemmer P, *et al.* Effects of cathepsins B and L inhibition on postischemic protein alterations in the brain [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 366(1): 86-91.
- [45] Iadecola C, Alexander M. Cerebral ischemia and inflammation [J]. *Curr Opin Neurol*, 2001, 14(1): 89-94.
- [46] Stoll G, Jander S, Schroeter M. Detrimental and beneficial effects of injury-induced inflammation and cytokine expression in the nervous system [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2002, 513: 87-113.
- [47] Wang ZQ, Chen XC, Yang GY, *et al.* U0126 prevents ERK pathway phosphorylation and interleukin-1 β mRNA production after cerebral ischemia [J]. *Chin Med Sci J*, 2004, 19(4): 270-275.
- [48] 韩新光, 温博贵. 表皮生长因子受体抑制剂 AG148 对舌鳞状细胞癌细胞 Tca8113 细胞外信号调节激酶抑制作用的研究 [J]. *现代口腔医学杂志*, 2006, 20(2): 164-166.
- [49] Yang SI, Yuan Y, Jiao S, *et al.* Calcitonin gene-related peptide protects rats from cerebral ischemia/reperfusion injury via a mechanism of action in the MAPK pathway [J]. *Biomed Rep*, 2016, 4(6): 699-703.
- [50] Jeffries MA, Urbanek K, Torres L, *et al.* ERK1/2 Activation in Preexisting Oligodendrocytes of Adult Mice Drives New Myelin Synthesis and Enhanced CNS Function [J]. *J Neurosci*, 2016, 36(35): 9186-9200.
- [51] Maddahi A, Edvinsson L. Cerebral ischemia induces microvascular pro-inflammatory cytokine expression via the MEK/ERK pathway [J]. *J Neuroinflammation*, 2010, 7: 14.
- (收稿日期: 2017-12-25 本文编辑: 李岳泽)

(上接第 21 页)

- [9] Rickard JA, O'Donnell JA, Evans JM, *et al.* RIPK1 regulates RIPK3-MLKL-driven systemic inflammation and emergency hematopoiesis [J]. *Cell*, 2014, 157(5): 1175-1188.
- [10] Pasparakis M, Vandenabeele P. Necroptosis and its role in inflammation [J]. *Nature*, 2015, 517(1): 311-320.
- [11] Linkermann A, Brasen JH, De Zen, *et al.* Dichotomy between RIP1- and RIP3-mediated necroptosis in tumor necrosis factor- α -induced shock [J]. *Molr Med*, 2012, 18(9): 577-586.
- [12] Greenblatt MB, Shim JH, Zou W, *et al.* The p38 MAPK pathway is essential for skeletogenesis and bone homeostasis in mice [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(7): 2457-2473.
- [13] Oerlemans MI, Liu J, Arslan F, *et al.* Inhibition of RIP1-dependent necrosis prevents adverse cardiac remodeling after myocardial ischemia-reperfusion *in vivo* [J]. *Basic res cardiol*, 2012, 107(4): 270.
- [14] Matsuoka Y, Tsujimoto Y. Role of RIP1 in physiological enterocyte turnover in mouse small intestine via non-apoptotic death [J]. *Genes Cells*, 2015, 20(1): 11-28.
- [15] Tang AC, Rahavi SM, Fung SY, *et al.* Combination therapy with proteasome inhibitors and TLR agonists enhances tumour cell death and IL-1 β production [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2): 162.
- [16] Afonso MB, Rodrigues PM, Carvalho T, *et al.* Necroptosis is a key pathogenic event in human and experimental murine models of non-alcoholic steatohepatitis [J]. *Clin Sci*, 2015, 129(8): 721-739.
- [17] Zhou W, Yuan J. Necroptosis in health and diseases [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2014, 35(1): 14-23.
- [18] Pasparakis M, Vandenabeele P. Necroptosis and its role in inflammation [J]. *Nature*, 2015, 517(4): 311-320.
- [19] Moquin DM, McQuade T, Chan FK. CYLD deubiquitinates RIP1 in the TNF α -induced necrosome to facilitate kinase activation and programmed necrosis [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e76 841.
- [20] Wang H, Sun L, Su L, *et al.* Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3 [J]. *Molecular Cell*, 2014, 54(1): 133-146.
- (收稿日期: 2018-02-15 本文编辑: 李岳泽)