



坏死性凋亡研究进展*

石坤男¹⁾ 覃夏^{2,3)} 王红阳^{1,2,3)}** 蔡振宇^{1,2,3)}**⁽¹⁾ 复旦大学附属肿瘤医院肿瘤研究所, 复旦大学上海医学院肿瘤学系, 上海 200032;⁽²⁾ 国家肝癌科学中心, 上海 201805; ⁽³⁾ 国际合作信号转导实验室, 东方肝胆外科医院, 第二军医大学, 上海 2000438)

摘要 程序性细胞死亡对于机体的生长发育及组织器官的稳态具有重要作用. 坏死性凋亡是最近发现的一种可调控的程序性细胞死亡方式, 其在形态学上具有坏死的特征. 目前的研究表明, 坏死性凋亡是由受体结合丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 3 (receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3, RIPK3) 以及其底物混合谱系激酶结构域样蛋白 (mixed lineage kinase domain-like protein, MLKL) 共同介导. 细胞的增殖和死亡在维持机体内环境稳态中发挥重要作用, 大量研究表明坏死性凋亡的失调和人类疾病的发展密切相关, 比如炎症性疾病、自身免疫性疾病、肿瘤以及退行性病变. 在这篇综述中, 将讨论坏死性凋亡的分子机制及其相关疾病的研究进展.

关键词 程序性细胞死亡, 坏死性凋亡, 炎症, RIPK3, MLKL

中图分类号 180.2160

DOI: 10.16476/j.pibb.2019.0209

早在 19 世纪, 人们就开始研究细胞死亡的形态学特点, 认为细胞死亡只有凋亡和坏死两种模式. 而凋亡是唯一可调节的细胞死亡方式, 坏死则是一种不受调节的细胞死亡方式^[1]. 凋亡在促进胚胎的发育、维持机体的稳态、免疫细胞的发育以及清除不需要的细胞避免肿瘤的发生发挥着十分重要的作用^[2]. 细胞凋亡受到细胞内信号转导因子的严格调控, 因而细胞凋亡能以可调节的方式应对某些生理和病理因素的刺激. 当凋亡发生时, 凋亡的细胞形成凋亡小体, 细胞的细胞膜保持完整, 细胞质内容物不释放到细胞膜外, 因而不引发炎症反应. 与此相反, 长期以来人们认为细胞坏死是由于某些病理状况而导致的被动死亡, 如物理性或化学性的损伤、细胞缺氧以及缺乏营养等. 坏死细胞的细胞膜通透性增高, 致使细胞肿胀、细胞器变形或肿大, 最后细胞破裂, 从而引起细胞内容物的释放而进一步诱发炎症反应^[3].

随着对细胞死亡研究的深入, 人们意识到不是所有的坏死都是被动的^[4]. 细胞由于病理生理刺激而发生的细胞死亡在某些条件下也可显示出坏死的形态学特征. 2005 年, Degterev 等^[5]发现了一种可被 Necrostatin-1 (Nec-1) 抑制的细胞死亡方式, 并

由此提出了一种新型的细胞死亡概念——坏死性凋亡 (necroptosis). 在坏死性凋亡的发生过程中, 受体结合丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 3 (RIPK3) 及其底物混合谱系激酶结构域样蛋白 (MLKL) 是参与细胞坏死性凋亡的关键分子, 而磷酸化的 MLKL 易位至细胞膜的内侧并破坏细胞膜的完整性是发生坏死性凋亡的关键步骤^[6]. 这篇综述将集中讨论坏死性凋亡的分子机制及与之相关的疾病.

1 坏死性凋亡的分子机制

坏死性凋亡是一种受调节的细胞死亡方式, 由受体相互作用丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1 (RIPK1) 介导^[7]. RIPK1 在细胞存活、炎症和细胞凋亡中发挥作用, 并被确定为坏死性凋亡的主要参与者. 目前对坏死性凋亡分子机制的认识大部分来自对肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 诱导的坏死性凋亡信号途径

* 国家自然科学基金项目面上项目 (81773075) 和上海市科委国际合作项目 (18410720600) 资助

** 通讯联系人. Tel: 021-81888141

蔡振宇. E-mail: draizhenyu@126.com

王红阳. E-mail: hywangk@vip.sina.com

收稿日期: 2019-10-25, 接受日期: 2020-06-17

的研究. TNF- α 作为一种炎症相关细胞因子,在炎症中起重要作用. TNF- α 本身不仅能诱发炎症反应,还能在不同病理生理条件下诱发细胞凋亡或坏死性凋亡.

当 TNF- α 被细胞膜表面的 TNF 受体 1 (TNFR1) 识别后,其诱导的信号途径主要促进细胞生长、存活和诱发炎症反应.然而,在某些条件下, TNF- α 还可以诱导细胞发生程序性死亡.目前的研究表明, TNF- α 诱导的细胞程序性死亡分为两种类型,即细胞凋亡 (apoptosis) 和坏死性凋亡 (necroptosis).

1.1 TNF- α 诱导复合体I (complex I) 的形成

当 TNF- α 与细胞膜表面的 TNFR1 结合后, TNFR1 的构象会发生改变并首先招募肿瘤坏死因子受体相关死亡结构域 (TNF receptor associated death domain, TRADD) 和 RIPK1 形成复合体. TRADD 和 RIPK1 在此相当于支架蛋白作用,进而继续募集 TNF 受体相关因子 2 (TNF-receptor-associated factor 2, TRAF2)、细胞凋亡抑制蛋白 1 和 2 (cellular inhibitor of apoptosis protein 1 and 2, cIAP1/2), 从而在细胞膜上形成包含 TRADD、RIPK1、TRAF2、cIAP1/cIAP2 的复合体 I (complex I)^[8] (图1).

复合体 I 具有激活 NF- κ B 信号通路的作用,从而促进细胞存活和诱发炎症反应^[9-10].这一作用被认为与 RIPK1 蛋白的多聚泛素化相关^[11]. RIPK1 蛋白的泛素化主要由 c-IAP1/2 和线性泛素化链组装复合体 (linear-ubiquitin chain assembly complex, LUBAC) 蛋白所介导. cIAP 和 LUBAC 可以合成各种类型 (K63、K48、K11、M1 和可能的支链) 的泛素化链.一方面, cIAP1/2 具有 E3 泛素连接酶的活性,可以对 RIPK1 进行多聚泛素化修饰.当 RIPK1 被 cIAP1/2 介导的多聚泛素化后能以此为支架^[12-14] 进一步募集转化生长因子活化激酶 1 (transforming growth factor-beta activated kinase 1, TAK1) 和 TAK1 结合蛋白 (TAK1 binding protein, TAB),从而激活 NF- κ B 信号通路^[15-16].另一方面, LUBAC 还可以在 RIPK1 或复合体 I 其他组分上诱导 M1-连接的泛素化链形成,从而促进核转录因子 NF- κ B 必要调节剂 (nuclear factor- κ B essential modulator, NEMO) 在复合物 I 上的募集^[17]. NEMO 是 IKK 激酶 (IKK) 复合体的调节亚基,这个复合体包括 IKK1 / IKK α 和 IKK2 / IKK β ^[18].此外, LUBAC 与 cIAP 还有助于促进 TANK 结合激酶

1 (TBK1) 和 IKK ϵ 与复合体 I 的相互作用, TBK1 和 IKK ϵ 对于抑制 TNF 诱导的细胞死亡至关重要^[19].这些分子在复合体 I 上的募集将进一步激活 NF- κ B 信号通路.

NF- κ B 信号通路的激活诱导多种促存活基因的表达,其中包括 IAPs 在内的多种抗凋亡基因,比如 c-IAP1/2 和胞内 FLICE 抑制蛋白 (cFLIP)^[9]. cFLIP 是 Caspase-8 的同源异构体,但无 Caspase 酶的活性,可与 Caspase-8 结合后抑制 Caspase-8 的活化,从而使细胞免于 Caspase-8 介导的凋亡^[20].另外, cIAP2 诱导表达后促进 NF- κ B 的抑制蛋白 I κ B 的泛素化降解而导致 NF- κ B 活化,从而将 NF- κ B 分子释放进入细胞核,促进细胞存活^[16].因此复合体 I 被认为是细胞存活的关键检查点.

1.2 复合体 II (complex II) 的形成

复合体 I 中的各种组分发生的泛素化有助于稳定细胞膜上的复合体 I 而抑制复合体 II 的形成,从而促进细胞的存活^[21].但是,当来自复合体 I 中各组分的泛素化受到抑制时,复合体 I 各组分会从细胞膜上释放形成细胞质复合体 II (complex II). 复合体 II 有复合体 II a 和复合体 II b 两种形式,即 TRADD 依赖性 (复合体 II a) 和 RIPK1 依赖性复合体 (复合体 II b).两者可以通过在诱导细胞凋亡时是否需要 RIPK1 激酶活性来区分.已有研究表明,复合体 II a 的形成和细胞存活的晚期检查点受到损害相关,即依赖 NF- κ B 的细胞死亡检查点^[16].如果晚期 NF- κ B 依赖性检查点被破坏,即 NF- κ B 信号通路被抑制,则会导致 FADD / Caspase-8 依赖性细胞凋亡^[22].这一机制与不能表达 Caspase-8 的抑制蛋白 cFLIP 相关^[23].在这种情况下, Caspase-8 的激活和细胞凋亡不需要 RIPK1,因此称为 RIPK1 非依赖性细胞凋亡,而这种死亡信号复合体被称为复合体 IIa.与复合体 IIa 不同,复合体 IIb 的形成被认为与细胞存活早期信号检查点的破坏有关,即与复合体 I 中的各种组分发生的泛素化相关,它和复合体 IIa 的区别在于是否需要 RIPK1 激酶的活性^[18].当复合体 I 中 RIPK1 的多聚泛素化被抑制时, RIPK1 从细胞膜上释放并进一步募集 FADD 和 Caspase-8 从而激活 Caspase-8 触发细胞凋亡,因此称为 RIPK1 依赖性细胞凋亡.

1.3 坏死复合体 (necrosome) 的形成

已有研究表明,介导坏死性凋亡的重要蛋白 RIPK3 是 Caspase-8 蛋白水解酶的底物^[24]. Caspase-8 失活促进坏死性凋亡的证据源于 Caspase-8 缺陷小

鼠的胚胎致死性可以通过敲除 RIPK3 挽救^[24-25]. 同样的, RIPK3 的缺失也可以挽救 FADD 缺失引起的胚胎致死性^[20], 这些都表明 RIPK3 在坏死性凋亡中的重要作用. 当细胞凋亡发生时, 活化的 Caspase-8 导致 RIPK3 的切割, 从而抑制了坏死性凋亡. 因此, 当复合体 II b 形成后, 只有在细胞凋亡受阻、Caspase-8 活性受到抑制时, 细胞才会发生坏死性凋亡. 当 Caspase-8 活性受到抑制时, RIPK1 和 RIPK3 通过 RIP 同源相互作用结构域 (RHIM) 相互作用, 形成 RIPK1-RIPK3 坏死复合体 (necrosome)^[24]. 在坏死复合体中, RIPK1 磷酸化激活 RIPK3. 一旦被激活, RIPK3 在 T357 位点和 S358 位点磷酸化 MLKL, 这些残基的磷酸化导致 MLKL 的构象转变并导致其四螺旋束结构域的暴露^[26]. 然而, MLKL 如何精确执行坏死性凋亡仍然是一个争论的问题. 目前认为, 在坏死性凋亡过程中, MLKL 在 T357 和 S358 被磷酸化, 导致其通过 N-末端结构域 (支架区域) 发生寡聚化和易位至细胞质膜, 最终直接或间接破坏细胞质膜而导致坏死性凋亡的发生^[26-30].

1.4 坏死性凋亡的执行

尽管到目前为止 MLKL 诱导质膜破裂的分子机理尚不明确, 其向细胞质膜的易位对于触发细胞膜的破裂并诱导坏死性凋亡是必不可少的. 有研究表明, 在此过程中 MLKL 可能参与激活钙或钠阳离子通道, 从而导致相关阳离子流入细胞质, 最终通过改变细胞渗透压而诱发细胞膜发生破裂^[29-31]. 如寡聚化的 MLKL 可与细胞质膜上的瞬时受体电位离子通道蛋白 7 (transient receptor potential melastatin related 7, TRPM7) 相互作用, 从而介导细胞外的 Ca^{2+} 流入细胞内导致质膜损伤^[29]. 而另一项研究报道, 细胞质膜上的 MLKL 复合物能够通过其自身或通过其他膜蛋白来增加钠离子的流入, 使细胞内渗透压升高并最终导致细胞肿胀和质膜破^[29, 31]. 同时, 另一部分研究表明, MLKL 也可能在细胞膜上形成孔状结构, 从而直接破坏细胞质膜导致细胞发生坏死性凋亡^[30, 32-33]. MLKL 通过其 N 端结构域含有可以与磷酸化的磷脂酰肌醇磷酸 (PIP) 磷脂结合的亲和位点与细胞质膜结合. 当 MLKL 易位至细胞质膜后, 由于其构象发生改变, 使 MLKL 具有更加强大的质膜结合力^[32-33]. 此外, 寡聚化后的 MLKL 能够结合带负电荷的脂质, 使得 MLKL 能够易位并融入富含磷脂酰肌醇和心磷脂的多个细胞质膜中, 形成坏死体并直接破坏质

膜的完整性, 导致细胞死亡^[30]. 当细胞膜破裂时, 细胞质中的损伤相关分子模式 (DAMPs) 被释放, 导致组织炎症和器官损伤^[3].

1.5 坏死性凋亡的调控机制

RIPK1 的线性泛素化对于促进细胞存活具有至关重要的作用, RIPK1 的线性泛素化抑制了凋亡和坏死性凋亡. 敲除 RIPK1 基因的小鼠会因自发性 Caspase-8 介导的细胞凋亡和 RIPK3 介导的坏死性凋亡而在出生后不久死亡^[34-36]. 此外, 皮肤和肠上皮细胞中 RIPK1 的缺失导致细胞异常死亡, 从而使体内平衡改变, 导致小鼠过早死亡^[37-38]. 目前已知 RIPK1 可以通过两种机制促进细胞存活: a. 帮助细胞 FLICE 抑制蛋白 (cFLIP) 募集到 Caspase-8, 从而导致 Caspase-8 失活^[39]; b. 促进 NF- κ B 的激活和促存活基因的产生, 例如编码 cFLIP、A20、cIAP2 和 Bcl2 家族成员等^[40]. 亦有研究证实 RIPK1 介导的 NF- κ B 活化不需要 RIPK1 激酶活性, 而是依赖于 RIPK1 中间结构域的泛素化^[41]. 此外, RIPK1 可被锌指蛋白 A20 (zinc finger protein A20, 简称 A20) 和 Cylindromatosis 基因 (CYLD) 去泛素化, 使 RIPK1 降解, 从而无法激活 NF- κ B 信号^[12]. RIPK1 的泛素化对于 TNF 激活 NF- κ B 信号通路是必不可少的^[41].

已有研究表明, TBK1 和 IKK ϵ 磷酸化复合体 I 中的 RIPK1, 从而阻止 RIPK1 激酶依赖性的细胞死亡^[19, 42]. TBK1 和 IKK ϵ 是两种密切相关的激酶, 与经典激酶 IKK α 和 IKK β 具有同源性. TBK1 和 IKK ϵ 与复合体 I 的结合需要 NEMO, NEMO 可以进一步招募 TRAF 家庭成员相关的 NF- κ B 激活剂 (TRAF family member associated NFKB activator, TANK), 它可以进一步促进复合体 I 对 TBK1 和 IKK ϵ 的募集.

TAK1 对于 RIPK1 介导的细胞死亡也有调节作用, 而这一过程主要与 TAK1 磷酸化 I κ B kinase (IKK) 有关. 研究表明, 阻断 TAK1 可以在人和小鼠中促进 TNF- α 诱导的细胞死亡, 这一现象可能与 NF- κ B 信号通路无法激活相关. TAK1 被激活后磷酸化 IKK, IKK 催化 NF- κ B 抑制因子 (I κ B) 的磷酸化与降解, 释放并活化 NF- κ B, 从而使 NF- κ B 转移到细胞核中, 诱导存活和促炎基因的转录, 促进细胞存活^[11, 15-16]. 此外, 最新的研究表明, TAK1 通过对 RIPK1 的第 321 位丝氨酸 (S321) 位点的磷酸化会抑制 RIPK1 依赖性的程序性细胞死亡, 但对 NF- κ B 活化没有影响, 但该位点的磷酸

化促进了RIPK1与FADD结合,导致RIPK1依赖性细胞凋亡的发生^[43].有研究表明,复合物I中IKK α /IKK β 对RIPK1磷酸化可以阻止RIPK1激酶依赖性复合体IIb的形成,同时也阻止RIPK1激酶依赖性坏死复合体(necrosome)的形成,其具体的机制有可能与抑制RIPK1激酶的活性有关^[44].与此相一致的是,IKK α /IKK β 激酶的抑制剂有助于复合物I中RIPK1的第166位丝氨酸(S166)的自磷酸化,从而促进RIPK1依赖性的细胞死亡^[44].此外,TAK1的激活对下游p38和MK2的活化也具有重要作用^[45].最近的研究表明,MK2可以磷酸化RIPK1第320位和第335位丝氨酸(S320/S335),从而抑制RIPK1 S166位点的自磷酸化,阻止RIPK1激酶依赖性的细胞死亡^[46-48].尽管IKK和MK2都能够抑制RIPK1的自磷酸化,但它们对RIPK1的调节是独立的,并且共同抑制复合体II的形成和细胞死亡^[46].此外还有研究发现,细胞质维甲酸受体 γ (retinoic acid receptor gamma, RAR γ)对于启动RIPK1介导的细胞生存向细胞死亡之间的转换是必不可少的.RAR γ 通过介导RIPK1与TNFR1的解离而抑制复合物II的形成,从而抑制细胞凋亡和坏死性凋亡^[49].

以上为影响复合体I活性的调控机制,类似的调控机制同样作用于复合体II和坏死复合体上,从而避免机体内不当坏死性凋亡的发生.已有研究表明,被磷酸化激活的RIPK3通过其FHA结构域可以与pellino E3泛素蛋白连接酶1(pellino E3 ubiquitin protein ligase 1, PELI1)相互作用.PELI1是一种调节因子,可以靶向RIPK3的K363位点K48连接多聚化泛素链导致其蛋白酶体依赖性降解,而RIPK3的T182位点的磷酸化对于RIPK3激酶的活性以及PELI1的招募是非常重要的.PELI1或许通过促进磷酸化RIPK3的降解,提供一种稳态机制,而预防异常的细胞死亡,并最大限度地减少细胞发生坏死性凋亡^[50].最新的研究表明,MLKL的激活也是受到调节的.磷脂酸肌醇(inositol phosphate, IP)对于MLKL引发的坏死性凋亡是必不可少的.在IP激酶突变细胞中,尽管RIPK3可以磷酸化MLKL,但MLKL却不能定位到细胞膜上,从而抑制坏死性凋亡的发生,这或许可以作为抑制坏死性凋亡的药物靶点^[51].

2 坏死性凋亡与相关疾病

越来越多的研究表明,细胞死亡的方式与多种

疾病的发生发展密切相关.在过去的几十年中,以异常细胞死亡为特征性疾病往往归因于细胞凋亡.发生凋亡的细胞形成凋亡小体,最终被巨噬细胞吞噬,细胞内容物不释放到细胞膜外.在大多数情况下,细胞凋亡是免疫沉默的,其活化不会促进炎症或自身免疫反应^[52].因此,人们认为在生理状态下的细胞凋亡是清除无功能或功能失常的细胞而保持体内环境稳态的一种理想方式.相对于细胞凋亡,坏死性凋亡使细胞内容物释放到胞质外环境中,常诱发显著的炎症反应^[53].

坏死性凋亡可以被多种刺激而激活,包括肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、脂多糖(LPS)、DNA损伤、缺氧和营养缺乏^[54].目前的研究表明,坏死性凋亡与多种疾病相关.和坏死性凋亡相关疾病的一个证据源于坏死性凋亡小分子抑制剂Necrostatin-1(Nec-1)的发现.Nec-1是RIPK1激酶抑制剂,已有大量证据表明给予Nec-1可以抑制多种疾病模型中的程序性细胞死亡从而降低疾病致死率.这些疾病包括,一些炎症相关疾病^[55]、肿瘤^[56]、心肌梗死^[57]、中枢神经系统退行性病变^[58]、动脉粥样硬化^[59]、缺血-再灌注损伤^[60]等.因此,坏死性凋亡往往参与了炎症性疾病的发生发展过程,而抑制坏死性凋亡可能为相关疾病尤其是炎症性疾病的治疗提供重要的靶点(表1).

2.1 坏死性凋亡与炎症相关疾病

通过对基因敲除动物模型的研究表明,坏死性凋亡参与了多种炎症相关疾病的发生发展.例如,RIPK1敲除的小鼠在出生时死亡并表现出全身性炎症^[61].人们在该小鼠中将RIPK3或MLKL敲除后,其在出生时存活;但将介导细胞凋亡的关键因子Caspase-8敲除后却不能抑制RIPK1敲除而引发的小鼠胚胎致死^[35].这一结果说明坏死性凋亡参与了RIPK1引发的全身性炎症反应.此外,人们在小鼠肠上皮细胞中特异性敲除FADD或Caspase-8后细胞发生坏死并且在小鼠体内诱发自发性肠炎^[62-63].此时若将RIPK3基因一同敲除,则可预防由FADD或Caspase-8敲除所诱发的肠上皮细胞坏死以及自发性肠炎^[64].与此类似的是,在小鼠皮肤特异性敲除RIPK1后会诱发角质形成细胞死亡和严重的皮肤炎症,而进一步敲除RIPK3或MLKL后则抑制了细胞死亡和皮肤炎症的发生^[37].因此,上皮细胞的坏死性凋亡是引发上皮屏障破坏而诱发肠和皮肤炎症的关键致病机理^[65].此外,还有证据表明坏死性凋亡不仅与肠道和皮肤的炎症相关,

其也参与组织损伤所诱发的各种炎症反应. 例如, RIPK1、RIPK3 或 MLKL 的缺失可以减轻组织损伤所诱发的炎症反应, 甚至可以在炎症性疾病中防止组织损伤^[66].

同样, 临床数据表明, 患有炎症性肠病的儿科患者在炎症组织中 RIPK3 和 MLKL 水平升高, 而 Caspase-8 水平降低, 这一数据进一步证明坏死性凋亡与炎症性肠病之间具有高度相关性^[67].

2.2 坏死性凋亡和感染相关性疾病

已有的研究发现, 坏死性凋亡在抗病毒反应中起着重要作用. 已知细胞死亡可以阻止病原体复制周期的完成, 从而抑制感染性疾病的进展. 坏死性凋亡的抗病毒作用最有力的证据来自痘苗病毒 (VV) 的相关研究. VV 编码的 B13R 蛋白可以阻断 Caspase-8 活性并使感染的细胞在体外对 TNF- α 介导的坏死性凋亡敏感^[68]. 此外, 人类单纯疱疹病毒 (HSV) 通过编码抗凋亡病毒蛋白如 gD、gJ、Us3、LAT 等抑制 Caspases 的活性从而防止宿主细胞发生凋亡, 此时宿主细胞通过启动坏死性凋亡途径产生防御机制, 从而清除体内感染的 HSV^[69]. 这些研究都表明坏死性凋亡能作为一种限制病毒复制的替代机制, 在机体清除自身体内感染病毒的过程中起着重要作用.

但是, 病毒也可通过抑制坏死性凋亡而促进其在宿主内的复制和感染^[70-71]. 例如, 由小鼠巨细胞病毒 (CMV) M45 基因编码的含有 RHIM 结构域的病毒蛋白 “RIP 激活病毒抑制剂 (vIRA)”, 可以通过 RHIM 结构域与 RIPK1 和 RIPK3 相互作用而直接抑制病毒诱导的宿主细胞坏死性凋亡^[72]. 此外, 人类 CMV 可以通过即早基因 (immediate early gene 1, IE1) 的表达来阻断坏死性凋亡, 其编码的蛋白质通过目前未知的机制阻断 MLKL 激活而抑制坏死性凋亡^[73].

2.3 坏死性凋亡和退行性疾病

坏死性凋亡还与退行性疾病相关. 动物模型证实坏死性凋亡与脑和视网膜的退行性病变相关^[74]. 研究发现, RIPK3 缺失或 RIPK1 激酶活性抑制可以在某些小鼠模型中起到保护作用. 例如, 肌萎缩侧索硬化症 (ALS) 和阿尔茨海默病 (AD)^[74-76]. 与此相一致的是在小鼠中抑制 RIPK1 或 RIPK3 的激酶活性可以延迟 ALS 症状^[58, 77-78].

人类临床样本表明, AD 患者脑颞中回的 RIPK1 和 MLKL 表达增加, 同时在患者样品中也观察到了坏死细胞的形成和 MLKL 的磷酸化以及

在海马体内的神经元中发现了超过 60% 的神经元 MLKL 磷酸化^[58]. 同时, RIPK1 可以直接调节 AD 中神经小胶质细胞的活化, 并且可以介导向与小胶质细胞相关的疾病转变, 这些研究均表明神经退行性病变和坏死性凋亡相关^[75, 78-79]. 此外, 使用 RIPK1 激酶抑制剂 Nec-1 还可减轻创伤性脑损伤 (TBI) 后的细胞死亡和脑组织损伤^[5].

2.4 坏死性凋亡和肿瘤相关性疾病

现有的研究表明, 坏死性凋亡既能抑制也能促进癌症发生发展, 其具体作用往往取决于肿瘤类型及其发展阶段. 例如, 大多数的肿瘤细胞由于 RIPK3 的低表达而表现对坏死性凋亡的抵抗从而促进肿瘤的生长^[80]. 在人类的肿瘤样本中已经观察到 RIPK3 表达的下调, 包括急性髓性白血病^[81]、慢性淋巴细胞白血病^[82]、结直肠癌^[83]和乳腺癌^[80]等. 低 RIPK3 表达与卵巢癌^[84]、结直肠癌^[83]和乳腺癌^[80]中较差的存活率有关. MLKL 在多种癌细胞系和几种癌症类型中被检测到, 低 MLKL 表达与胃癌、卵巢癌和结肠癌的预后不良有关^[85-86]. 同样, MLKL 在胰腺癌和可切除的原发性卵巢癌中表达降低也与总体存活率降低和无病生存率降低相关^[87]. 而高 MLKL 表达与宫颈鳞癌的总存活率改善有关^[88]. 这表明从 MLKL 介导的逃避坏死性凋亡可能是肿瘤发展和进展的机制. 然而, 高水平的磷酸化 MLKL 已被证明与结肠癌和食道癌患者的预后不良相关^[83, 89]. 此外, 多种关键介导坏死性凋亡的分子在癌症中表达下调, 例如去泛素化酶 CYLD 在慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 中经常被下调^[90], CYLD 是一种促进坏死性凋亡的去泛素酶, 在坏死性凋亡过程中发挥着重要作用. 总之, 包括 CYLD、RIPK3 和 MLKL 在内的坏死性凋亡关键介质表达的下调在某些类型癌症中普遍存在, 这可能是肿瘤细胞逃避坏死性凋亡的重要分子机制之一.

此外, 坏死性凋亡可能在引发免疫原性和促进自然抗癌免疫监视方面发挥重要作用. 研究表明, 肿瘤细胞发生坏死性凋亡释放 IL-1 α 以激活树突细胞 (DC), 活化的 DC 通过产生细胞毒性细胞因子 IL-12 和激活 CD8⁺ T 细胞来消除癌细胞从而诱导抗肿瘤免疫应答^[91-92]. 同样, 来自坏死性肿瘤细胞的 DAMP 引起强烈抗肿瘤 CD8⁺ T 细胞的表达^[93]. 还有证据表明, NKT 细胞参与 RIPK3 介导的抗肿瘤免疫应答, 因为 RIPK3 的缺失损害了 NKT 细胞对肿瘤的活化^[94]. 这些研究结果都表明坏死性凋亡

能抑制肿瘤发生发展。

而另一方面, 坏死性凋亡也能通过多种机制促进肿瘤发生发展和转移. 肿瘤细胞发生转移是导致癌症病人死亡的主要原因, 转移是指个体肿瘤细胞通过循环系统定居到其他远距离器官继续生长. 最近的研究表明, 肿瘤细胞通过内皮的外渗是转移性扩散的重要步骤, 肿瘤细胞通过激活死亡受体家族的另一成员死亡受体6 (由TNFRSF21编码的DR6) 诱导内皮细胞的坏死性凋亡, 从而促进肿瘤细胞外渗和转移. 用Nec-1治疗小鼠或内皮细胞特异性敲除RIPK3或MLKL的小鼠, 观察到肿瘤细胞诱导的内皮细胞坏死性凋亡减少, 从而减少肿瘤细胞外渗和转移. 因此阻断内皮细胞的坏死性凋亡可能是一种潜在的抑制肿瘤细胞转移的临床治疗方法^[95]. 转移涉及癌细胞与肿瘤相关微环境复杂的相互作用, 包括免疫细胞的浸润和细胞因子的分泌. 已有研究证明, 在胰腺导管腺癌中(PDA), 当RIPK3敲除的肿瘤细胞发生坏死性凋亡时, 释放的可溶性细胞因子与炎症细胞上的受体相结合, 如SAP130与其同源受体Mincle相结合, 从而引发免疫抑制性肿瘤微环境并促进胰腺导管腺癌的进展^[96]. 此外, 最近另外一项研究通过使用磷酸化MLKL特异性抗体检测乳腺癌MMVT-PyMT小鼠模型中的肿瘤坏死性凋亡^[97]. 他们发现在肿瘤坏死区域普遍存在坏死性凋亡, 并且在乳腺癌晚期, MLKL的磷酸化水平升高. 虽然野生型和MLKL缺陷肿瘤以相似的速率生长, 但MLKL敲除的小鼠模型中显著抑制乳腺癌细胞发生肺转移, 表明肿瘤细胞中MLKL介导的坏死性凋亡促进了乳腺癌的肺转移. 由于坏死性凋亡是促炎性细胞死亡, MLKL敲除的肿瘤微环境中巨噬细胞炎性细胞因子的产生显著减少, 表明坏死性凋亡引起的炎症反应可能导致乳腺癌的转移^[97]. 总的来说, 这些研究表明, 肿瘤坏死性凋亡在体内发生, 并通过引发促肿瘤免疫微环境而表现出促肿瘤作用.

由坏死性凋亡诱导的炎性微环境不仅有利于肿瘤进展, 而且还指导肿瘤发展过程中的谱系定型. 最近的一项研究表明, 坏死性凋亡还可影响肝细胞肝癌和肝内胆管细胞癌的相互转化. 随着癌基因的激活, 坏死作用主导肝脏微环境诱导肝细胞向肝内胆管细胞癌(ICC)发展, 而凋亡微环境诱导肝细胞向肝细胞肝癌(HCC)发展. 在这种情况下, Tbx3和Prdm5是主要的微环境依赖和表观遗传学调控的谱系决定因子^[98].

2.5 坏死性凋亡和缺血性疾病

RIPK1介导的坏死性凋亡也与缺血性疾病相关, RIPK1激酶抑制剂(Nec-1)已被证实对于缺血再灌注损伤(IRI)的临床模型中有保护作用^[5]. 在这项研究中, Nec-1治疗减少了脑内缺血再灌注损伤(IRI)后的梗死面积. 类似地, 抑制坏死性凋亡途径可以改善肾脏和心脏缺血再灌注损伤. 此外, 坏死性凋亡已被证明参与心脏相关疾病的过程, 例如血管动脉粥样硬化、缺血再灌注损伤、心肌梗塞和心脏重塑^[57]. 动物模型已经显示RIPK3缺陷小鼠对遗传易感动物的动脉粥样硬化进展更具抵抗力, 该缺陷型小鼠发生坏死病变区域减少并有较低的促炎细胞因子表达^[99].

器官移植是某些疾病终末状态下最佳的治疗选择, 而移植总是与缺血性再灌注损伤(IRI)、炎症和排斥有关^[100]. 已有研究表明, 抑制Caspase-8活性, 相关的细胞凋亡受到抑制但是却增强了坏死性凋亡且降低了肾同种异体移植物的存活率, 而使用RIPK1激酶抑制剂Nec-1或RIPK3缺失的同种异体移植则具有更高的肾功能及移植成功率, 因此在灌注液中加入抑制坏死性凋亡的药物或许可以提高器官的存活率及器官移植的成功率^[101]. 这些观察结果表明, 抑制坏死性凋亡可能是减少梗塞或移植期间缺氧引起器官损伤的有效方法. 靶向坏死样凋亡信号转导途径具有重要的药理学意义, 开发针对坏死性凋亡的药物或许可以减轻缺血再灌注损伤对组织器官造成的损害并可提高组织器官移植的存活率.

3 结论与展望

程序性细胞死亡是由细胞内信号转导程序介导的细胞主动死亡方式. 当机体内环境受到破坏时, 程序性细胞死亡用来平衡正常细胞与损伤细胞的比例以维持机体内环境的稳态. 过去认为细胞凋亡是程序性细胞死亡的主要形式, 而随着对程序性细胞死亡认识的深入, 人们发现程序性细胞死亡还包括坏死性凋亡、自噬性细胞死亡、细胞焦亡以及铁死亡等多种细胞死亡方式.

细胞凋亡和坏死性凋亡是机体调控细胞死亡的重要方式, 在体内受到严格的调控. 从最初对坏死性凋亡的描述到现在对它潜在机制的研究及其在疾病中重要性的了解不到20年的时间^[21]. 在这20年的时间中, 我们了解到的凋亡以及坏死性凋亡是由相同的刺激触发的, 例如死亡受体配体的结合、

Table 1 Necroptosis and related diseases

表1 坏死性凋亡与相关疾病

疾病	研究结果	参考文献
炎症相关性疾病		
自发性肠炎	在小鼠的肠上皮细胞中特异性敲除FADD或Caspase-8后诱发细胞坏死和自发性肠炎. 若将 RIPK3基因一同敲除, 则可抑制由FADD或Caspase-8敲除所诱发的肠上皮细胞坏死以及自发性肠炎.	[62-64]
系统性炎症反应综合征	RIPK1敲除的小鼠由于系统性炎症反应综合征, 在出生后3天即死亡, 若将 RIPK3或MLKL同时敲除可抑制死亡.	[35, 61]
皮肤炎症	小鼠皮肤特异性敲除RIPK1后诱发角质形成细胞坏死和严重的皮肤炎症, 而进一步敲除 RIPK3或MLKL后则抑制皮肤细胞坏死和皮肤炎症.	[37]
炎症性肠病	小儿肠炎患者的肠道组织中RIPK3和MLKL表达水平升高, 而Caspase-8表达水平降低.	[67]
感染相关性疾病		
人类单纯疱疹病毒感染	HSV编码抗凋亡病毒蛋白通过抑制Caspases的活性而抑制宿主细胞凋亡, 此时宿主细胞通过启动坏死性凋亡信号途径而抑制HSV在体内的复制.	[69]
小鼠巨细胞病毒感染	小鼠CMV编码含RHIM结构域的病毒蛋白 (vIRA), 该蛋白通过RHIM结构域参与RIPK1和 RIPK3的相互作用而直接抑制宿主细胞坏死性凋亡.	[72]
人类巨细胞病毒感染	人类CMV病毒中通过表达IE1基因阻断MLKL的激活而抑制宿主细胞坏死性凋亡	[73]
退行性疾病		
肌萎缩侧索硬化症	在小鼠中通过抑制RIPK1激酶活性或敲除RIPK3基因抑制少突胶质细胞死亡以及小胶质细胞炎症和轴突变性.	[74-76]
阿尔茨海默病	人阿尔茨海默病大脑中观察到坏死性凋亡标志物RIPK1和MLKL的表达增加; 使用RIPK1 激酶抑制剂Nec-1s 降低了AD小鼠模型中的A β 含量, 并且降低了炎性细胞因子水平 and 记忆缺陷.	[58] [75, 78, 79]
创伤性脑损伤	RIPK1激酶抑制剂Nec-1可减轻小鼠动物模型创伤性脑损伤后的细胞死亡和脑组织损伤.	[5]
肿瘤		
急性髓性白血病、慢性淋巴细胞白血病、卵巢癌、乳腺癌、结直肠癌	肿瘤组织中RIPK3表达下调, 患者预后较差	[80-84]
胃癌、胰腺癌、卵巢癌、宫颈鳞癌、结肠癌	肿瘤组织中MLKL表达下调与患者预后较差相关	[83, 85-89]
慢性淋巴细胞白血病	肿瘤组织中去泛素化酶CYLD表达下调	[90]
缺血相关性疾病		
缺血再灌注损伤	RIPK1激酶抑制剂Nec-1可减少小鼠脑内缺血再灌注损伤后的梗死面积 抑制坏死性凋亡可以改善肾脏和心脏缺血再灌注损伤. 在遗传性小鼠动脉粥样硬化模型中, RIPK3基因敲除可减少小鼠的坏死病变区域及炎症反应程度.	[5] [57] [99]

DNA 损伤、感染以及肿瘤. 此外, 凋亡以及坏死性凋亡的信号传导途径也是高度相关的. 例如当细胞凋亡通路受阻时, 坏死性凋亡被诱导. 因为

Caspases 通过切割坏死性凋亡信号转导的两个关键组分 RIPK1 和 RIPK3 来负调节坏死性凋亡, 此时坏死性凋亡可作为细胞死亡的替代方式来调节机体

内环境的稳态. 此外, 由于肿瘤细胞凋亡途径往往被抑制, 此时坏死性凋亡可作为凋亡的替代形式参与杀死癌细胞. 因此, 人们认为可将诱发肿瘤细胞发生坏死性凋亡作为治疗策略. 但是如何通过药理学手段选择性地启动肿瘤细胞中的坏死性凋亡, 同时避免非肿瘤细胞发生损害这一难题仍有待进一步研究. 总而言之, 坏死性凋亡几乎涉及机体生长发育过程中的各种病理状况, 因此剖析其发生的具体分子机制, 将为后续治疗提供更好的方法.

除了凋亡和坏死性凋亡, 自噬性细胞死亡

(autophagic cell death, ACD) 也是程序性细胞死亡的一种特殊形式, 历史上称为II型程序性细胞死亡^[102]. 自噬细胞死亡的执行取决于细胞内部的自噬机制. 当自噬不受控制或过度激活时, 就会发生自噬细胞死亡. 在机体中, 一种刺激或者疾病往往引起多种形式的程序性细胞死亡, 因此未来对于研究凋亡性坏死和其他形式程序性细胞死亡的相互联系将为深入研究细胞死亡在各种疾病的发病机制中的作用打下理论基础, 并将为开发相关分子靶点的药物提供有价值的线索和手段.

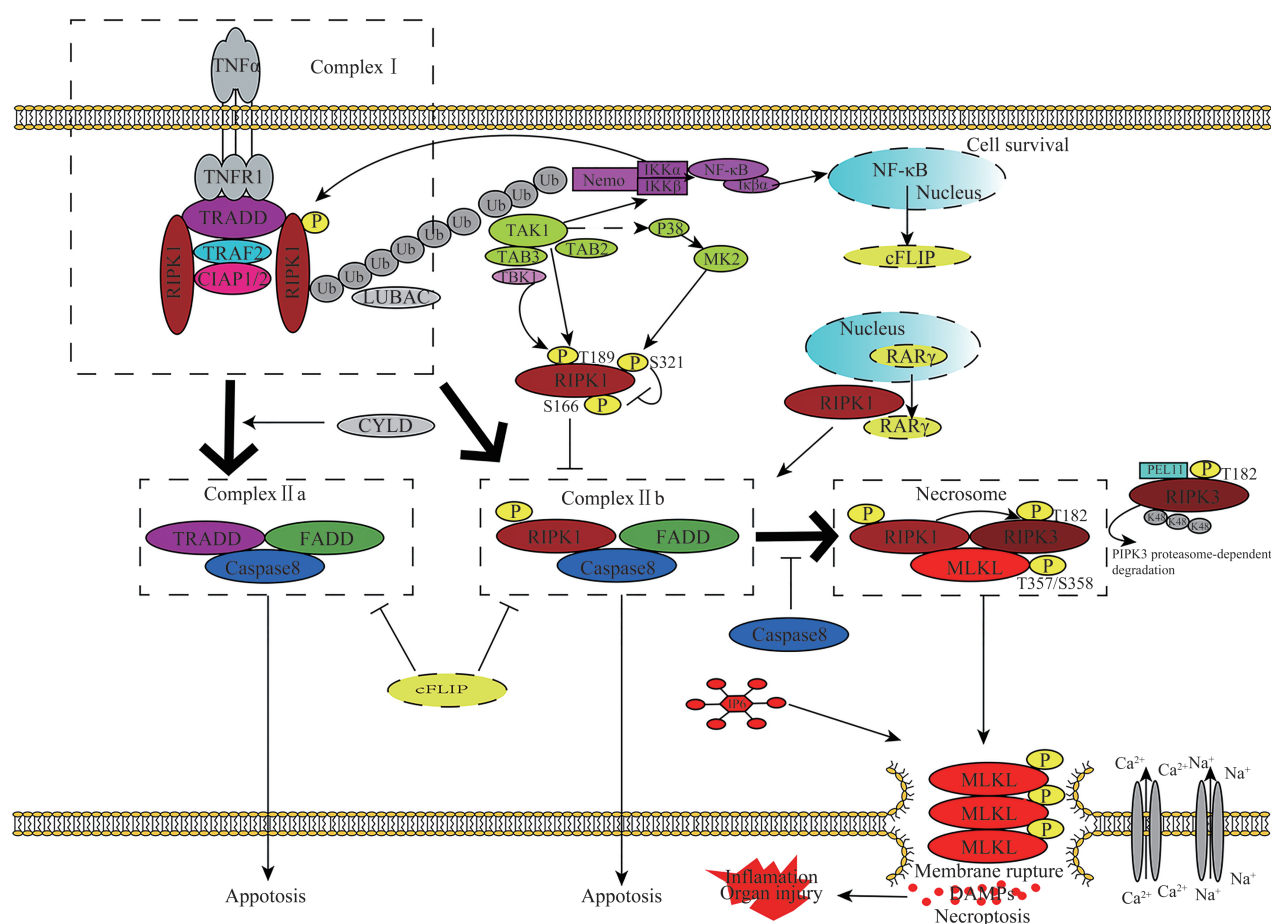


Fig. 1 TNF- α -induced necroptosis signaling pathway

图1 TNF- α 诱导的坏死性凋亡信号通路

TNF α 通过与细胞膜表面的TNF α 受体结合, 募集支架蛋白TRADD, TRAF2, 激酶RIPK1和cIAP1/2, 形成质膜相关复合物I. 随后, cIAP将各种类型的泛素化链连接到复合物I上, 从而将激酶复合物TAK1/TAB2/TAB3和LUBAC募集到复合物I上. LUBAC介导复合物I不同成分的线性泛素化可稳定复合物I并促进IKK β 依赖的TAK1的活化. 然后, IKK β 使复合物I中RIPK1磷酸化, 从而阻止RIPK1与复合物I分离并抑制下游细胞死亡信号转导. 另外, IKK β 激活NF- κ B途径, 诱导包括cFLIP在内的生存蛋白的表达. cFLIP通过与caspase 8相互作用来阻止caspase 8激活. 一旦cFLIP表达被抑制, caspase 8就会通过自催化过程被激活. 在这种情况下, caspase 8介导的细胞凋亡不需要RIPK1. 死亡信号复合体被称为复合体IIa. 此外, 复合物I中RIPK1或其他成分的泛素化对于稳定复合物I以及防止复合物II的形成至关重要.

如果NF- κ B信号通路被抑制, 则RIPK1与FADD和caspase 8结合, 启动细胞凋亡. 该死亡信号复合物称为复合物IIb. 当caspase 8激活被抑制, RIPK1与RIPK3相互作用激活RIPK3. RIPK3随后磷酸化MLKL并诱导其寡聚化和质膜易位, 从而引发坏死性凋亡.

参 考 文 献

- [1] Grootjans S, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Initiation and execution mechanisms of necroptosis: an overview. *Cell Death and Differentiation*. 2017, **24**(7): 1184-1195
- [2] Grilo A L, Mantalaris A. Apoptosis: a mammalian cell bioprocessing perspective. *Biotechnol Adv*. 2019, **37**(3): 459-475
- [3] Kaczmarek A, Vandenabeele P, Krysko D V. Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity*. 2013, **38**(2): 209-223
- [4] Hitomi J, Christofferson D E, Ng A, *et al*. Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell*. 2008, **135**(7): 1311-1323
- [5] Degterev A, Huang Z, Boyce M, *et al*. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature Chemical Biology*. 2005, **1**(2): 112-119
- [6] Cai Z, Liu Z G. Execution of RIPK3-regulated necrosis. *Mol Cell Oncol*. 2014, **1**(2): e960759
- [7] Holler N, Zaru R, Micheau O, *et al*. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol*. 2000, **1**(6): 489-495
- [8] Galluzzi L, Kepp O, Chan F K, *et al*. Necroptosis: mechanisms and relevance to disease. *Annual Review of Pathology*. 2017, **12**: 103-130
- [9] Hayden M S, Ghosh S. Regulation of NF- κ B by TNF family cytokines. *Seminars in Immunology*. 2014, **26**(3): 253-266
- [10] Wong W W, Gentle I E, Nachbur U, *et al*. RIPK1 is not essential for TNFR1-induced activation of NF- κ B. *Cell Death & Differentiation*. 2010, **17**(3): 482-487
- [11] Dondelinger Y, Darding M, Bertrand M J M, *et al*. Polyubiquitination in TNFR1-mediated necroptosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2016, **73**(11-12): 2165-2176
- [12] Draber P, Kupka S, Reichert M, *et al*. LUBAC-recruited CYLD and A20 regulate gene activation and cell death by exerting opposing effects on linear ubiquitin in signaling complexes. *Cell Reports*. 2015, **13**(10): 2258-2272
- [13] Dynek J N, Goncharov T, Dueber E C, *et al*. c-IAP1 and UbcH5 promote K11-linked polyubiquitination of RIP1 in TNF signalling. *The EMBO Journal*. 2010, **29**(24): 4198-4209
- [14] Newton K, Matsumoto M L, Wertz I E, *et al*. Ubiquitin chain editing revealed by polyubiquitin linkage-specific antibodies. *Cell*. 2008, **134**(4): 668-678
- [15] Witt A, Vucic D. Diverse ubiquitin linkages regulate RIP kinases-mediated inflammatory and cell death signaling. *Cell Death and Differentiation*. 2017, **24**(7): 1160-1171
- [16] Annibaldi A, Meier P. Checkpoints in TNF-induced cell death: implications in inflammation and cancer. *Trends in Molecular Medicine*. 2018, **24**(1): 49-65
- [17] Hadian K, Griesbach R A, Dornauer S, *et al*. NF- κ B essential modulator (NEMO) interaction with linear and Lys-63 ubiquitin chains contributes to NF- κ B activation. *Journal of Biological Chemistry*. 2011, **286**(29): 26107-26117
- [18] Ting A T, Bertrand M J M. More to life than NF- κ B in TNFR1 signaling. *Trends in Immunology*. 2016, **37**(8): 535-545
- [19] Lafont E, Draber P, Rieser E, *et al*. TBK1 and IKK ϵ prevent TNF-induced cell death by RIPK1 phosphorylation. *Nature Cell Biology*. 2018, **20**(12): 1389-1399
- [20] Dillon C P, Oberst A, Weinlich R, *et al*. Survival function of the FADD-CASPASE-8-cFLIP(L) complex. *Cell Reports*. 2012, **1**(5): 401-407
- [21] Chan F K, Luz N F, Moriwaki K. Programmed necrosis in the cross talk of cell death and inflammation. *Annual Review of Immunology*. 2015, **33**(1): 79-106
- [22] Blackwell K, Zhang L, Workman L M, *et al*. Two coordinated mechanisms underlie tumor necrosis factor alpha-induced immediate and delayed I B kinase activation. *Molecular and Cellular Biology*. 2013, **33**(10): 1901-1915
- [23] Kreuz S, Siegmund D, Scheurich P, *et al*. NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Molecular and Cellular Biology*. 2001, **21**(12): 3964-3973
- [24] Oberst A, Dillon C P, Weinlich R, *et al*. Catalytic activity of the caspase-8 - FLIPL complex inhibits RIPK3-dependent necrosis. *Nature*. 2011, **471**(7338): 363-367
- [25] Kaiser W J, Upton J W, Long A B, *et al*. RIP3 mediates the embryonic lethality of caspase-8-deficient mice. *Nature*. 2011, **471**(7338): 368-372
- [26] Murphy J M, Czabotar P E, Hildebrand J M, *et al*. The pseudokinase MLKL mediates necroptosis via a molecular switch mechanism. *Immunity*. 2013, **39**(3): 443-453
- [27] Dondelinger Y, Declercq W, Montessuit S, *et al*. MLKL compromises plasma membrane integrity by binding to phosphatidylinositol phosphates. *Cell Reports*. 2014, **7**(4): 971-981
- [28] Chen X, Li W, Ren J, *et al*. Translocation of mixed lineage kinase domain-like protein to plasma membrane leads to necrotic cell death. *Cell Research*. 2014, **24**(1): 105-121
- [29] Cai Z, Jitkaew S, Zhao J, *et al*. Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis. *Nature Cell Biology*. 2014, **16**(1): 55-65
- [30] Wang H, Sun L, Su L, *et al*. Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3. *Mol Cell*. 2014, **54**(1): 133-146
- [31] Chen X, Li W, Ren J, *et al*. Translocation of mixed lineage kinase domain-like protein to plasma membrane leads to necrotic cell death. *Cell Res*. 2014, **24**(1): 105-121
- [32] Dondelinger Y, Declercq W, Montessuit S, *et al*. MLKL compromises plasma membrane integrity by binding to phosphatidylinositol phosphates. *Cell Reports*. 2014, **7**(4): 971-981
- [33] Quarato G, Guy C S, Grace C R, *et al*. Sequential engagement of distinct MLKL phosphatidylinositol-binding sites executes necroptosis. *Molecular Cell*. 2016, **61**(4): 589-601
- [34] Rickard J A, O Donnell J A, Evans J M, *et al*. RIPK1 regulates

- RIPK3-MLKL-driven systemic inflammation and emergency hematopoiesis. *Cell*. 2014, **157**(5): 1175-1188
- [35] Dillon C P, Weinlich R, Rodriguez D A, *et al.* RIPK1 blocks early postnatal lethality mediated by Caspase-8 and RIPK3. *Cell*. 2014, **157**(5): 1189-1202
- [36] Kaiser W J, Daley-Bauer L P, Thapa R J, *et al.* RIP1 suppresses innate immune necrotic as well as apoptotic cell death during mammalian parturition. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014, **111**(21): 7753-7758
- [37] Dannappel M, Vlantis K, Kumari S, *et al.* RIPK1 maintains epithelial homeostasis by inhibiting apoptosis and necroptosis. *Nature*. 2014, **513**(7516): 90-94
- [38] Takahashi N, Vereecke L, Bertrand M J M, *et al.* RIPK1 ensures intestinal homeostasis by protecting the epithelium against apoptosis. *Nature*. 2014, **513**(7516): 95-99
- [39] Oberst A, Dillon C P, Weinlich R, *et al.* Catalytic activity of the caspase-8 – FLIPL complex inhibits RIPK3-dependent necrosis. *Nature*. 2011, **471**(7338): 363-367
- [40] Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis *via* two sequential signaling complexes. *Cell*. 2003, **114**(2): 181-190
- [41] Ea C, Deng L, Xia Z, *et al.* Activation of IKK by TNF α requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Molecular Cell*. 2006, **22**(2): 245-257
- [42] Xu D, Jin T, Zhu H, *et al.* TBK1 suppresses RIPK1-driven apoptosis and inflammation during development and in aging. *Cell*. 2018, **174**(6): 1477-1491
- [43] Geng J, Ito Y, Shi L, *et al.* Regulation of RIPK1 activation by TAK1-mediated phosphorylation dictates apoptosis and necroptosis. *Nature Communications*. 2017, **8**(1): 359
- [44] Dondelinger Y, Jouan-Lanhout S, Divert T, *et al.* NF- κ B-independent role of IKK α /IKK β in preventing RIPK1 kinase-dependent apoptotic and necroptotic cell death during TNF signaling. *Molecular Cell*. 2015, **60**(1): 63-76
- [45] Cargnello M, Roux P P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2011, **75**(1): 50-83
- [46] Dondelinger Y, Delanghe T, Rojas-Rivera D, *et al.* MK2 phosphorylation of RIPK1 regulates TNF-mediated cell death. *Nature Cell Biology*. 2017, **19**(10): 1237-1247
- [47] Jaco I, Annibaldi A, Lalaoui N, *et al.* MK2 phosphorylates RIPK1 to prevent TNF-induced cell death. *Molecular Cell*. 2017, **66**(5): 698-710
- [48] Menon M B, Gropengießer J, Fischer J, *et al.* p38MAPK/MK2-dependent phosphorylation controls cytotoxic RIPK1 signalling in inflammation and infection. *Nature Cell Biology*. 2017, **19**(10): 1248-1259
- [49] Xu Q, Jitkaew S, Choksi S, *et al.* The cytoplasmic nuclear receptor RAR γ controls RIP1 initiated cell death when cIAP activity is inhibited. *Nature Communications*. 2017, **8**(1): 425
- [50] Choi S, Park H, Kim S, *et al.* PELI1 selectively targets kinase-active RIP3 for ubiquitylation-dependent proteasomal degradation. *Molecular Cell*. 2018, **70**(5): 920-935
- [51] Dovey C M, Diep J, Clarke B P, *et al.* MLKL requires the inositol phosphate code to execute necroptosis. *Molecular Cell*. 2018, **70**(5): 936-948
- [52] Kerr J F, Wyllie A H, Currie A R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*. 1972, **26**(4): 239-257
- [53] Green D R. The cell's dilemma, or the story of cell death: an entertainment in three acts. *The FEBS Journal*. 2016, **283**(14): 2568-2576
- [54] Shan B, Pan H, Najafov A, *et al.* Necroptosis in development and diseases. *Genes Dev*. 2018, **32**(5-6): 327-340
- [55] Weinlich R, Oberst A, Beere H M, *et al.* Necroptosis in development, inflammation and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2017, **18**(2): 127-136
- [56] Qin X, Ma D, Tan Y, *et al.* The role of necroptosis in cancer: a double-edged sword? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2019, **1871**(2): 259-266
- [57] Gupta K, Phan N, Wang Q, *et al.* Necroptosis in cardiovascular disease - a new therapeutic target. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2018, **118**: 26-35
- [58] Ofengeim D, Ito Y, Najafov A, *et al.* Activation of necroptosis in multiple sclerosis. *Cell Reports*. 2015, **10**(11): 1836-1849
- [59] Meng L, Jin W, Wang X. RIP3-mediated necrotic cell death accelerates systematic inflammation and mortality. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015, **112**(35): 11007-11012
- [60] Zhou H, Li D, Zhu P, *et al.* Inhibitory effect of melatonin on necroptosis *via* repressing the Ripk3-PGAM5-CypD-mPTP pathway attenuates cardiac microvascular ischemia-reperfusion injury. *Journal of Pineal Research*. 2018, **65**(3): e12503
- [61] Kelliher M A, Grimm S, Ishida Y, *et al.* The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal. *Immunity*. 1998, **8**(3): 297-303
- [62] Welz P, Wullaert A, Vlantis K, *et al.* FADD prevents RIP3-mediated epithelial cell necrosis and chronic intestinal inflammation. *Nature*. 2011, **477**(7364): 330-334
- [63] Günther C, Martini E, Wittkopf N, *et al.* Caspase-8 regulates TNF- α -induced epithelial necroptosis and terminal ileitis. *Nature*. 2011, **477**(7364): 335-339
- [64] Weinlich R, Oberst A, Dillon C P, *et al.* Protective roles for Caspase-8 and cFLIP in adult homeostasis. *Cell Reports*. 2013, **5**(2): 340-348
- [65] He S, Wang X. RIP kinases as modulators of inflammation and immunity. *Nature Immunology*. 2018, **19**(9): 912-922
- [66] Moerke C, Bleibaum F, Kunzendorf U, *et al.* Combined knockout of RIPK3 and MLKL reveals unexpected outcome in tissue injury and inflammation. *Front Cell Dev Biol*. 2019, **7**: 19
- [67] Pierdomenico M, Negroni A, Stronati L, *et al.* Necroptosis is active in children with inflammatory bowel disease and contributes to heighten intestinal inflammation. *The American Journal of Gastroenterology*. 2014, **109**(2): 279-287
- [68] Li M, Beg A A. Induction of necrotic-like cell death by tumor

- necrosis factor alpha and caspase inhibitors: novel mechanism for killing virus-infected cells. *Journal of Virology*. 2000, **74**(16): 7470-7477
- [69] Yu X, He S. The interplay between human herpes simplex virus infection and the apoptosis and necroptosis cell death pathways. *Virology Journal*. 2016, **13**: 77
- [70] Mocarski E S, Guo H, Kaiser W J. Necroptosis: the trojan horse in cell autonomous antiviral host defense. *Virology*. 2015, **479-480**: 160-166
- [71] Orzalli M H, Kagan J C. Apoptosis and necroptosis as host defense strategies to prevent viral infection. *Trends in Cell Biology*. 2017, **27**(11): 800-809
- [72] Upton J W, Kaiser W J, Mocarski E S. Cytomegalovirus M45 cell death suppression requires receptor-interacting protein (RIP) homotypic interaction motif (RHIM)-dependent interaction with RIP1. *J Biol Chem*. 2008, **283**(25): 16966-16970
- [73] Omoto S, Guo H, Talekar G R, *et al*. Suppression of RIP3-dependent necroptosis by human cytomegalovirus. *Journal of Biological Chemistry*. 2015, **290**(18): 11635-11648
- [74] Caccamo A, Branca C, Piras I S, *et al*. Necroptosis activation in Alzheimer's disease. *Nature Neuroscience*. 2017, **20**(9): 1236-1246
- [75] Re D B, Le Verche V, Yu C, *et al*. Necroptosis drives motor neuron death in models of both sporadic and familial ALS. *Neuron*. 2014, **81**(5): 1001-1008
- [76] Ito Y, Ofengeim D, Najafov A, *et al*. RIPK1 mediates axonal degeneration by promoting inflammation and necroptosis in ALS. *Science*. 2016, **353**(6299): 603-608
- [77] Re D B, Le Verche V, Yu C, *et al*. Necroptosis drives motor neuron death in models of both sporadic and familial ALS[J]. *Neuron*. 2014, **81**(5): 1001-1008
- [78] Ofengeim D, Mazzitelli S, Ito Y, *et al*. RIPK1 mediates a disease-associated microglial response in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017, **114**(41): E8788-E8797
- [79] Yuan J, Amin P, Ofengeim D. Necroptosis and RIPK1-mediated neuroinflammation in CNS diseases. *Nature Reviews Neuroscience*. 2019, **20**(1): 19-33
- [80] Koo G, Morgan M J, Lee D, *et al*. Methylation-dependent loss of RIP3 expression in cancer represses programmed necrosis in response to chemotherapeutics. *Cell Research*. 2015, **25**(6): 707-725
- [81] Nugues A, El Bouazzati H, Hétiuin D, *et al*. RIP3 is downregulated in human myeloid leukemia cells and modulates apoptosis and caspase-mediated p65/RelA cleavage. *Cell Death & Disease*. 2014, **5**(8): e1384
- [82] Höckendorf U, Yabal M, Herold T, *et al*. RIPK3 restricts myeloid leukemogenesis by promoting cell death and differentiation of leukemia initiating Cells. *Cancer Cell*. 2016, **30**(1): 75-91
- [83] Bozec D, Iuga A C, Roda G, *et al*. Critical function of the necroptosis adaptor RIPK3 in protecting from intestinal tumorigenesis. *Oncotarget*. 2016, **7**(29): 46384-46400
- [84] McCabe K E, Bacos K, Lu D, *et al*. Triggering necroptosis in cisplatin and IAP antagonist-resistant ovarian carcinoma. *Cell Death & Disease*. 2014, **5**(10): e1496
- [85] Li X, Guo J, Ding A, *et al*. Association of mixed lineage kinase domain-like protein expression with prognosis in patients with colon cancer. *Technology in Cancer Research & Treatment*. 2016, **16**(4): 428-434
- [86] Ertao Z, Jianhui C, Kang W, *et al*. Prognostic value of mixed lineage kinase domain-like protein expression in the survival of patients with gastric cancer. *Tumor Biology*. 2016, **37**(10): 13679-13685
- [87] Colbert L E, Fisher S B, Hardy C W, *et al*. Pronecrotic mixed lineage kinase domain-like protein expression is a prognostic biomarker in patients with early-stage resected pancreatic adenocarcinoma. *Cancer*. 2013, **119**(17): 3148-3155
- [88] Ruan J, Mei L, Zhu Q, *et al*. Mixed lineage kinase domain-like protein is a prognostic biomarker for cervical squamous cell cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2015, **8**(11): 15035-15038
- [89] Liu X, Zhou M, Mei L, *et al*. Key roles of necroptotic factors in promoting tumor growth. *Oncotarget*. 2016, **7**(16): 22219-22233
- [90] Liu P, Xu B, Shen W, *et al*. Dysregulation of TNF α -induced necroptotic signaling in chronic lymphocytic leukemia: suppression of CYLD gene by LEF1. *Leukemia*. 2012, **26**(6): 1293-1300
- [91] Schmidt S V, Seibert S, Walch-Ruckheim B, *et al*. RIPK3 expression in cervical cancer cells is required for PolyIC-induced necroptosis, IL-1 α release, and efficient paracrine dendritic cell activation. *Oncotarget*. 2015, **6**(11): 8635-8647
- [92] Takemura R, Takaki H, Okada S, *et al*. PolyI: C-induced, TLR3/RIP3-dependent necroptosis backs up immune effector-mediated tumor elimination *in vivo*. *Cancer Immunol Res*. 2015, **3**(8): 902-914
- [93] Yatim N, Jusforgues-Saklani H, Orozco S, *et al*. RIPK1 and NF-kappaB signaling in dying cells determines cross-priming of CD8 (+) T cells. *Science*. 2015, **350**(6258): 328-334
- [94] Kang Y J, Bang B R, Han K H, *et al*. Regulation of NKT cell-mediated immune responses to tumours and liver inflammation by mitochondrial PGAM5-Drp1 signalling. *Nat Commun*. 2015, **6**: 8371
- [95] Strilic B, Yang L, Albarrán-Juárez J, *et al*. Tumour-cell-induced endothelial cell necroptosis *via* death receptor 6 promotes metastasis. *Nature*. 2016, **536**(7615): 215-218
- [96] Seifert L, Werba G, Tiwari S, *et al*. The necrosome promotes pancreatic oncogenesis *via* CXCL1 and Mincle-induced immune suppression. *Nature*. 2016, **532**(7598): 245-249
- [97] Jiao D, Cai Z, Choksi S, *et al*. Necroptosis of tumor cells leads to tumor necrosis and promotes tumor metastasis. *Cell Res*. 2018, **28**(8): 868-870
- [98] Seehawer M, Heinzmann F, D Artista L, *et al*. Necroptosis microenvironment directs lineage commitment in liver cancer. *Nature*. 2018, **562**(7725): 69-75
- [99] Coornaert I, Hofmans S, Devisscher L, *et al*. Novel drug discovery

- strategies for atherosclerosis that target necrosis and necroptosis. *Expert Opin Drug Discov.* 2018, **13**(6): 477-488
- [100] Linkermann A, Hackl M J, Kunzendorf U, *et al.* Necroptosis in immunity and ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Transplantation.* 2013, **13**(11): 2797-2804
- [101] Linkermann A, Brasen J H, Himmerkus N, *et al.* Rip1 (receptor-interacting protein kinase 1) mediates necroptosis and contributes to renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int.* 2012, **81**(8): 751-761
- [102] Bursch W, Ellinger A, Gerner C, *et al.* Programmed cell death (PCD). Apoptosis, autophagic PCD, or others? *Ann NY Acad Sci.* 2000, 926: 1-12

Research Progress In Necroptosis*

SHI Shen-Nan¹⁾, QIN Xia^{2,3)}, WANG Hong-Yang^{1,2,3)**}, CAI Zhen-Yu^{1,2,3)**}

¹⁾Department of Cancer Institute, Fudan University Shanghai Cancer Center, Department of Oncology,
Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China;

²⁾National Center for Liver Cancer, Shanghai 201805, China;

³⁾The International Cooperation Laboratory on Signal Transduction, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital,
Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

Abstract Programmed cell death is critical for maintenance cellular organisms homeostasis. Necroptosis is a recently identified mode of programmed cell death that morphologically similar to necrosis. Necroptosis is mediated by receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3 (RIPK3) and its substrate mixed lineage kinase domain-like protein(MLKL). It has been shown that necroptosis is related to several human diseases, such as inflammatory diseases, autoimmune diseases, tumors and degenerative diseases. In this review, we will discuss the molecular mechanisms of necroptosis and its associated diseases.

Key words programmed cell death, necroptosis, inflammation, RIPK3, MLKL

DOI: 10.16476/j.pibb.2019.0209

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (81773075) and Shanghai International Cooperation and Exchange Project (18410720600) .

** Corresponding author. Tel: 86-21-81888141

CAI Zhen-Yu. E-mail: draizhenyu@126.com

WANG Hong-Yang. E-mail: hywangk@vip.sina.com

Received: October 25, 2019 Accepted: June 17, 2020