

学校编码: 10384
学号: 24520131153465

分类号____ 密级____
UDC____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

小鼠急性肝衰竭模型的构建与机制

The establishment and mechanism research in the mice
model of acute liver failure

金丽鑫

指导教师名称: 潘金水 副教授
专业名称: 内科学(消化系病方向)
论文提交日期: 2016年04月
论文答辩日期: 2016年05月
学位授予日期: 2016年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2016年5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

摘要

背景和目的: 急性肝衰竭 (acute liver failure, ALF) 是一个危及生命的严重病理生理状态。它可导致肝脏合成、排泄、解毒、生物转化等功能发生严重障碍或失代偿, 出现凝血功能障碍、黄疸以及肝性脑病等主要表现的临床综合征。因其死亡率极高, 严重 ALF 的治疗是当今临床医学中最具有挑战的课题之一。为了有效地治疗 ALF, 制备与 ALF 发病经过相同、临床表现类似并可复制的物模型是解决此难题的第一步, 而了解各种 ALF 动物模型的构建机制就显得尤为重要。本课题以氧化偶氮甲烷 (azoxymethane, AOM)、四氯化碳 (tetrachloromethane, CCl₄)、刀豆蛋白 A (concanavalin-A, ConA) 三种常用造模药物诱导小鼠 ALF, 并探讨了其诱导 ALF 的发病机制, 为 ALF 动物模型的合理应用提供参考, 同时为 ALF 的临床治疗提供干预依据。

方法: 本研究选用 MLKL^{+/+} 及 MLKL^{-/-} 两种基因型, 6-8 周雄性 C57/B6 小鼠。首先按照两种基因型将小鼠分成两组, 分别用 AOM、CCl₄ 以及 ConA 三种药物构建 ALF 模型, 观察小鼠一般情况及生存率, 判断该模型是否依赖于混合系激酶结构域样 (Mixed Lineage Kinase Domain-like, MLKL) 基因。再将两种基因型小鼠分成半胱天冬酶 (cysteine containing aspartate specific protease, Caspase) 家族抑制剂 (Z-VAD-FMK, ZVAD) 组, Caspase1 抑制剂 (Ac-YVAD-CMK, CMK) 组以及二甲基亚砜 (dimethylsulfoxide, DMSO) 组, 在注射 AOM、CCl₄ 以及 ConA 之前提前一小时分别给予小鼠腹腔注射 ZVAD、CMK 以及 DMSO。造模完成后通过测量血清生化指标如丙氨酸氨基转移酶 (Alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (Aspartate aminotransferase, AST) 以及胆碱酯酶 (cholinesterase, CHE), 并以免疫组化病理切片以及蛋白免疫印迹 (western blotting) 等实验方法检测相关指标, 判断 AOM、CCl₄ 以及 ConA 诱导的 ALF 模型分别是通过细胞凋亡、细胞坏死以及细胞焦亡中的哪条途径对肝细胞造成损伤的。

结果: 通过小鼠一般状况的观察及生存曲线的统计显示: 在 AOM 诱导的 ALF 模型中, MLKL 基因型对小鼠一般情况以及生存率无影响; 在 CCl₄ 诱导的 ALF

模型中, MLKL^{+/+}组小鼠的生存率低于 MLKL^{-/-}组; 在 ConA 诱导的 ALF 模型中, MLKL^{+/+}及 MLKL^{-/-} 两组小鼠生存率无差别。生化指标 ALT、AST 以及 CHE 的统计数据显示: 在 AOM 诱导的 ALF 模型中, Caspase 家族抑制剂 ZVAD 能够起保护肝脏作用, 而 Caspase1 抑制剂 CMK 则不起保护肝脏作用; 在 CCl₄ 诱导的 ALF 模型中, 全 Caspase 家族抑制剂 ZVAD 及 Caspase1 抑制剂 CMK 均不起保护肝脏作用; 在 ConA 诱导的 ALF 模型中, 全 Caspase 家族抑制剂 ZVAD 及 Caspase1 抑制剂 CMK 均能起保护肝脏作用。病理切片显示: 在 AOM 诱导的 ALF 模型中, 可见胞浆嗜酸性变及凋亡小体, 肝细胞脂肪样变, 伴淋巴细胞浸润; 在 CCl₄ 诱导的 ALF 模型中, 可见点状及灶状坏死灶, 淋巴细胞及吞噬细胞浸润, 肝细胞肿胀, 发生脂肪变性; 在 ConA 诱导的 ALF 模型中, 可见点状坏死灶, 同时可见嗜酸性变及伴有大量淋巴细胞浸润的炎症反应。Western blotting 显示: AOM 诱导的 ALF 模型中, Caspase8 被激活而 Caspase1 未表达; CCl₄ 诱导的 ALF 模型可激活 MLKL 磷酸化 (MLKL-P); ConA 诱导的 ALF 模型可激活 Caspase1, 而 Caspase8 未表达。

结论: AOM 诱导的 ALF 不依赖于 MLKL 基因, 且通过细胞凋亡途径造成肝细胞损伤; MLKL 基因加重 CCl₄ 诱导的 ALF 模型中肝细胞的损伤, 且 CCl₄ 诱导的 ALF 模型通过细胞坏死途径造成肝细胞损伤; ConA 诱导的 ALF 不依赖于 MLKL 基因且通过细胞焦亡途径造成肝细胞损伤。

关键词: 急性肝衰竭; 小鼠模型; 凋亡; 坏死; 焦亡; MLKL

Abstract

Background and Aims: Acute liver failure (ALF) is a serious disease which can be life-threatening. It causes severe function disorders or decompensation in hepatic synthesis, excretion, detoxification, and biological conversion. ALF is a clinical syndrome in which coagulation disorders, jaundice, and hepatic encephalopathy are the main manifest. ALF has a very high mortality rate, so that the treatment of severe acute liver failure is one of the most challenging problems in clinical medicine. In order to treat ALF effectively, the preparation of animal model is the first step to solve this problem. The animal model needs to have similar clinical manifestations with ALF and can be repeated. So it is particularly significant to clearly aware of the mechanism of various animal models of acute liver failure. Our research aims at explore the mechanism of ALF models through three commonly used drugs including azoxymethane(AOM), tetrachloromethane(CCl₄), and concanavalin-A(ConA), and distinguishes the difference of pathogenesis among these three ALF animal models. Our study may provide a reference for the rational application of ALF animal model, and provide a valuable basis for the clinical treatment of ALF at the same time.

Methods: In this study we used C57/B6 male mice in the age of 6-8 weeks with genotype of MLKL^{+/+} or MLKL^{-/-}. Firstly, according to the two genotypes, mice were divided into two groups, building models of ALF with AOM, CCl₄ and ConA respectively. General condition and survival of mice were observed, and then based on the statistical data to determine whether the ALF model was MLKL-dependent. Secondly, each kind of genotype mice were divided into Caspase family inhibitor (Z-VAD-FMK, ZVAD) group, Caspase1 inhibitor (Ac-YVAD-CMK, CMK) group and dimethylsulfoxide (DMSO) group. ZVAD, CMK and DMSO were injected intraperitoneally one hour before injecting AOM, CCl₄, and ConA respectively. After ALF model was completed, measuring serum biochemical indexes such as Alanine aminotransferase (ALT), Aspartate aminotransferase (AST), cholinesterase (CHE), performing immunohistochemistry and western blotting as well as other related indicators to determine AOM, CCl₄, and ConA induced ALF models through which pathway to cause hepatocellular injury, meaning apoptosis, necrosis, or pyroptosis.

Results: By observing general condition in mice and analyzing the survival curve

statistics data, we found that, in AOM-induced ALF model, MLKL genotype had no effect on the general situation and survival rate of mice; however in CCl₄-induced ALF model, the survival rate in MLKL^{+/+} mice group was lower than MLKL^{-/-} mice group; in ConA-induced ALF model, MLKL^{+/+} mice group and MLKL^{-/-} mice group had no difference in survival rate. Biochemical indicators of ALT, AST and CHE showed that, in AOM-induced ALF model, Caspase inhibitor ZVAD could play a protective role in the liver, but Caspase1 inhibitor CMK could not protect the liver; in CCl₄-induced ALF model, both Caspase inhibitor ZVAD and Caspase1 inhibitor CMK could not protect the liver; in ConA-induced ALF model, both Caspase inhibitor ZVAD and Caspase1 inhibitor CMK could provide the protecting role to the liver. The pathological sections showed that, in AOM-induced ALF model, the cytoplasm was acidophilic, apoptotic bodies appeared, with the occurrence of fatty degeneration and lymphocyte infiltration; in CCl₄-induced ALF model, spotty necrosis and focal necrosis appeared, accompanied by the infiltration of lymphocytes and macrophages, liver cell swelling and fatty degeneration; in ConA-induced ALF model, showing spotty necrosis and acidophilic degeneration, accompanied by plenty of lymphocyte infiltration in inflammatory response. The western blotting showed, in AOM-induced ALF model, Caspase 8 but not Caspase 1 was activated; the CCl₄-induced ALF model could activate MLKL phosphorylation (MLKL-P); in ConA-induced ALF model, Caspase 1 but not Caspase 8 was activated.

Conclusion: AOM-induced ALF model dose not depend on MLKL gene, it causes the damage to hepatic cell by apoptosis pathway; MLKL gene can aggravate liver injury in CCl₄-induced ALF model, and the CCl₄-induced ALF model causes the damage to hepatic cell by necrosis pathway; ConA-induced ALF dose not depend on MLKL gene and it causes hepatic cell damage by pyroptosis pathway.

Key words: acute liver failure; mice model; apoptosis; necrosis; pyroptosis; MLKL

目 录

第 1 章 前 言	1
1.1 急性肝衰竭的流行病学及发生机制	1
1.1.1 急性肝衰竭的流行病学	1
1.1.2 急性肝衰竭的发生机制	2
1.2 MLKL 基因	3
1.2.1 MLKL 蛋白概述	3
1.2.2 MLKL——程序性细胞坏死的执行者	4
1.2.3 MLKL 蛋白的最新研究	5
1.3 肝损害的机制——凋亡、坏死、焦亡	7
1.3.1 凋亡	8
1.3.2 坏死	9
1.3.3 焦亡	10
1.3.4 死亡受体及肝损伤	12
1.3.5 Caspase 家族	13
1.3.6 线粒体	14
1.4 实验设计	15
第 2 章 材料与方 法	17
2.1 试剂、材料及关键仪器	17
2.1.1 实验用鼠	17
2.1.2 试剂	17
2.1.3 关键仪器与耗材	18
2.2 方 法	19
2.2.1 实验小鼠的饲养及筛选	19
2.2.2 AOM 诱导的急性肝衰竭小鼠模型的构建	25
2.2.3 CCl ₄ 诱导的急性肝衰竭小鼠模型的构建	27

2.2.4 ConA 诱导的急性肝衰竭小鼠模型的构建	28
2.2.5 蛋白质相关实验及方法	29
2.2.6 组织学相关实验及方法	35
第 3 章 结果及分析	39
3.1 AOM 诱导的急性肝衰竭模型机制	39
3.1.1 AOM 诱导的急性肝衰竭不依赖于 MLKL 基因	39
3.1.2 AOM 诱导的急性肝衰竭模型通过凋亡途径造成肝细胞损伤	40
3.1.3 AOM 诱导的急性肝衰竭模型中肝组织病理切片	41
3.1.4 AOM 诱导的急性肝衰竭模型中相关蛋白的表达情况	42
3.2 CCl₄ 诱导的急性肝衰竭模型机制	43
3.2.1 MLKL 基因加重 CCl ₄ 诱导的急性肝衰竭模型中肝细胞的损伤	43
3.2.2 CCl ₄ 诱导的急性肝衰竭模型通过坏死途径造成肝细胞损伤	44
3.2.3 CCl ₄ 诱导的急性肝衰竭模型中肝组织病理切片	45
3.2.4 CCl ₄ 诱导的急性肝衰竭模型中相关蛋白的表达情况	47
3.3 ConA 诱导的急性肝衰竭模型机制	47
3.3.1 ConA 诱导的急性肝衰竭不依赖于 MLKL 基因	47
3.3.2 ConA 诱导的急性肝衰竭模型通过焦亡途径造成肝细胞损伤	49
3.3.3 ConA 诱导的急性肝衰竭模型中肝组织病理切片	50
3.3.4 ConA 诱导的急性肝衰竭模型中相关蛋白的表达情况	51
第 4 章 讨论与展望	53
参考文献	57
英文缩略词表	61
致 谢	63

Table of Contents

Chapter 1 Introduction	1
1.1 The epidemiology and pathogenesis of acute liver failure	1
1.1.1 The epidemiology of acute liver failure	1
1.1.2 The mechanism of acute liver failure	2
1.2 MLKL gene	3
1.2.1 MLKL Protein Overview	3
1.2.2 MLKL-- Executor of programmed cell necrosis	4
1.2.3 The Latest research of MLKL Protein	5
1.3 The mechanisms of hepatocyte damage -- apoptosis, necrosis, pyroptosis	7
1.3.1 Apoptosis	8
1.3.2 Necrosis	9
1.3.3 Pyroptosis	10
1.3.4 Death receptors and liver injury	12
1.3.5 Caspase family	13
1.3.6 Mitochondria	14
1.4 Experiment design	15
Chapter 2 Materials and Methods	17
2.1 Reagents, materials and key instrument	17
2.1.1 Mice used in the experiments	17
2.1.2 Reagents	17
2.1.3 The key instrument and materials	18
2.2 Methods	19
2.2.1 Feeding and screening mice	19
2.2.2 Construction of AOM-induced ALF model	25
2.2.3 Construction of CCl ₄ -induced ALF model	27
2.2.4 Construction of ConA-induced ALF model	28
2.2.5 Experimental and methods related with protein	29
2.2.6 Experimental and methods related with histology	35
Chapter 3 Experimental results and Analysis	39
3.1 Mechanism in AOM-induced ALF model	39

3.1.1 AOM-induced ALF model does not depend on MLKL gene	39
3.1.2 AOM-induced ALF model causes the damage to hepatic cell by apoptosis pathway	40
3.1.3 Pathological results in AOM-induced ALF model	41
3.1.4 Western blotting results in AOM-induced ALF model	42
3.2 Mechanism in CCl₄-induced ALF model	43
3.2.1 MLKL gene play a protective role in CCl ₄ -induced ALF model	43
3.2.2 CCl ₄ -induced ALF model causes the damage to hepatic cell by necrosis pathway	44
3.2.3 Pathological results in CCl ₄ -induced ALF model	45
3.2.4 Western blotting results in CCl ₄ -induced ALF model	47
3.3 Mechanism in ConA-induced ALF model	47
3.3.1 ConA-induced ALF model does not depend on MLKL gene	47
3.3.2 ConA -induced ALF model causes the damage to hepatic cell by pyroptosis pathway	49
3.3.3 Pathological results in ConA-induced ALF model	50
3.3.4 Western blotting results in ConA-induced ALF model	51
Chapter 4 Discussion and expectation	53
References	57
English abbreviations	61
Acknowledgements	63

厦门大学博硕士学位论文摘要库

第 1 章 前言

1.1 急性肝衰竭的流行病学及发生机制

Trey 和 Davidson 于 1970 年提出急性肝衰竭这一概念，并将其定义为既往无肝病史的患者，在 8 周内出现以肝性脑病为首发症状的一种疾病。ALF 患者由于肝细胞大量死亡或功能丧失，发生急性严重肝功能不全，导致以肝性脑病伴凝血障碍为特征的临床综合征[1]。

ALF 的临床进展取决于其病因，不同病因导致其最终结局的不同。其常见病因如下：（1）嗜肝病毒感染。包括甲型肝炎病毒（Hepatitis A virus, HAV）、乙型肝炎病毒（Hepatitis B virus, HBV）、丙型肝炎病毒（Hepatitis C virus, HCV）、丁型肝炎病毒（Hepatitis D virus, HDV）、戊型肝炎病毒（Hepatitis E virus, HEV）。（2）非嗜肝病毒感染（少见）。巨细胞病毒（cytomegalovirus, CMV）、EB 病毒（EB virus, EBV）、疱疹病毒（herpes virus, HSV）、6 型人类疱疹病毒（Human herpes virus type 6, HHV-6）、水痘带状疱疹病毒（varicella-zoster virus, VZV）、副流感病毒等。（3）药物及特异质药物反应。醋氨酚，吸入麻醉剂，特异质药物反应（异烟肼、利福平、非类固醇抗炎药、磺胺类、丙硫氧嘧啶、四氯化碳、对乙酰氨基酚、三环抗抑郁药、别嘌醇、甲基多巴、四环素、苯丙香豆素，中药或中成药如雷公藤、壮骨关节丸、消渴片及某些中药减肥药等）（4）急性中毒。毒蕈、细菌毒素、黄曲霉素及磷。（5）免疫抑制因素。如肝移植后的纤维淤胆型肝炎。（6）其他病因。肝豆状核变性、自身免疫性肝炎、妊娠急性脂肪肝。（7）其他少见病因。

1.1.1 急性肝衰竭的流行病学

在美国，每年有 2000-2800 人发生 ALF。据统计，ALF 占全美疾病总体死亡人数的 0.1%（约 3.5/百万），占肝病相关死亡人数的 6%。此外，ALF 占肝移植病因的 5%-6%[2, 3]。

20 世纪 60 年代美国一项研究表明，2/3 的肝衰竭是由病毒性肝炎引起，其中药物性肝损伤占 23%，位居第二[4]。20 世纪 70-80 年代，HBV 成为最主要病因[5]。此外，还有与 HBV 引起的 ALF 患者数量相等的患者未能确定发病原因。

20 世纪 80 年代，有研究报导了与对乙酰氨基酚相关的 ALF。1983-1992 年期间，匹兹堡大学的相关研究表明，在当时，由于对乙酰氨基酚的毒性作用所导致的 ALF 占有肝衰竭病例的 19%。而 HBV 引起的 ALF 的发病率已下降至 18%，病因未明的病例占 44%[6]。美国 ALF 研究组对 1994-1996 年 ALF 的病因进行了回顾性分析，研究显示，对乙酰氨基酚相关性 ALF 占 20%，而由病毒性肝炎引起的 ALF 所占比例进一步下降至 17%[7]。美国 ALF 研究组对 1998-2001 年间收集的 308 例患者的前瞻性研究显示，因药物引发的 ALF 超过 50%。在此次研究中，病毒性肝炎仅占了 ALF 病例的 12%，还有 17% 的患者病因不详[8]。

在美国，大部分 ALF 的患者为女性（约占 67%-73%）和白种人（约 74%），而此比例会因病因不同而变化。与白种人相比，亚洲人更容易罹患因病毒性肝炎引起的 ALF（亚洲人 26%，黑人 19%，白种人 8%），同时，与白种人相比，亚洲人和黑人更容易发生药物诱发的 ALF。虽然不同人种组别之间在整体死亡率方面并没有差别，但亚洲人和西班牙人在进行肝移植后的获益更大（黑人和白种人相似）[8]。

在 20 世纪 70 年代，ALF 的存活率不足 20%，随着肝移植技术和重症监护的发展，大大改善了 ALF 的存活率，到目前为止这一比率已达 70%，扑热息痛、休克和甲型肝炎导致的 ALF 预后较好，此类 ALF 的自发存活率可达 58%-64%，而自身免疫性疾病、药物和不确定因素所致的 ALF 的自发存活率却不足 30%[9]。接受肝移植的 ALF 患者，其一年生存率可超过 70%[10]。

综上所述，治疗 ALF 的关键是能够早期识别，明确病因和发病机制，正确预估严重性以及确定能否进行肝移植。

1.1.2 急性肝衰竭的发生机制

ALF 的基本发病机制为肝细胞死亡速率超过肝细胞再生速率，已致肝脏不能满足机体代谢需求，导致肝功能衰竭和多脏器衰竭[11]。肝细胞死亡可分为坏死和程序性死亡（凋亡），以及近年来新发现的死亡方式（如焦亡）。肝细胞坏死时线粒体功能衰竭，细胞膜丧失完整性；而肝细胞凋亡则由于死亡受体与死亡配体相互作用（Fas, TNF 等），使半胱氨酸蛋白酶激活，从而导致细胞死亡。

不同的病因可引起不同类型的肝细胞损伤。有以凋亡为主的，也有以坏死为主的，还有的两者共同存在[12-14]。细胞凋亡依次出现核固缩，核碎裂，胞质浓

缩,最后细胞死亡。由于细胞膜一般未被破坏,此时继发性炎症很难被发现[11]。由外在途径(肝细胞受体激活)或内在途径(继发于线粒体的氧化应激)均可触发细胞的凋亡[13]。细胞凋亡涉及 TNF 和 FasL 配体/Fas 受体两条途径。受体激活半胱氨酸蛋白酶,触发级联反应,诱发凋亡和细胞死亡。半胱天冬酶的激活与否取决于刺激的类型和种类,同时,肝细胞的坏死与细胞内 ATP 的耗竭也密切相关。该应激最终能够导致细胞发生肿胀破裂,致使细胞内容物释放,引发炎症反应和肝细胞的进一步损伤[13]。当细胞内线粒体被严重破坏以及细胞内原本储存的 ATP 也被完全耗竭时,细胞损伤导致的细胞凋亡将会促进细胞坏死[11, 14]。同时,显著地氧化应激也可能会抑制凋亡前的级联反应[11, 13],从而可能会使细胞凋亡进展为坏死[11, 13, 14]。

这种灾难性肝损伤的临床特征主要包括肝性脑病和凝血功能障碍,同时也与血流动力学改变,脑水肿,肾衰竭以及电解质紊乱密切相关。由于缺少该病充足的动物模型,致使人们对该病病理生理学方面的认识有限,本课题通过构建不同类型的 ALF 小鼠模型,并探讨其机制,希望能在此方面为今后的研究提供参考和利用价值。

1.2 MLKL 基因

1.2.1 MLKL 蛋白概述

王晓东实验室在 2012 年首次发现了受体相互作用蛋白激酶-3 (receptor interacting protein kinase 3, RIP3)的特异性底物蛋白 MLKL[15]。他们发现在 RIP3 介导的细胞坏死信号通路中, MLKL 扮演着 RIP3 激酶其中一个底物的角色。MLKL 是拥有激酶结构域但无激酶功能的假激酶,其激酶结构域的 375 位苏氨酸及 358 位丝氨酸(人源)在细胞程序性坏死启动后被 RIP3 磷酸化。MLKL 磷酸化是细胞程序性坏死通路中不可或缺的步骤。MLKL 是 RIP1 /RIP3 结合复合体核心物质之一。混合系激酶区域样(MLKL)蛋白为一种激酶样蛋白,其 N 端为 4 个螺旋束结构域, C 端由 2 个螺旋链连接成激酶样区域。根据不同的剪切方式形成两种剪切异构体。两种 MLKL 同位异构体具有相同的 C-端及 N-端,但 MLKL 剪切异构体 1 编码的是由 471 个氨基酸组成的长同位异构体,由于缺少外显子 4 ~ 8, 剪切异构体 2 编码的是由 263 个氨基酸组成的短同位异构体。

1.2.2 MLKL——程序性细胞坏死的执行者

细胞的死亡机制一直是生物医学研究的核心热点之一。过去，人们一直将细胞死亡分为坏死和凋亡。随着对细胞死亡机制的深入研究，越来越多的证据表明，某些类型的坏死性细胞死亡也是一种受到高度调控的程序性死亡途径。程序性坏死不仅参与机体的生理性调节过程，还与神经变性疾病、缺血性疾病、炎症、病毒感染性疾病等一些具有坏死表型的疾病发生、发展及预后相关[16-19]。其中由 RIP3 和 MLKL 调控的程序性细胞坏死是目前研究的最为清晰的坏死途径。2009 年，韩家淮实验室与其他两个实验室共同发现，RIP3 的激酶活性是肿瘤坏死因子 α (Tumor Necrosis Factor, TNF- α) 诱导的细胞坏死过程中不可或缺的。当 RIP3 存在，并且 Caspase8 活性被抑制时，RIP1、RIP3 相互结合形成一个信号复合体，被称作“necrosome”的坏死小体。Necrosome 可以介导 RIP1 和 RIP3 激酶活性依赖的细胞坏死。RIP1 和 RIP3 在坏死小体中被激活，进而激活下游 MLKL 等分子[20-22]。

MLKL 作为 RIP3 的特异性底物，也是程序性细胞坏死的执行者。MLKL N-端为功能结构域，鼠源 MLKL(mMLKL)含有 4 个 α -螺旋，人源 MLKL(hMLKL)含有 5 个 α -螺旋，由 4 个螺旋形成的螺旋束是鼠源 MLKL 和人源 MLKL 的共同特点，MLKL C-末端为激酶样结构域，两者通过 2 个 α -螺旋连接域相连[23]。尚未被激活的 MLKL 以单体的形式存在于细胞质中。RIP3 自磷酸化激活后通过激酶结构域与 MLKL 激酶样结构域相结合，同时在激酶样结构域 Thr357/Ser358 位点磷酸化 hMLKL 或在 Ser345/347/352 和 Thr349 位点磷酸化 mMLKL[24]，进而推动细胞坏死程序的执行。MLKL 单体磷酸化之后发生寡聚，其 N-末端螺旋束可以结合线粒体特异性的心磷脂 (cardiolipin, CL) [25]和磷脂酰肌醇磷脂 (Phospholipid phosphatidylinositol, PIPs) [25, 26]，进而从细胞质转位到富含 CL 或 PIPs 的质膜上。化学抑制剂 NSA (necrosulfonamide) 可与 hMLKL 的螺旋束互相结合，扰乱 MLKL 的 N-末端功能，从而阻断 MLKL 向质膜的转移[25, 27]。CL 主要分布于线粒体内膜，坏死发生时可与 MLKL 结合。同样，抑制 PIPs 的合成会减少 MLKL 诱导的坏死的发生[26]。不同 PIPs 可将 MLKL 定位到不同细胞组分。由于 PI (4) P 及 PI (4,5) P₂ 广泛存在于质膜表面，因此坏死途径激活后，质膜完整性将会丢失。分布于不同细胞器的其他 PIPs 也可能会募集寡聚 MLKL 到达相应的膜部位。通过特异性识别人 MLKL Ser358 磷酸化位点的抗体

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 for delivery details.