

学校编码: 10384

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_

学号: 21720090153551

UDC \_\_\_\_\_

廈門大學

博 士 学 位 论 文

G 蛋白  $\beta\gamma$  复合体调控 TNF 诱导的  
细胞坏死机制的研究

The Study on G $\beta\gamma$  complex Regulates  
TNF Induced Cell Necrosis

李立胜

指导教师姓名: 韩家淮 教授

专业名称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2012 年 月

论文答辩时间: 2012 年 月

学位授予日期: 2012 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2012 年 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。)

声明人(签名):

年 月 日

## 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）：

年 月 日

## 中文摘要

早期的研究认为细胞坏死是不受信号通路调控的。然而近几年的研究发现细胞坏死和细胞凋亡一样同样存在着信号通路的转导。由受体相互作用蛋白 1 (RIP1) 和受体相互作用蛋白 3 (RIP3) 等蛋白组成的坏死复合体在细胞坏死信号中扮演着决定性角色。尽管最近的研究发现了一些影响坏死信号的蛋白,但坏死复合体如何形成及其如何影响下游底物并导致最终细胞坏死的机制依然不清楚。

本文通过逆转录病毒随机插入染色体破坏基因的方法在鼠成纤维细胞系 L929 中筛选对肿瘤坏死因子 (TNF) 抗性的突变株。通过鉴定发现其中一株突变株是由于逆转录病毒插入到鸟嘌呤核苷酸结合蛋白  $\gamma$  亚基 10 (GNG10) 的第一个外显子和第二个外显子中间,影响了该基因的正常转录,从而导致了 TNF 抗性的产生。敲低 GNG10 同样可以抑制 TNF 诱导的细胞坏死。根据以往的研究, GNG 家族成员往往是与鸟嘌呤核苷酸结合蛋白  $\beta$  亚基 (GNB) 家族成员形成异源二聚体来介导下游信号通路,因此我们检测了 GNB 家族成员是否参与 TNF 抗性的产生。我们发现敲低 GNB2 同样产生了对 TNF 的抗性,这暗示着  $G\beta_2\gamma_{10}$  复合体参与到了 TNF 信号通路。广谱性的  $G\beta\gamma$  复合物抑制剂同样可以抑制 TNF 诱导的细胞坏死。

通过寻找  $G\beta_2\gamma_{10}$  复合体下游的信号通路,我们发现敲低 GNG10 可以影响 src 激酶第 418 位的磷酸化。进一步的研究表明敲低 src 激酶或者使用 src 激酶的抑制剂可以抑制 TNF 诱导的细胞坏死。而当敲低 src 激酶的上游抑制激酶 CSK, src 激酶的活性上升,使细胞对 TNF 诱导的细胞坏死更加敏感。

本文发现了敲低  $G\beta_2\gamma_{10}$  复合体会影响 src 激酶的磷酸化从而产生了对 TNF 的抗性,指出 src 激酶及其激酶活性本身对 TNF 诱导的细胞坏死有很重要的影响,对 TNF 诱导的细胞坏死信号通路提出了新的看法和补充。

**关键词:**  $G\beta_2\gamma_{10}$  复合物; src 激酶; 细胞坏死

## Abstract

Previously researches showed that cell necrosis is not regulated by signaling pathways. Recently more and more evidences showed that necrosis, like apoptosis, is under control of some certain signaling pathways. Necrosis complex, principally consisted of receptor interaction protein 1(RIP1) and RIP3, plays a key role in necrosis pathway. Although many other new proteins had been found to regulate necrosis, how necrosis complex forms and leads to necrosis remain unknown.

In order to find new effectors that influence TNF induced necrosis, we made a screen by using a method of retrovirus random insertion mediated gene disruption in L929. We found a mutant cell line, in which retrovirus insertion site locates GNG10 first and second exon, showed resistant to TNF induced necrosis. Cells with GNG10 knockdown also resisted to TNF induced necrosis. As GNG family members always form heterodimer with GNB family members, we check whether GNB is involved in TNF induced cell death. We find that knockdown GNB or G $\beta\gamma$  complex inhibitor can inhibit TNF-induced necrosis, which indicates G $\beta\gamma$  complex plays a role in TNF signaling pathway.

In order to find how G $\beta\gamma$  complex regulated TNF induced necrosis, we tested several known substrates of G $\beta\gamma$  complex. We found that the phosphorylation of tyrosine kinase src was abolished in GNG10 knockdown cells. Knockdown src or using src family kinase inhibitors can block TNF induced necrosis. Furthermore knockdown CSK, a src kinase inhibitor, can enhance TNF toxicity.

Our experiments show that Knockdown G $\beta\gamma$  complex inhibit TNF induced necrosis through disrupting the activation of src kinase. Src kinase and its kinase activity are important for TNF induced necrosis.

**Keywords:** G  $\beta$   $\gamma$  complex; src kinase; TNF induced necrosis

目 录

|   |           |
|---|-----------|
| 中文摘要.....                                 | I         |
| Abstract.....                             | II        |
| <b>第一章 前言 .....</b>                       | <b>1</b>  |
| <b>1.1 细胞凋亡与细胞坏死.....</b>                 | <b>1</b>  |
| 1.1.1 细胞凋亡与细胞坏死的定义和特征 .....               | 1         |
| 1.1.2 细胞凋亡信号通路 .....                      | 2         |
| 1.1.3 细胞坏死信号通路 .....                      | 4         |
| 1.1.4 凋亡与坏死的联系 .....                      | 7         |
| <b>1.2 G 蛋白偶联受体.....</b>                  | <b>7</b>  |
| 1.2.1 G 蛋白偶联受体简介 .....                    | 7         |
| 1.2.2 G 蛋白 $\alpha$ 亚基介导的信号通路 .....       | 9         |
| 1.2.3 G 蛋白 $\beta \gamma$ 亚基介导的信号通路 ..... | 11        |
| <b>1.3 src 激酶家族.....</b>                  | <b>13</b> |
| 1.3.1 src 激酶家族简介 .....                    | 13        |
| 1.3.2 src 激酶家族成员的结构 .....                 | 14        |
| 1.3.3 src 激酶活性的调控 .....                   | 15        |
| 1.3.4 src 激酶家族成员参与的信号通路 .....             | 16        |
| <b>1.4 立题背景.....</b>                      | <b>17</b> |
| <b>第二章 材料和方法 .....</b>                    | <b>19</b> |
| <b>2.1 实验相关药品和试剂.....</b>                 | <b>19</b> |
| <b>2.2 实验室主要仪器.....</b>                   | <b>20</b> |
| <b>2.3 分子克隆相关实验和方法.....</b>               | <b>20</b> |
| 2.3.1 慢病毒真核表达载体介绍和使用 .....                | 20        |
| 2.3.2 目的基因的克隆 .....                       | 21        |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.3.3 慢病毒 shRNA 载体的使用和构建 .....                             | 23        |
| 2.3.4 大肠杆菌感受态细胞的制备及质粒提取 .....                              | 25        |
| 2.3.5 质粒 DNA 的酶切及 DNA 片段回收 .....                           | 25        |
| 2.3.6 DNA 片段的连接反应 .....                                    | 25        |
| <b>2.4 细胞相关实验和方法 .....</b>                                 | <b>26</b> |
| 2.4.1 细胞培养基及相关溶液配制 .....                                   | 26        |
| 2.4.2 细胞的培养和传代 .....                                       | 27        |
| 2.4.3 细胞药物刺激 .....   | 27        |
| 2.4.4 细胞转染 .....   | 27        |
| 2.4.5 慢病毒病毒包装及感染 .....                                     | 28        |
| 2.4.6 利用流式细胞仪测定细胞存活率及细胞内钙离子浓度 .....                        | 29        |
| 2.4.7 RNA 相关实验和方法 .....                                    | 31        |
| <b>2.5 蛋白质相关实验和方法 .....</b>                                | <b>34</b> |
| <b>第三章 结果与分析 .....</b>                                     | <b>35</b> |
| <b>3.1 GNG10 特异的参与 TNF 诱导的细胞坏死 .....</b>                   | <b>35</b> |
| 3.1.1 逆转录病毒随机插入破坏基因的方法 .....                               | 35        |
| 3.1.2 GNG10 突变株的鉴定 .....                                   | 36        |
| 3.1.3 敲低 GNG10 可以抑制 TNF 诱导的细胞坏死 .....                      | 37        |
| 3.1.4 GNG10 特异的参与 TNF 介导的细胞坏死 .....                        | 39        |
| <b>3.2 Gβγ 复合物参与 TNF 诱导的细胞坏死 .....</b>                     | <b>43</b> |
| 3.2.1 不同 GNB 家族成员在鼠成纤维细胞 L929 中的表达情况 .....                 | 43        |
| 3.2.2 敲低 GNB2 可以抑制 TNF 诱导的细胞坏死 .....                       | 45        |
| 3.2.3 Gβγ 复合物抑制剂可以抑制 TNF 诱导的细胞坏死 .....                     | 47        |
| <b>3.3 GNG10 与其他刺激所诱导的细胞死亡的关系 .....</b>                    | <b>48</b> |
| <b>3.4 敲低 GNG10 不影响 TNF 激活 NF-κB 信号通路和 MAPK 信号通路 .....</b> | <b>50</b> |
| <b>3.5 Gβγ 异源二聚体所介导的信号通路与坏死通路的关系 .....</b>                 | <b>51</b> |
| 3.5.1 PI3K 信号通路不参与 TNF 诱导的细胞坏死 .....                       | 51        |
| 3.5.2 敲低 GNG10 不影响 TNF 诱导的钙离子的上调 .....                     | 52        |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.5.3 敲低 GNG10 抑制 TNF 诱导的 src 激酶的激活 .....     | 53        |
| <b>3.6 src 激酶及其激酶活性参与 TNF 诱导的细胞坏死.....</b>    | <b>54</b> |
| 3.6.1 敲低 src 激酶可以抑制 TNF 诱导的细胞坏死.....          | 54        |
| 3.6.2 src 激酶家族的抑制剂可以抑制 TNF 诱导的细胞坏死.....       | 55        |
| 3.6.3 敲低 src 激酶的抑制激酶 CSK 使细胞对 TNF 毒性更敏感 ..... | 56        |
| <b>3.7 总结与讨论.....</b>                         | <b>59</b> |
| <b>附录 1 图表索引 .....</b>                        | <b>62</b> |
| <b>附录 2 缩略语及中英文对照 .....</b>                   | <b>64</b> |
| <b>参 考 文 献 .....</b>                          | <b>70</b> |



## Table of Contents

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Abstract in Chinese</b> .....  | <b>I</b>  |
| <b>Abstract in english</b> .....  | <b>II</b> |
| <b>Chapter 1 Introduction</b> .....   | <b>1</b>  |
| <b>1.1 Apoptosis and necrosis</b> .....                                     | <b>1</b>  |
| 1.1.1 The definition of apoptosis and necrosis .....                        | 1         |
| 1.1.2 Apoptosis signal pathway .....  | 2         |
| 1.1.3 Necrosis signal pathway .....   | 4         |
| 1.1.4 Relationship between apoptosis and necrosis.....                      | 7         |
| <b>1.2 G protein couple receptor (GPCR)</b> .....                           | <b>7</b>  |
| 1.2.1 Introduction of GPCR.....   | 7         |
| 1.2.2 Signal pathways mediated by G protein $\alpha$ subunit.....           | 9         |
| 1.2.3 Signal pathways mediated by G protein $\beta \gamma$ complex.....     | 11        |
| <b>1.3 Src kinase family</b> .....  | <b>13</b> |
| 1.3.1 Introduction of src kinase family .....                               | 13        |
| 1.3.2 Structure of src kinase family members.....                           | 14        |
| 1.3.3 Regulation of src kinase activity.....                                | 15        |
| 1.3.4 Signal pathway mediated by src kinase family members .....            | 16        |
| <b>1.4 Background of this thesis</b> .....                                  | <b>17</b> |
| <b>Chapter 2 materials and methods</b> .....                                | <b>19</b> |
| <b>2.1 Drugs and reagents</b> .....   | <b>19</b> |
| <b>2.2 Instruments</b> .....  | <b>20</b> |
| <b>2.3 Experiments and methods about molecular cloning</b> .....            | <b>20</b> |
| 2.3.1 Introduction about lentivirus based eukaryotic expression vector..... | 20        |
| 2.3.2 Subcloning .....  | 21        |
| 2.3.3 Introduction about lentivirus based shRNA expression vector.....      | 23        |
| 2.3.4 Preparation about competent cells and plasmids extraction .....       | 25        |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.3.5 Enzymatic treatments of DNA and recycle DNA fragment.....                                  | 25        |
| 2.3.6 Ligation for DNA fragments.....  | 25        |
| <b>2.4 Experiments and method about cell culture.....</b>  | <b>26</b> |
| 2.4.1 Preparation for cell culture mediate and related reagents.....                             | 26        |
| 2.4.2 Cell culture.....  | 27        |
| 2.4.3 Stimulis for cells.....  | 27        |
| 2.4.4 Cell transfection.....   | 27        |
| 2.4.5 Protocol for packing and infecting about lentivirus.....                                   | 28        |
| 2.4.6 methods about determining cell survival rate and cacium concertration.....                 | 29        |
| 2.4.7 Experiments about RNA.....   | 31        |
| <b>2.5 Experiments about protein.....</b>  | <b>34</b> |
| <b>Chapter 3 Result and analysis .....</b>   | <b>35</b> |
| <b>3.1 GNG10 is specially involved in TNF induced necrosis .....</b>                             | <b>35</b> |
| 3.1.1 Introduction about retrovirus based genes disruption.....                                  | 35        |
| 3.1.2 Identify a GNG10 mutant cell lines.....  | 36        |
| 3.1.3 Knockdown GNG10 inhibits TNF induced necrosis.....   | 37        |
| 3.1.4 GNG10 is specially involved in TNF induced necrosis.....                                   | 39        |
| <b>3.2 G<math>\beta\gamma</math> complex is involved in TNF induced necrosis.....</b>            | <b>43</b> |
| 3.2.1 The expression level of different GNB family members in L929.....                          | 43        |
| 3.2.2 Knockdown GNB2 inhibits TNF induced necrosis.....  | 45        |
| 3.2.3 Inhibitor of G $\beta\gamma$ complex inhibits TNF induced necrosis.....                    | 47        |
| <b>3.3 The role of GNG10 in different cell death stimuli.....</b>                                | <b>48</b> |
| <b>3.4 Knockdown GNG10 don't impact the activation of NF-kB or MAPK induced by TNF.....</b>      | <b>51</b> |
| <b>3.5 The downstream of G<math>\beta\gamma</math> complex and necrosis signal pathway .....</b> | <b>51</b> |
| 3.5.1 PI3K signal pathway don't involved TNF induced necrosis.....                               | 51        |
| 3.5.2 Knockdown GNG10 don't impact TNF induced calcium uptake.....                               | 52        |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.5.3 Knockdown GNG10 inhibit the activation of src kinase induced by TNF.....      | 53        |
| <b>3.6 Src kinase and its kinase activity are involved in TNF induced necrosis.</b> | <b>54</b> |
| 3.6.1 Knockdown src inhibit TNF induced necrosis.....                               | 54        |
| 3.6.2 Src kinase inhibitors inhibit TNF induced necrosis.....                       | 55        |
| 3.6.3 Knockdown CSK enhanced TNF toxicity .....                                     | 56        |
| <b>3.7 Conclusion and discussion.....</b>   | <b>59</b> |
| <b>Appendix 1 Index of figures and tables .....</b>                                 | <b>62</b> |
| <b>Appendix 2 Abbreviations.....</b>  | <b>64</b> |
| <b>Reference.....</b>   | <b>70</b> |

## 第一章 前言

### 1.1 细胞凋亡与细胞坏死

#### 1.1.1 细胞凋亡与细胞坏死的定义和特征

细胞凋亡是细胞在一定基因调控下，自发、主动的细胞死亡方式。在这个过程中细胞形态发生了比较典型的变化，比如细胞起泡，细胞膜皱缩，染色质紧缩，DNA 和细胞核片段化等。由于细胞在凋亡的过程中细胞内容物被包裹在细胞起泡产生的凋亡小体中，不会刺激免疫细胞，因此不会引发炎症反应。这些凋亡小体最终被吞噬细胞所吞噬。

早期的研究认为，细胞坏死是细胞急性死亡的一种，不受基因调控的，细胞被动的死亡方式。其主要是由于外界环境因素如物理化学条件剧烈变化或者细胞受病原体感染等原因引发的。细胞坏死在形态学上最主要的一个特征就是细胞膜无规则破损，细胞内容物释放。这些内容物被免疫细胞识别，刺激免疫细胞，导致机体局部发生炎症反应。

如表 1.1 所示，细胞凋亡和细胞坏死的主要区别包括以下几个部分：

表 1.1 细胞凋亡和细胞坏死的主要区别

Table 1.1 The major differences between apoptosis and necrosis

|                | 细胞凋亡           | 细胞坏死  |
|----------------|----------------|-------|
| 细胞膜            | 细胞膜外翻，但保持完整    | 细胞膜破裂 |
| 染色质            | 浓缩             | 絮状    |
| 细胞体积           | 变小             | 变大    |
| DNA            | 降解为 200bp 左右大小 | 随机降解  |
| 炎症反应           | 无              | 有     |
| 是否依赖 caspase 8 | 依赖             | 不依赖   |

然而随着研究的不断发现细胞坏死也存在着一定的信号通路<sup>[1]</sup>。

### 1.1.2 细胞凋亡信号通路

目前关于细胞凋亡信号通路的研究主要包括肿瘤细胞坏死因子（TNF）信号通路，Fas 信号通路，白细胞分化抗原 40 信号通路和 TNF 相关凋亡诱导配体信号通路。由于这些信号通路在下游信号传导中有共同的部分，本文将以目前研究最多的 TNF 信号通路为例介绍细胞凋亡的信号通路（如图 1.1 所示）。

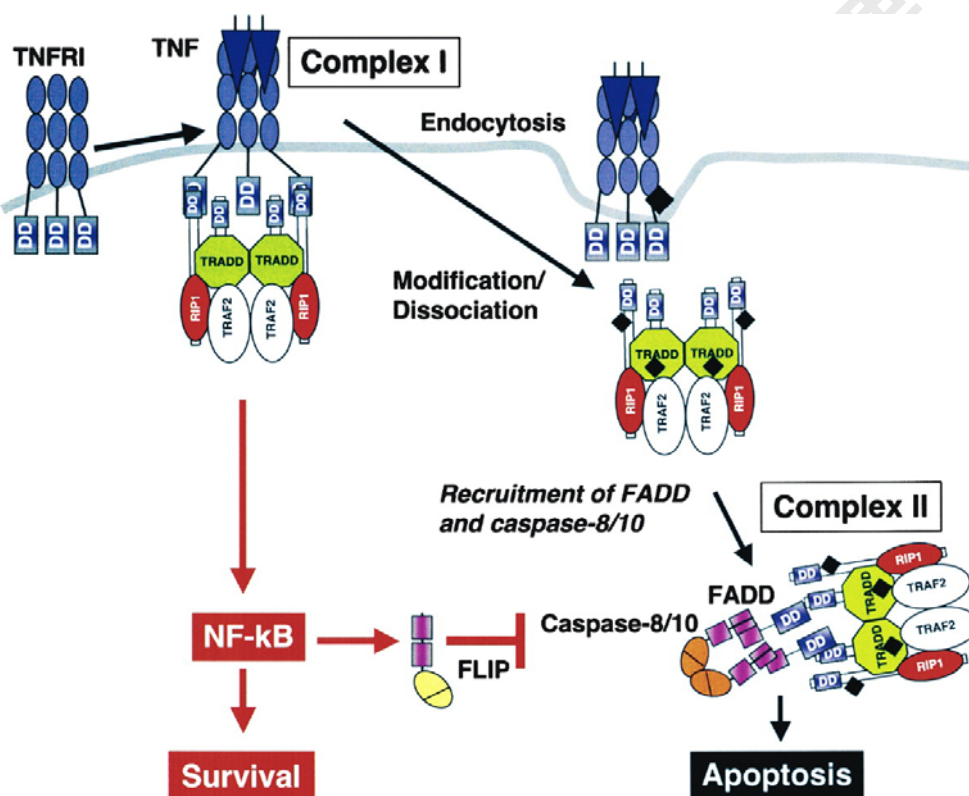


图 1.1 TNF 诱导的细胞存活信号与凋亡信号

Fig. 1.1 Cell survival signal and apoptosis signal induced by TNF

(by Olivier Micheau, 2003)

TNF- $\alpha$  是一种由被激活的免疫细胞分泌的多功能细胞因子<sup>[2]</sup>，在细胞炎症反应，调控细胞增殖，细胞分化和凋亡中发挥着重要作用<sup>[3, 4]</sup>。TNF 刺激细胞凋亡信号主要可分为三个方面：激活 NF-kB（complex 1），激活 c-jun 激酶 JNK，激活凋亡复合体（complex 2）。细胞存活还是凋亡主要取决于这几个信号特别是

complex 1 和 complex 2 共同作用的结果。

TNF- $\alpha$  的受体是肿瘤坏死因子受体 1 (TNFR1) 和肿瘤坏死因子受体 2 (TNFR2)。当三聚化的 TNF- $\alpha$  与 TNFR1 结合后, TNFR1 同样发生三聚化, 同时其死亡结构域 (death domain, DD) 募集同样含有死亡结构域的衔接蛋白肿瘤坏死因子受体 1 相关死亡结构域蛋白 (TRADD)<sup>[3]</sup>。TRADD 利用其死亡结构域进一步募集下游丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 RIP1<sup>[5]</sup>。同时 TRADD 进一步募集肿瘤坏死因子受体相关蛋白 2 (TRAF2)。而 TRAF2 作为一个平台募集了胞内抑制凋亡蛋白 (cIAP)。TRAF2 和 cIAP 作为泛素连接酶 E3, 对 RIP1 进行泛素化修饰<sup>[6, 7]</sup>。这种泛素化修饰主要集中在 RIP1 的第 377 位的赖氨酸上, 并使相邻泛素蛋白以第 63 位赖氨酸共价连接的方式形成长链泛素化修饰<sup>[8]</sup>。研究发现 RIP1 上的这种长链泛素化修饰为募集下游信号提供了平台。其中转化生长因子 $\beta$  活化激酶 (TAK) 与其结合蛋白 (TAB) 复合体中的 TAB2/TAB3 通过其泛素结合域与 RIP1 的泛素链相互作用, 从而激活 TAK, 参与激活 NF- $\kappa$ B 信号通路<sup>[9]</sup>。而 I $\kappa$ B 激酶 (IKK) 复合体中的 IKK  $\gamma$  通过其泛素集合域和 RIP1 的泛素链结合, 通过磷酸化 I $\kappa$ B, 使其脱离 NF- $\kappa$ B, 有利于 NF- $\kappa$ B 形成二聚体, 激活下游信号通路<sup>[10]</sup>。上述蛋白的复合体在 TNF 信号中被成为 complex 1<sup>[11]</sup>。在 NF- $\kappa$ B 激活表达的下游基因中, 胞内半胱天冬酶 8 (caspase8) 同源物 (cFLIP) 可以负调控 TNF 诱导的细胞凋亡<sup>[12]</sup>。研究发现, 在 I $\kappa$ B 突变的细胞株中, NF- $\kappa$ B 无法被激活, 从而导致了细胞凋亡<sup>[11]</sup>。因此在细胞凋亡的过程中, NF- $\kappa$ B 的激活或者 complex 1 的形成起着抑制的作用。

进一步的研究发现, JNK 在 TNF 介导细胞凋亡的信号中同样有着重要作用<sup>[13]</sup>。JNK 属于 MAPK 家族的成员。目前的研究认为, 在 TNF 刺激下, TRAF2 通过募集有丝分裂原激酶激酶激酶 (MAPKKK), 如胞外信号调控激酶激酶激酶 1 (MEKK1) 或凋亡信号调节激酶 1 (ASK1), 并最终激活包括 JNK 在内的 MAPK 家族成员<sup>[5, 14]</sup>。研究发现, 当 JNK 被激活时可以诱导 BH3 作用域死亡拮抗剂蛋白 (Bid) 的剪切<sup>[13]</sup>。这种剪切所产生的 Bid 片段能定位到线粒体上导致 Smac/DIABLO 的释放, 从而导致达到解除对 NF- $\kappa$ B 信号对 caspase 8 的抑制作用。相关的研究也指出, NF- $\kappa$ B 信号不仅仅通过抑制 caspase 8 来达到抑制凋亡的作

用, 其也对 JNK 的激活有一定的抑制作用<sup>[15, 16]</sup>。

细胞在 TNF 刺激下激活 caspase 8 是细胞凋亡的主要原因<sup>[17]</sup>。当 TNFR1 被激活时, TNFR1 通过其死亡域募集 fas 相关死亡域蛋白 (FADD), 并与 FADD 形成死亡诱导信号复合体 (DISC) <sup>[18]</sup>。在这个死亡诱导信号复合体中, FADD 通过其死亡效应域 (DED) 募集并激活 caspase 8, 使 caspase 8 自我剪切成有活性的 p18/p12 片段。活化后的 caspase 8 可以激活下游 caspase 家族成员如 caspase 3<sup>[19]</sup>。被激活的 caspase 3 通过剪切半胱天冬酶活化 DNA 酶抑制物 (ICAD), 使其脱离半胱天冬酶活化 DNA 酶 (CAD), 导致 CAD 的活化, 从而开始剪切 DNA, 并最终将染色体剪切成约 200bp 的 DNA 片段<sup>[20]</sup>。由于细胞存活信号和细胞凋亡信号同样是从 TNFR1 结合 TNF 开始, 那细胞是如何调控这两个信号的呢? 研究发现, 当 TNF 刺激细胞后, 细胞会形成两个复合体。第一个信号转导复合体即 complex 1 是由 TNFR1, TRADD, RIP, TRAF2 以及 cIAP 等组成的, 这个信号复合体介导了 NF- $\kappa$ B 的激活。这个信号复合体在 TNF 刺激下几分钟内即可形成。而第二个信号复合体即 complex 2 主要是由 RIP1, FADD 和 caspase 8 等蛋白组成。这个复合体一般是在 TNF 刺激下后期形成的<sup>[11]</sup>。

### 1.1.3 细胞坏死信号通路

早期的研究认为细胞坏死是不受信号通路调控的。然而随着研究的不断加深, 人们发现在凋亡信号被抑制的情况下, 细胞依然会发生死亡, 而且这种死亡似乎是存在信号通路的<sup>[21, 22]</sup>。早期的研究发现, 用 RIP1 的激酶抑制剂 Nec-1 可以抑制细胞坏死<sup>[23]</sup>。当用 caspase 抑制剂 Z-VAD 处理 L929 细胞时, 细胞会发生非依赖 caspase 8 的细胞死亡, 而这种死亡明显是依赖于胞内信号转导的, 因此为与细胞凋亡概念相区别, 研究人员把这种死亡称为程序性坏死 (necroptosis, 本文简称为坏死) <sup>[23]</sup>。研究人员利用小干扰 RNA (siRNA) 筛选参与 Z-VAD 诱导的 L929 细胞坏死的基因, 发现约有 400 多个基因参与了细胞坏死信号通路, 这也从另一个角度证明了细胞坏死是受信号通路调控的<sup>[24]</sup>。2009 年三个独立的课题组分别用不同的方法证明了受体相互作用蛋白 3 (RIP3) 在介导细胞坏死通路中起着决定性作用<sup>[25-27]</sup>。韩家淮实验室的研究表明 RIP3 通过调控三个代谢酶谷

氨酸氨连接酶 (GLUL), 谷氨酸脱氢酶 1 (GLUD1) 和糖原磷酸化酶 (PYGL) 的活性, 提高这些酶催化反应产生的活性氧 (ROS) 来促进细胞坏死, 而当用 ROS 清除剂 BHA 处理细胞后, 细胞能显著性的抑制 TNF 诱导的细胞坏死<sup>[26]</sup>。王晓东实验室通过 siRNA 筛选的方法发现 RIP3 在细胞坏死信号中扮演重要角色。在 L929, MEF, HT29 等可以发生坏死的细胞中均可检测到 RIP3 的表达, 而无法发生坏死的细胞如 239T, HeLa 等均检测不到, 这说明坏死和 RIP3 的表达与否有很大的相关性。同时他们指出在细胞坏死的信号转导过程中, FADD、caspase 8、RIP1 以及 RIP3 等蛋白形成坏死复合体 (complex 2b)<sup>[27]</sup>。Chan 实验室同样利用 siRNA 来筛选参与细胞坏死信号的激酶, 发现了 RIP3 的重要性。在这个坏死复合体中 RIP1 和 RIP3 的激酶活性以及他们 RIP 相互作用模体 (RHIM) 是坏死信号传导所必须的<sup>[25]</sup>。最新的研究表明 RIP3 通过调控下游底物混合系列蛋白激酶样结构域蛋白 (MLKL) 以及线粒体磷酸变位酶家族成员 5 (PGAM5) 来调控细胞坏死<sup>[28, 29]</sup>。当细胞受到 TNF 刺激时 MLKL 的第 357 位的苏氨酸和第 358 位的丝氨酸会被 RIP3 所磷酸化。当这两个点被磷酸化后 RIP1, RIP3 和 MLKL 会形成稳定的坏死复合体。因此这个坏死复合体是依赖于 RIP3 的激酶活性的。然而对于 MLKL 是否具有激酶活性还是存在一定的争议性<sup>[28, 30]</sup>。有研究表明 MLKL 可以磷酸化髓鞘碱性蛋白 (Myelin basic protein, MBP), 而有研究表明 MLKL 的激酶区域不是完整的, 因此没有激酶活性。紧接着研究人员又发现了一个新的下游底物 PGAM5。研究发现当坏死信号被激活时 RIP3 和 MLKL 会募集 PGAM5 并激活它。而活化的 PGAM5 能与动力蛋白相关蛋白 1 (dynamin related protein 1, Drp1) 发生相互作用, 并将 Drp1 第 637 位丝氨酸的磷酸化去除从而激活 Drp1。活化的 Drp1 能够促进线粒体的片段化, 而这也是细胞进行坏死时的早期表现, 也是细胞坏死的重要原因。

然而细胞在 TNF 刺激下, complex 2b 是如何形成的以及 MLKL 和 PGAM5 如何进一步介导细胞坏死这些重要的问题依然有待解决。

除了 RIP1 和 RIP3 等组成的 complex 2b 在 TNF 诱导的细胞坏死中起决定性作用外, 其它影响细胞坏死的关键因子也不断被发现。类 B 细胞白血病/淋巴瘤 2 蛋白 1 (BCL2L1) 很可能通过抑制 ROS 所带来的损伤来抑制 TNF 诱导的细胞



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.

廈門大學博碩士論文摘要庫