

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_密级

学号: 24520131153448

UDC\_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

苦参碱诱导人胆管癌细胞死亡的  
分子机制研究

Molecular mechanisms of cell death induced by matrine  
in human cholangiocarcinoma Cells

徐 贝 贝

指导教师姓名: 胡天惠 教授

专 业 名 称: 微 生 物 学

论文提交日期: 2016 年 月

论文答辩时间: 2016 年 月

学位授予日期: 2016 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2016 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( 胡天惠 )  
课题(组)的研究成果,获得( 胡天惠 )课题(组)  
经费或实验室的资助,在( 胡天惠 )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): 徐贝贝

2016 年 5 月 20 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 2018 年 7 月 1 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）：徐贝贝

2016 年 5 月 20 日

## 摘要

胆管癌是起源于胆管上皮的一种恶性肿瘤,在我国发病率和死亡率逐年上升。而胆管癌细胞抵抗凋亡是导致胆管癌化疗失败的重要原因,所以研发能够诱导胆管癌细胞以不发生凋亡的死亡新途径的化疗药显得十分重要。苦参碱具有多途径、多种机制的抗肿瘤活性,已经证实能够诱导多种肿瘤细胞死亡,但是在胆管癌中的生物学作用和潜在机制却鲜有报道。程序性坏死(necroptosis)是可被调控的程序性细胞死亡,在形态学上具有典型的坏死样形态改变,依赖于受体相互作用蛋白 1 和 3,此外,可被程序性坏死的特异性抑制剂 Nec-1 所阻断。近年来发现诱导细胞程序性坏死在治疗肿瘤耐药方面具有巨大潜能。

本实验主要对苦参碱诱导胆管癌 QBC939 和 Mz-ChA-1 细胞的死亡方式进行研究,并阐明其潜在的作用机制,为胆管癌提供新的治疗思路。我们研究结果显示:苦参碱在体外可诱导胆管癌细胞呈浓度依赖性死亡;DAPI 染色未观察到苦参碱处理后的胆管癌细胞有凋亡样的细胞核形态变化;透射电镜观察经苦参碱处理过的胆管癌细胞呈现出典型的细胞坏死形态,包括细胞肿胀、线粒体内脊消失呈空泡化、细胞内出现大量空泡、细胞膜完整性被破坏,但细胞核完整等现象;流式细胞仪检测结果发现苦参碱诱导的细胞死亡能够被程序性坏死特异性抑制剂 Nec-1 抑制,而不能被泛 caspase 抑制剂 z-VAD-fmk 抑制;通过 RNA 干扰沉默程序性坏死关键蛋白 RIP3 蛋白的表达,发现敲低 RIP3 能够逆转苦参碱诱导的胆管癌细胞死亡方式由程序性坏死转向凋亡;蛋白免疫印迹结果显示苦参碱能够上调 RIP3 的蛋白表达水平;免疫荧光结果显示苦参碱诱导 RIP3 下游底物蛋白 MLKL 发生膜转位, Nec-1 可以抑制 MLKL 的转膜现象,流式细胞仪检测结果发现 MLKL 特异性抑制剂 NSA 能够明显抑制苦参碱诱导的细胞死亡;DCFH-DA 探针处理发现苦参碱处理后的细胞内 ROS 浓度明显升高, Nec-1 和 NSA 能够不同程度的抑制苦参碱诱导的 ROS 的释放, ROS 的清除剂 NAC 可以明显抑制苦参碱诱导的细胞死亡。另外,我们还发现苦参碱能够选择性的诱导其他肿瘤细胞发生依赖于 RIP3 的程序性坏死以及坏死诱导剂 TSZ 诱导剂不能诱导 Mz-ChA-1 细胞发生程序性坏死。

综上所述，本实验首次发现苦参碱可以诱导胆管癌细胞发生依赖于 RIP3 蛋白的程序性坏死，证实苦参碱通过诱导 RIP3 表达升高介导程序性坏死，其下游信号依赖于 MLKL 的膜转位以及 ROS 的大量积聚，并且相比于经典程序性坏死诱导剂 TSZ，具有更广泛，更灵敏的诱导肿瘤细胞程序性坏死的能力。我们的研究第一次证明了苦参碱是一类新型的程序性坏死天然诱导剂，在肿瘤耐药方面具有重大的临床利用价值。

**关键字:**苦参碱；胆管癌；程序性坏死；RIP3；Nec-1；MLKL；ROS

## Abstract

Cholangiocarcinoma is a malignant tumor originated from biliary epithelial cells. The morbidity and mortality in China is increasing year by year. Resistance to apoptosis remains one of the most challenges in chemotherapy of cholangiocarcinoma. Searching for new agent inducing non-apoptotic cell death could be useful to treat cholangiocarcinoma. Matrine has multiple pathways and multiple mechanisms of antitumor effect. It has been reported that matrine can induce apoptosis in a variety of tumor cells. However, the biological roles and underlying mechanism of matrine in cholangiocarcinoma is largely unknown. Necroptosis is a programmed cell death regulated by genes action. It has typical morphological features of necrosis cells and indepent receptor interacting protein 1 and 3. In addition, it can be blocked by specific inhibitors Nec-1. In recent years, researches have found matrine induces tumor cells necroptosis and has great value to resist apoptosis resistance.

The aim of the present study is to explor the antitumor activity of matrine and its molecular mechanism in cholangiocarcinoma cells, providing new perspectives for cholangiocarcinoma therapy. Our study showed that matrine can induce QBC939 and Mz-ChA-1 cells death in a dose dependent manner. DAPI staining can't detect the morphological changes of apoptotic cell's nucleus. The necrosis phenotype of QBC939 and Mz-ChA-1 cells were observed by transmission electron microscopy, in which matrine treated cells presented swollen organelle, cellular structure vacuolation, losing of plasma membrane integrity and intact nuclear. The specific necroptosis inhibitor necrotatin-1(Nec-1), but not classical apoptosis inhibitor z-VAD-fmk, can inhibit matrine induced cell death in QBC939 and Mz-ChA-1 cells. We used RNA interference to knock down QBC939 and Mz-ChA-1 cells' endogenous RIP3 protein expression, and found that down regulation of RIP3 can switch matrine induced cell death from necroptosis to apoptotis. The western blot indicated that matrine can up-regulate RIP3 expression level. And the immuno fluorescence results showed that the MLKL location can be effected by matrine, Nec-1 can inhibit this phenomenon.

The specific MLKL inhibitor NSA, can inhibit matrine induced cell death in QBC939 and Mz-ChA-1 cells. We used DCFH-DA probe to treat cells and found that matrine induced cell death accompanied ROS accumulation, necroptosis inhibitor Nec-1 and NSA can inhibit matrine induced ROS release and anti-oxidant NAC can inhibit matrine induced cell death. Moreover, we found matrine also can induce RIP3 dependent necroptosis in other tumor cells and necroptosis inductor TSZ can't induce Mz-ChA-1 cells necroptosis.

Thus, for the first time, our research found matrine can induce RIP3 dependent necroptosis in cholangiocarcinoma cells and demonstrated that this process mainly regulated by increased RIP3 expression and it downstream signaling dependent MLKL membrane translocation and ROS accumulation. We also found that matrine has more broad and sensitive ability to induce tumor cells necroptosis compared to TSZ. This is the first report indicated that matrine is a new natural necroptosis inductor, which may play an important role in clinical tumor drug resistance.

**Key words:** Matrine; cholangiocarcinoma; necroptosis; RIP3; Nec-1; MLKL; ROS

目录

|                              |           |
|------------------------------|-----------|
| 摘要.....                      | 1         |
| ABSTRACT .....               | 1         |
| <b>第一章 前言 .....</b>          | <b>1</b>  |
| <b>1.1 胆管癌的研究概况 .....</b>    | <b>1</b>  |
| <b>1.2 程序性细胞死亡 .....</b>     | <b>1</b>  |
| 1.2.1 细胞凋亡 .....             | 2         |
| 1.2.2 程序性坏死 .....            | 2         |
| 1.2.2.1 RIP1 .....           | 3         |
| 1.2.2.2 RIP3 .....           | 4         |
| 1.2.2.3 程序性坏死的信号通路 .....     | 4         |
| 1.2.2.4 程序性坏死的生理病理意义 .....   | 6         |
| 1.2.2.5 程序性坏死与肿瘤细胞耐药 .....   | 7         |
| 1.2.3 细胞凋亡与程序性坏死的关系 .....    | 8         |
| <b>1.3. 苦参碱抗肿瘤作用机制 .....</b> | <b>9</b>  |
| 1.3.1 抑制肿瘤细胞增殖 .....         | 9         |
| 1.3.2 促进肿瘤细胞凋亡 .....         | 9         |
| 1.3.3 诱导肿瘤细胞自噬 .....         | 10        |
| 1.3.4 抗肿瘤侵袭转移 .....          | 10        |
| 1.3.5 联合用药 .....             | 11        |
| <b>第二章 材料和方法 .....</b>       | <b>13</b> |
| <b>2.1 实验材料 .....</b>        | <b>13</b> |
| 2.1.1 细胞株 .....              | 13        |
| 2.1.2 抗体及试剂 .....            | 13        |
| 2.1.3 实验仪器 .....             | 14        |
| <b>2.2 实验方法 .....</b>        | <b>15</b> |
| 2.2.1 细胞实验 .....             | 15        |
| 2.2.1.1 细胞复苏, 培养及冻存 .....    | 15        |



|   |           |
|---|-----------|
| 2.2.1.2 细胞药物处理.....                                   | 16        |
| 2.2.1.3 细胞转染.....                                     | 16        |
| 2.2.1.4 MTT 法检测细胞存活率.....                             | 17        |
| 2.2.1.5 流式细胞仪法检测细胞死亡率.....                            | 17        |
| 2.2.1.6 流式细胞仪检测 ROS.....                              | 18        |
| 2.2.2 细胞形态学观察.....                                    | 18        |
| 2.2.2.1 DAPI 染色观察细胞核.....                             | 18        |
| 2.2.2.2 电镜观察细胞形态.....                                 | 18        |
| 2.2.3 mRNA 的提取与 RT-PCR.....                           | 19        |
| 2.2.3.1 细胞总 RNA 提取（以六孔板为例）.....                       | 19        |
| 2.2.3.2 逆转录合成 cDNA.....                               | 19        |
| 2.2.3.3 Real-time PCR.....                            | 19        |
| 2.2.4 蛋白免疫印迹实验.....                                   | 20        |
| 2.2.4.1 总蛋白的提取（以 6cm 皿为例）.....                        | 20        |
| 2.2.4.2 Western Blot.....                             | 20        |
| 2.2.5 统计学分析.....                                      | 22        |
| <b>第三章 实验结果.....</b>                                  | <b>23</b> |
| <b>3.1 苦参碱诱导胆管癌细胞以非凋亡的细胞死亡方式死亡.....</b>               | <b>23</b> |
| 3.1.1 苦参碱诱导胆管癌细胞死亡.....                               | 23        |
| 3.1.2 DAPI 染色检测苦参碱诱导胆管癌细胞死亡方式.....                    | 24        |
| 3.1.3 透射电镜显示苦参碱处理后细胞有坏死样的细胞形态.....                    | 25        |
| <b>3.2 苦参碱诱导胆管癌细胞细胞死亡方式是程序性坏死.....</b>                | <b>26</b> |
| 3.2.1 Nec-1 能够抑制苦参碱诱导的胆管癌细胞死亡.....                    | 26        |
| 3.2.2 Nec-1 能够抑制苦参碱诱导的胆管癌细胞形态学变化.....                 | 27        |
| <b>3.3 苦参碱诱导胆管癌细胞程序性坏死依赖 RIP3.....</b>                | <b>28</b> |
| 3.3.1 检测胆管癌细胞中 RIP3 表达.....                           | 28        |
| 3.3.2 苦参碱诱导高表达 RIP3 的 HT-29 细胞死亡方式为程序性坏死.....         | 29        |
| 3.3.3 苦参碱诱导不表达 RIP3 的 HeLa 细胞以及 MCF-7 细胞的死亡方式为凋亡..... | 30        |
| 3.3.4 敲低 RIP3 后, 苦参碱不能诱导胆管癌细胞程序性坏死.....               | 32        |
| 3.3.5 敲低 RIP3 后, 苦参碱不能诱导 HT-29 细胞程序性坏死.....           | 34        |
| 3.3.6 过表达 RIP3 部分逆转苦参碱诱导 HeLa 细胞和 MCF-7 细胞的死亡方式       |           |

|   |           |
|---|-----------|
| .....   | 35        |
| <b>3.4 苦参碱诱导胆管癌细胞程序性坏死的作用机制 .....</b>         | <b>37</b> |
| 3.4.1 苦参碱上调胆管癌细胞 RIP3 的表达 .....               | 37        |
| 3.4.2 苦参碱诱导 MLKL 蛋白从细胞质转移到细胞膜 .....           | 38        |
| 3.4.3 NSA 抑制苦参碱诱导胆管癌细胞死亡.....                 | 40        |
| 3.4.4 苦参碱诱导胆管癌细胞 ROS 的产生.....                 | 41        |
| 3.4.5 Nec-1 和 NSA 抑制苦参碱诱导 ROS 的产生 .....       | 42        |
| 3.4.6 ROS 参与苦参碱诱导的胆管癌细胞程序性死亡过程 .....          | 43        |
| <b>3.5 经典坏死诱导剂 TSZ 选择性诱导胆管癌细胞程序性坏死 .....</b>  | <b>44</b> |
| 3.5.1 胆管癌 Mz-ChA-1 细胞对 TSZ 诱导的程序性坏死不敏感 .....  | 44        |
| 3.5.2 TSZ 不能诱导胆管癌 Mz-ChA-1 细胞 RIP3 的表达增高..... | 46        |
| 3.5.3 过表达 RIP3 逆转 Mz-ChA-1 细胞对 TSZ 的敏感性 ..... | 47        |
| <b>第四章 讨论 .....</b>                           | <b>49</b> |
| <b>第五章 结论 .....</b>                           | <b>55</b> |
| <b>参考文献 .....</b>                             | <b>56</b> |
| <b>致 谢 .....</b>                              | <b>62</b> |

## Contents

|  |           |
|--|-----------|
| <b>ABSTRACT IN CHINESE.....</b>                                      | <b>I</b>  |
| <b>ABSTRACT IN ENGLISH .....</b>                                     | <b>I</b>  |
| <b>CHAPTER 1 Introduction.....</b>                                   | <b>1</b>  |
| <b>1.1The research situation of cholangiocarcinoma .....</b>         | <b>1</b>  |
| <b>1.2 Programmed cell death .....</b>                               | <b>1</b>  |
| 1.2.1 Apoptosis .....  | 2         |
| 1.2.2 Necroptosis.....   | 2         |
| 1.2.2.1 RIP1 .....   | 3         |
| 1.2.2.2 RIP3 .....   | 4         |
| 1.2.2.3 Necroptosis signaling pathways.....                          | 4         |
| 1.2.2.4 Significance of necroptosis in physiology and pathology..... | 6         |
| 1.2.2.5 Necroptosis and drug-resistant tumor cells .....             | 7         |
| 1.2.3 Relationship between apoptosis and necroptosis .....           | 8         |
| <b>1.3. Matrine antitumor mechanism.....</b>                         | <b>9</b>  |
| 1.3.1 Inhibiting tumor cell proliferation .....                      | 9         |
| 1.3.2 Promote apoptosis of tumor cells.....                          | 9         |
| 1.3.3 Induced autophagy .....  | 10        |
| 1.3.4 Auppress tumor invasion and metastasis.....                    | 10        |
| 1.3.5 Drug combination .....   | 11        |
| <b>CHAPTER 2 Materials AND Methods .....</b>                         | <b>13</b> |
| <b>2.1 Materials.....</b>  | <b>13</b> |
| 2.1.1 Cell line .....  | 13        |
| 2.1.2 Antibodies and reagents.....                                   | 13        |
| 2.1.3 Experimental apparatus .....                                   | 14        |
| <b>2.2 Methods .....</b>   | <b>15</b> |
| 2.2.1 Cell experiment .....  | 15        |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.2.1.1 Cell recovery, cultivate and cryopreserved .....  | 15        |
| 2.2.1.2 Cells to drug treatment.....  | 16        |
| 2.2.1.3 Cell transfection .....   | 16        |
| 2.2.1.4 Detected cell survival by MTT method.....   | 17        |
| 2.2.1.5 Flow cytometry instrument method to detect cell mortality .....                         | 17        |
| 2.2.1.6 Flow cytometry instrument detection of ROS .....  | 18        |
| 2.2.2 The observation of cell morphology .....  | 18        |
| 2.2.2.1 DAPI staining to observe the cell nucleus.....  | 18        |
| 2.2.2.2 Electron microscope observed cell morphology .....                                      | 18        |
| 2.2.3 mRNA extraction and RT-PCR .....  | 19        |
| 2.2.3.1 Total RNA extraction (six orifice plate, for example) .....                             | 19        |
| 2.2.3.2 Reverse transcribed to synthesize cDNA .....  | 19        |
| 2.2.3.3 Real-time PCR .....   | 19        |
| 2.2.4 Protein immunoblot experiment .....   | 20        |
| 2.2.4.1 The extraction of total protein (6 cm dish, for example).....                           | 20        |
| 2.2.4.2 Western Blot .....  | 20        |
| 2.2.5 Statistical analysis.....   | 22        |
| <b>CHAPTER 3 Results.....</b>   | <b>23</b> |
| <b>3.1 Matrine induce cholangiocarcinoma cells death in no-apoptotic death way .....</b>        | <b>23</b> |
| 3.1.1 Matrine inhibition of cholangiocarcinoma cell proliferation in vitro .....                | 23        |
| 3.1.2 DAPI staining detection matrine induced cholangiocarcinoma cell death ..                  | 24        |
| 3.1.3 The morphology of cholangiocarcinoma cells after treated with matrine....                 | 25        |
| <b>3.2 Matrine induced cholangiocarcinoma cells necroptosis .....</b>                           | <b>26</b> |
| 3.2.1 Nec-1 can inhibit matrine induced cholangiocarcinoma cell death.....                      | 26        |
| 3.2.2 Nec - 1 can inhibit the cells morphological changes induced by matrine ....               | 27        |
| <b>3.3 Matrine induced RIP3 dependent necroptosis .....</b>                                     | <b>28</b> |
| 3.3.1 Detection of RIP3 expression in the cholangiocarcinoma cell .....                         | 28        |
| 3.3.2 Matrine induced necroptosis of HT-29 cells expressed high level of RIP3 .                 | 29        |
| 3.3.3 Matrine induced apoptosis of HeLa and MCF-7 cells.....                                    | 30        |
| 3.3.4 Matrine cannot induce cholangiocarcinoma cells necroptosis after knocking down RIP3 ..... | 32        |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.3.5 Matrine cannot induce HT - 29 necroptosis after knocking down RIP3 .....                         | 34        |
| 3.3.6 Overexpression of RIP3 cannot completely reverse matrine induced HeLa and MCF-7 death type ..... | 35        |
| <b>3.4 Mechanism of matrine induced cholangiocarcinoma necroptosis .....</b>                           | <b>37</b> |
| 3.4.1 Matrine increase RIP3 expression in cholangiocarcinoma cells.....                                | 37        |
| 3.4.2 Matrine induce MLKL protein transferring from the cytoplasm to the cell membrane .....           | 38        |
| 3.4.3 NSA suppress matrine induced cholangiocarcinoma cell death .....                                 | 40        |
| 3.4.4 Matrine induce ROS production in cholangiocarcinoma cells .....                                  | 41        |
| 3.4.5 Nec-1 and NSA suppress matrine induced ROS production .....                                      | 42        |
| 3.4.6 ROS involved in matrine induced cell death.....  | 43        |
| <b>3.5 Classic necrosis revulsant TSZ selectively induce cholangiocarcinoma cells necroptosis.....</b> | <b>44</b> |
| 3.5.1 Mz - Cha - 1 cell is not sensitive to necroptosis induced by TSZ .....                           | 44        |
| 3.5.2 TSZ cannot induce increased expression of RIP3 in Mz - ChA - 1 cells .....                       | 46        |
| 3.5.3 Overexpression of RIP3 reverse Mz - Cha - 1 cell sensitivity to TSZ .....                        | 47        |
| <b>Chapter 4 Discussion .....</b>  | <b>49</b> |
| <b>Chapter 5 Conclusions .....</b>   | <b>55</b> |
| <b>References .....</b>  | <b>56</b> |
| <b>Acknowledgements .....</b>  | <b>62</b> |

# 第一章 前言

## 1.1 胆管癌的研究概况

胆管癌(cholangiocarcinoma,CCA)主要是指源于肝管和肝外胆管细胞的恶性肿瘤。肝脏原发性肿瘤中,胆管癌的发病率在全球范围内位居第二位。胆管癌可根据肿瘤细胞的起源的部位分为肝内胆管癌、肝门部胆管癌与肝外胆管癌,三者在临床,病理方面均有差异<sup>[1]</sup>。在全球范围内胆管癌的发生和死亡率各地差异较大,亚洲人的发生率是白人和黑人的2倍,而中国是胆管癌的高发区,发病率每年都在增加,因而在我国研究胆管癌具有重要意义<sup>[2]</sup>。

胆管癌通常发病比较隐密,发病原因不明,早期诊断困难,临床表现不典型,易被误诊为胃病或传染性肝炎等,导致患者被确诊时已是胆管癌中晚期,临床治疗有段有限,患者死亡率高。因此胆管癌又被称为"隐形杀手"<sup>[3]</sup>。外科手术是当前治愈胆管癌的最有效的办法,但是只有不到百分之十的患者幸运的在发病早期的得到确诊,可以接受手术切除治疗,由于胆管癌容易沿神经浸润转移,造成了手术治疗的困难以及容易引起术后复发,患者手术后五年生存率不到百分之五,治疗的效果不尽人意<sup>[4]</sup>。对于不能接受手术治疗的胆管癌患者来说,化学药物治疗与放疗配合使用是唯一的治疗方法。临床治疗结果显示,胆管癌对普通的化疗有非常显著的抵抗力。5-氟尿嘧啶单独使用或与顺铂、甲氨喋呤、亚叶酸等联合使用是目前临床上比较常见的化疗治疗手段,但疗效不佳<sup>[5]</sup>。细胞学显示胆管癌细胞对大部分的化疗药物不敏感,抵抗凋亡是导致胆管癌细胞耐药的主要原因<sup>[6]</sup>。所以研发能够诱导胆管癌以非凋亡形式的细胞死亡的新药显得十分重要。

## 1.2 程序性细胞死亡

程序性死亡(programmed cell death, PCD)是机体生长发育过程中的一项关键细胞机制,在多细胞生物体的生长发育和维持机体内环境稳态方面起着至关重要的作用,广泛参与机体的生理及病理过程<sup>[7]</sup>。细胞死亡系统命名委员会(The Nomenclature Committee on Cell Death, NCCD)根据细胞死亡的形态学表现,酶学

功能以及免疫学特征等方面在 2012 年将细胞死亡分为细胞调亡(apoptosis)、自噬性细胞死亡(Autophagic cell death)、程序性细胞坏死(necroptosis)<sup>[8]</sup>。

### 1.2.1 细胞调亡

细胞调亡(apoptosis)是一种由基因控制的细胞自主性的细胞死亡方式,在生物体的生长发育、机体内微环境的稳定、细胞更新等方面起着重要的作用<sup>[9]</sup>。细胞调亡具有典型的形态学特征,在调亡的起始阶段细胞皱缩、细胞之间的连接消失、核糖体、线粒体发生集聚、内质网疏松、染色质固缩形成新月形结构等特征,接着细胞核染色质开始断裂、与细胞内的线粒体、内质网等发生聚集,被细胞膜包被形成调亡小体(apoptotic body),最后被邻近的巨噬细胞吞噬消化。在细胞调亡的发生过程中,溶酶体和细胞膜始终是完整的,避免细胞内容物的外泄,故不引起周围组织的免疫炎症反应<sup>[10]</sup>。

细胞调亡是维持正常胚胎发生以及人类发育老化过程中不可缺少的组成部分,人体内许多疾病的发生与细胞调亡的调控紊乱有关。细胞调亡主要有 2 条信号传导通路:细胞外源通路即死亡受体通路,细胞内源通路,又分为线粒体通路和内质网通路。调亡外源通路主要是死亡受体如 Fas, TNF- $\alpha$  在细胞一些胞外的死亡信号刺激后与其相应的配体在细胞膜表面发生结合并形成的复合物,随后与 FADD 结合激活 Caspase8 前体引发调亡;在线粒体途径中,线粒体被一些来源于细胞内的信号激活,如野生型的 P53, 原癌基因 c-myc; 调亡相关蛋白的表达异常;细胞内活性氧水平的变化等,线粒体受损释放出细胞色素 C, Smac 等关键分子引发类似受体途径的 Caspase 级联反应<sup>[11]</sup>。内质网途径是以钙离子作为第二信使来调控细胞调亡,钙离子一般储存在内质网中,细胞是对钙离子不通透的。但是当钙离子依赖蛋白被激活或内质网蛋白的大量积累时,内质网中的钙离子水平失恒,激活 caspase,最终细胞发生调亡<sup>[12]</sup>。各个信号通路在细胞调亡过程中并不完全是独立发挥作用的,而是相互紧密联系呈现复杂的网状调控系统。

### 1.2.2 程序性坏死

细胞坏死曾被普遍认为是一种细胞在外界强烈的物理化学条件下的被动的死亡方式,与细胞调亡不同,细胞死亡时细胞膜破裂,细胞内容物大量外泄并引发炎症。1988 年研究报道在用肿瘤坏死因子 TNF $\alpha$  的诱导不同类型的细胞时,细胞形态除了呈现出经典的调亡变化外,还出现一种类似细胞坏死形式的细胞膨胀

但胞核完整的形态<sup>[13]</sup>。随着研究的深入,越来越多的证据表明有一部分的细胞坏死的发生同样是主动的、程序性的、受基因调控的细胞死亡,经过科学家的不断努力,这类死亡方式在 2005 年正式被命名为程序性坏死(Necroptosis),使得程序性坏死(programmed necrosis)这一概念逐步被人们接受<sup>[14]</sup>。随后该领域越来越受到人们的关注,成为活跃的学术研究前沿。经过大量课题组研究,细胞程序性坏死的基本特征得到初步明确:在形态学方面细胞程序性坏死典型的细胞坏死的形态表现,包括细胞器肿胀、细胞体积变大、细胞质空泡化、细胞膜透明化并丧失完整性,但细胞核完整并未发生裂解; Necroptosis 有自己独特的介导通路,受体相互作用蛋白激酶 1(RIP1)和受体相互作用蛋白激酶 3(RIP3)参与调控此过程,并能够被小分子抑制剂 Necrostatin-1(Nec-1)或 Necrosulfonamide(NSA)特异性阻断;部分发生程序性坏死的细胞死亡过程中伴随着旺盛的能量代谢,产生大量的活性氧(reactive oxygen species);在一些细胞程序性坏死下游过程中伴随有自噬现象<sup>[15-17]</sup>。

### 1.2.2.1 RIP1

受体相互作用蛋白激酶 1(receptor interaction protein kinase 1,RIP1)是丝/苏氨酸激酶家族蛋白成员,是细胞应激反应发生时重要的感受器。RIP1 包含三个结构域,各自具有不同的功能:羧基端为死亡结构域,主要与 Fas, TNFR1 等死亡受体结合诱导细胞凋亡;中间区域参与调控 NF- $\kappa$ B 信号途径促使细胞存活,可通过其中包含的同型作用结构域(RIP homotypic interaction motif,RHIM)与 RIP3 相互结合诱导细胞程序性坏死;氨基端是特异的丝氨酸/苏氨酸激酶结构域,是介导程序性坏死的关键结构域<sup>[18,19]</sup>。RIP1 最初被发现在激活 NF- $\kappa$ B 信号通路中有重要作用而被广泛研究,在此过程中 RIP1 赖氨酸 63 发生泛素化作用是关键。当 RIP1 去泛素化时 NF- $\kappa$ B 通路被阻断,细胞选择走向凋亡或程序性坏死,所以 RIP1 的泛素化状态决定细胞是存活还是死亡<sup>[20]</sup>。敲除 RIP1 基因的小鼠会在出生后的 3 天内死亡,在小鼠的淋巴细胞和脂肪组织中检测到了大量凋亡细胞<sup>[21]</sup>,表明 RIP1 也参与了细胞凋亡调控。后续研究发现 RIP1 在程序性坏死发生过程中也起着重要的调控作用,主要依赖于其 N 末端的丝氨酸/苏氨酸激酶活性。RIP1 的激酶活性对于诱导程序性坏死也是必须的,小分子抑制剂 Nec-1 就是通过靶向作用于 RIP1 抑制激酶活性来特异性的阻断坏死的。如 Nec-1 能够抑制 Fas 诱导



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts 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.