评述

RIP3 蛋白的研究进展

任建鸿, 朱军*, 郑文, 谢彦, 宋玉琴, 应志涛, 张晨

北京大学临床肿瘤学院, 北京肿瘤医院暨北京市肿瘤防治研究所淋巴瘤科, 恶性肿瘤发病机制及转化研究教育部重点实验室, 北京 100142

* 联系人, E-mail: zj@bjcancer.org

收稿日期: 2011-05-30; 接受日期: 2011-08-18

doi: 10.1360/052011-224

摘要 受体相互作用蛋白-3 是丝/苏氨酸蛋白激酶家族成员(RIPs)之一, 该蛋白家族作为细胞重要应激传感分子, 在调控细胞存活、细胞凋亡和细胞坏死通路中发挥重要作用. 近年研究发现, RIP3 参与肿瘤坏死因子 TNF- α 诱导的细胞程序性坏死生物学过程, 是 TNF- α 诱导的细胞凋亡与坏死不同死亡途径转换的关键开关分子. 本文就 RIP3 分子的发现、结构特点、细胞亚定位、生理功能及其分子机制进行综述, 并对 RIP3 分子的研究进行了展望.

关键词受体相互作用蛋白-3
活性氧
坏死

受体相互作用蛋白家族(receptor-interacting proteins, RIPs)是蛋白激酶家族的一个重要分支, 其功能上具有特异的丝氨酸(Ser)/苏氨酸(Thr)激酶活性, 属于 Ser/Thr 蛋白激酶家族. 目前, 对该家族成员了解较多的有 RIP1~RIP7(图 1)^[1], 其中研究较多的有 RIP1, RIP2, RIP3, RIP4^[2~7]. 它们广泛地表达于机体各种组织中, 在结构上同源性较高, 在 N 末端(N-terminal)都含有一个高度保守的激酶结构域^[8,9], C 末端(C-terminal)功能域却不完全一样. 正是由于这种结构特点, 该家族成员在功能上有一定的相似特征但又不尽相同. 机体细胞所处的生存环境总会存在各种不同的外界刺激^[10], 如细胞因子刺激、病原微生物感染、DNA 损伤或者炎症反应等, 这些刺激都会使细胞处于应激状态从而活化细胞内外信号转导通路, 导致细胞活化与死亡^[11]. 该家族成员作为一个细胞内外应激信号转导必需的感受器, 在炎症、免疫应答、DNA 损伤以及诱导性细胞活化与死亡等过程中发挥着极其重要的作用^[11]. 但是, RIPs 家族的不同成员在不同的信号转导通路中发挥的作用也不完全相

同, 有些甚至相反. 有的成员能激活转录因子, 如 AP-1 和 NF- κ B^[12], 上调下游一系列抗凋亡基因, 对细胞起到一定的保护作用; 也有些成员在激活后能促进死亡信号的转导^[13]. RIP3 是 RIPs 家族中研究得较为深入的成员之一. 最近研究发现, RIP3 不仅能够诱导细胞凋亡, 在细胞程序性坏死(programmed necrosis)过程中也发挥着极其重要的作用, 并且是细胞凋亡与细胞坏死相互转换的关键调节蛋白. 本文将对 RIP3 的研究现状做一综述.

1 RIP3 简介

RIP3 全称为受体相互作用丝氨酸-苏氨酸激酶 3 (receptor-interacting serine-threonine kinase 3), ORF 区全长 1557 bp, 编码 518 个氨基酸, 分子量为 56.8 kD, 最早由 Sun 等人^[14]和 Yu 等人^[15]分别在 1999 年发现. 同年, Pazdernik 等人^[16]在小鼠中发现了其同源蛋白小鼠 RIP3. 之后, Yang 等人^[17]在 2005 年又发现细胞内存在 RIP3 的两种新的剪接体形式: RIP3 β

和 RIP3 γ . RIP3 基因定位于人染色体 14q11.2 上, 该区域的染色体损伤与癌症发生发展相关, 尤其是鼻咽癌和白血病, 是一个多发基因突变的区域. RIP 广泛地表达于胚胎和大量的成熟组织中, 如大脑、心、肝、肾、脾、肺、骨骼肌、外周血淋巴细胞等, 尤其在胰腺中表达最高. 有研究对 23 种不同肿瘤细胞系采用 Northern 杂交方法均未检测到 RIP3 的表达, 提示 RIP3 可能在抑制肿瘤发生发展等生物过程中发挥重要作用^[18].

2 RIP3 的结构及其功能域

在整个 RIP3 蛋白的 518 个氨基酸中, 有两个功能结构域. N-末端包含一个 RIPs 家族都有的激酶结构域(21~287), 根据保守序列推断该激酶结构域活性中心为 K50 和 D142, 并且体外激酶分析该蛋白可自磷酸化^[14]. 人源 RIP3 的激酶活性位点是 Lys50, 该位点对 RIP3 的激酶活性与 ATP 结合非常重要, 若将 Lys50 突变为丙氨酸(Ala), 其激酶活性会丧失^[15], 而

D142 活性中心的主要功能为在磷酸集团转移过程中接受质子; C-末端是一个独特的结构域, 在 RIPs 家族其他成员中均未发现与之类似的结构. 2004 年, Yang 等人^[19]在 RIP3 蛋白结构中找到一个非经典核定位信号(NLS)和 3 个富含亮氨酸的核输出信号(NES), 它们分别是 NLS(442~472), NES1(255~264), NES2(344~354), NES3(116~131), 其中 NES3 又含有两个相互重叠的 NES 样 motif: NES3-I (116~126)和 NES3-II (121~131), 并证实了该蛋白具有核质穿梭特点(图 2)^[20]. 接着, Li 等人^[21]又证实了 RIP3 蛋白中的非经典 NLS 功能域除了能在细胞核中启动细胞凋亡、活化 NF- κ B 等生理过程外, 还参与 RIP3-RIP1 与 RIP3-RIP3 的相互作用, 并指出 RIP3 可能以二聚体形式存在于细胞中. 因为, 在这个非典型 NLS 结构域中还藏有一个与 RIP1 共有的 RHIM 结构域(RIP homotypic interaction motif), 这个功能域是 RIP3 与 RIP1 发生相互作用所必需的^[22]. 两个新发现的 RIP3 剪接体形式: RIP3 β 和 RIP3 γ ^[17], 均来源于 RIP3 编码基因的移码突变和不同剪切方式. 与全长 RIP3 不同, 二者都是由

图 1 RIPs 激酶家族结构域组成^[1]

RIPs 家族有 7 个成员. 其中, 含有丝/苏氨酸激酶结构域(KD)、RIP 同源结合基序(RHIM)、死亡结构域(DD)、caspase 活化募集结构域(CARD)、锚蛋白重复序列(ANK)、Ras 复合蛋白(Roc/COR)、亮氨酸富集区(LRR)、WD40 等结构域

图 2 RIP3 蛋白的结构简图^[20]

RIP3 蛋白序列中包含 31 个氨基酸(442~472 位)的细胞核定位信号(NLS), 及 3 个富含亮氨酸的核输出信号(NES), 分别为 NES1(224~287 位), NES2(333~358 位)和 NES3(1~223 位)

不完整的 N-末端激酶结构域和一个缩短的 C-末端构成, 缺乏与全长 RIP3 相似的 NES 以及 NLS 功能结构域。

3 RIP3 的亚细胞定位

目前, 学术界对 RIP3 的亚细胞定位尚没有统一的定论。据现有的研究数据表明, RIP3 蛋白的亚细胞定位与其在细胞中发挥的功能密切相关, 并随着定位的改变, RIP3 蛋白能在不同生理病理过程中发挥不同的作用^[23]。

Kasof 等人^[24]报道, RIP3 定位于线粒体, 发现外源性表达的 RIP3 是以点状的形式定位于线粒体, 并能诱发凋亡与 NF- κ B 的核转位。他们还利用 caspase 的广谱抑制剂 zVAD 和特异性抑制剂 Z-DEVD-FMK, 推测 RIP3 可能与 RAIDD 相似蛋白相互作用, 在线粒体活化 caspase, 而非在 TNF-R1 信号复合体中激活 caspase 而诱导细胞凋亡。

后来, Yang 等人^[19]发现, RIP3 蛋白为核质穿梭蛋白。他们在 HeLa 细胞中超表达 RIP3 后发现, RIP3 定位于细胞质, 然而在 Leptomycin B (LMB, 一种从链霉菌中分离出来的饱和支链脂肪酸) 于 37°C 处理后, 大多定位于细胞核。他们发现并证实, RIP3 蛋白的出核依赖于出核介导物 CRM1 (chromosome region maintenance 1, 一种主要的出核介导物, 能与出核蛋白上的 NES 序列结合), 通过其 NES 序列与 CRM1 结合才能被转运至核孔的出核部位。而 LMB 因末端带有内酯环能与 CRM1 的一个保守半胱氨酸巯基形成共价化合物, 阻止 CRM1 和 RIP3 的 NES 序列相互作用, 有效地抑制了 CRM1 介导的出核转运。由于之前有研究表明, TRADD 与 FADD 能在核内诱导凋亡, p53, APC 等抑癌因子的功能也受到其自身核质穿梭能力的调节, 而且 RIP3 上 NLS (442~472) 是外源性表达 RIP3 诱导凋亡的最小序列, 因此, 他们推断 RIP3 的核定位可能与其诱导凋亡的功能相关。

另有研究发现, RIP3 发挥功能需要与其他众多蛋白分子形成功能复合体。Sun 等人^[22]发现, 在 TNF 刺激下, 外源性 RIP3 能借助内源性 RIP1 共定位于 TNF-R1 信号复合体上, 并通过磷酸化 RIP1 调控 NF- κ B 的活化。而 Zhang 等人^[25]研究表明, 在 TNF α -诱导性细胞坏死过程中, RIP3 与 RIPK1 形成

蛋白复合体并被磷酸化修饰, RIP3 的细胞亚定位也发生变化。他们先通过细胞分馏 (cell fractionation) 的方法发现, 虽然 RIP3 蛋白在所有细胞分馏成分中都存在, 但磷酸化的 RIP3 并不存在细胞溶质, 而出现在分馏沉淀组分中, 包括细胞核、线粒体、过氧化物酶体等细胞器, 尤其是存在于微粒体和小囊泡中。RIPK1 的定位与 RIP3 完全类似。之后, 为了进一步分析磷酸化修饰的 RIP3 是否定位于某个特定的细胞器, 他们又利用免疫染色方法和共聚焦显微镜技术研究被修饰的 RIP3 蛋白的细胞亚定位, 但也没有与已知细胞器重合定位, 这些细胞器包括线粒体、高尔基体、内质网、过氧化物酶体、溶酶体和内涵体。最新研究表明, RIP3 可能定位于微管, 与 AtKinesin13A (驱动蛋白 13 家族成员之一) 相互作用参与微管重建^[26]。

对于 RIP3 的两个剪切异构体 RIP3 β 和 RIP3 γ , Yang 等人^[17]指出, 由于不完整的结构特点, 二者均定位于细胞质, 且没有核质穿梭的定位特点。他们还证明定位于细胞质的外源性 RIP3 β 和 RIP3 γ 不仅不能诱导细胞凋亡, 反而下调 RIP3 全长诱导的细胞凋亡。

4 RIP3 的生物学功能

4.1 RIP3 与细胞凋亡

最早关于 RIP3 功能的报道是过量表达 RIP3 可诱导细胞凋亡。有研究表明, 在 Phoenix-A, HeLa, 293E, MCF7 等细胞中超表达 RIP3, 都会导致细胞死亡, 死亡细胞呈现凋亡的形态学特征, 并能检测到 caspase 的活化^[14-16,18]。通过过量表达 RIP3, 并用 TNF 处理细胞, 发现 RIP3 会被活化的 caspase-8 剪切^[27], 其识别位点是 Asp328^[22]。剪切后的 RIP3 的 C 末端虽然缺乏激酶活性区, 但同样能诱导细胞凋亡, 而且是目前有报道的最小的可以诱导细胞凋亡的片段^[22]。然而, 缺失 C 末端的 RIP3 会抑制 TNF 诱导的 caspase 的活化, 这表明过量表达 RIP3 诱导的细胞凋亡依赖于 RIP3 的 C 末端^[28]。

尽管 RIP3 具有很强的促凋亡功能, 但其具体的机制还不是很清楚。有人推测, 可能在 TNFR1 下游存在一条 RIP3 参与的, 与 FADD 平行的细胞凋亡通路, 抑或是 RIP3 处于 FADD 介导的凋亡通路的下游。后来, 对 RIP3 基因敲除小鼠的研究表明, RIP3 的缺

陷并不影响细胞对不同凋亡刺激的反应^[28]. He 等人^[29]也分别用 TNF- α 和 Smac mimetic(他们自己研发的一种模拟 Smac 分子功能的小分子化合物), TNF- α 和放线菌酮诱导细胞凋亡, 然后对野生型 HT-29 和稳定表达 RIP3 shRNA 的细胞株进行比较, 发现活化的 caspase 对底物 PARP 的切割并没有发生变化. 这些结果表明, RIP3 并不是 TNF- α 诱导性细胞凋亡途径所必需的^[22].

4.2 RIP3 与 NF- κ B 活化

RIP3 与 NF- κ B 活化之间的关系比较复杂, 现在学术界还没有统一的定论. 根据现有的研究证据, RIP3 不仅能够促进转录因子 NF- κ B 的活化, 也可以抑制 NF- κ B 的活化.

有文献^[14]报道, 在 293E 细胞、Phoenix-A 细胞中过量表达 RIP3 能提高 NF- κ B 报告基因的表达水平, 并且这种作用不依赖于 RIP3 的激酶活性, 但需要 RIP3 的 C 末端结构. 也有文献^[18]指出, 在 HeLa 细胞中过量表达 RIP1 与 RIP3, 免疫染色结果显示过量表达 RIP1 几乎能使整个细胞的 NF- κ B 转位入核, 而过量表达 RIP3 则能使大约 50% 的 NF- κ B 转位入核. 上述研究表明, 过量表达 RIP3 对 NF- κ B 的活化有一定程度的促进作用, 但这种促进作用远远低于 RIP1 对 NF- κ B 的活化作用.

同时, 很多文献表明, RIP3 在 NF- κ B 活化途径中起到重要的负调控作用. 如敲除 RIP3 基因对由 TNF, TLR2 和 TLR4 诱导的 NF- κ B 活化水平没有什么影响^[30], 表明在这些诱导条件下, NF- κ B 的活化并不依赖于 RIP3. 另外, RIP3 能通过 RHIM 结构域与 RIP1 相互作用并且使 RIP1 磷酸化, 从而抑制 RIP1 诱导的 NF- κ B 活化^[22,28]. 同样, 在 TRIF 依赖的 NF- κ B 活化通路中, RIP3 借助 RHIM 结构域与 TRIF 竞争结合 RIP1^[31], 下调 TRIF 介导的 NF- κ B 活化, 这种抑制作用于 RIP3 和 RIP1 的 RHIM 结构域以及 RIP3 的激酶活性. 对 RIP3 敲除小鼠的研究发现, RIP3 的缺陷也不影响不同刺激物诱导下的 NF- κ B 途径活化, 这也说明了 RIP3 可能参与了 NF- κ B 的信号通路, 但不是 NF- κ B 途径所必需的.

4.3 RIP3 与凋亡样坏死(Necroptosis)

肿瘤坏死因子 TNF- α 是一种多效性细胞因子, 在炎症反应、细胞凋亡和细胞坏死等生理病理过程中

起着重要的调节作用. 它能在多种细胞中诱导发生凋亡, 并且在 caspase 广谱抑制剂 Z-VAD-FMK (zVAD)存在的条件下, TNF- α 还能够诱导一些细胞发生坏死^[32-37]. 由于这些作用特点, 很多研究者将 TNF- α 作为研究细胞凋亡与细胞坏死之间区别与联系及其内在机制的经典模型. He 等人^[29]通过高通量 RNAi 技术对 TNF- α , Smac mimetic 和 zVAD 共同诱导的细胞坏死起关键作用的新基因进行鉴定. 他们共筛选了 21125 个基因, 发现激酶 RIP3 是调控 TNF- α 诱导的非 caspase 依赖性细胞坏死的关键调控蛋白, 它能在 RNAi 后有效地抑制细胞坏死. 他们发现, RIP3 选择性地表达于一些细胞, 其表达与 TNF- α 诱导的细胞坏死密切相关, 异位表达 RIP3 能使对 TNF- α 诱导细胞坏死有抗性的细胞转变为敏感型细胞, 而通过 RNAi 技术干扰 RIP3 蛋白的表达能够显著抑制 TNF- α 诱导的细胞坏死. 他们分别在多种细胞系中证实了这种现象, 如 L929, MEF, 野生型 Jurkat 和 FADD 缺陷型 Jurkat. 另外, 在雨蛙素(cerulein)诱导的小鼠急性胰腺炎模型的体内实验中, 敲除 RIP3 基因能显著减少胰腺细胞的坏死. 这些数据充分说明, RIP3 在 TNF- α 诱导的细胞坏死中起关键性调控作用, 且这种作用是在不同细胞系中普遍存在的. 接着, 他们又利用免疫共沉淀的方法证实了 RIP3 与 RIP1 之间的相互作用关系. 用 TNF- α , Smac mimetic 和 zVAD 处理细胞 4 h 后, 发现内源性 RIP1 与 RIP3 相互形成蛋白复合体, 并表现出被磷酸化修饰的状态, 这种磷酸化修饰可被体外激酶实验进一步证实. 那么这种磷酸化修饰是怎么形成的呢? 虽然先前已有文献报道, RIP1 和 RIP3 都含有激酶活性位点且能进行自我磷酸化修饰. 但是 Cho 等人^[38]发现, RIP1 在细胞没有发生凋亡或者坏死时存在低水平的磷酸化修饰, 然而 TNF- α 依赖性 RIP1 磷酸化修饰却不属于自我修饰, 而是来自于 RIP3 的激酶修饰, 尽管这种磷酸化作用相对较弱. 因为, RIP1 的磷酸化在敲除 RIP3 的 MEF 细胞中能完全被阻断却不能被 Nec-1 抑制. 他们还发现, RIP3 的磷酸化属于自我修饰而非 RIP1 的直接作用^[39]. RIP1 与 RIP3 蛋白复合体的形成具有细胞坏死信号刺激特异性, 其他信号的刺激并不能诱导内源性 RIP1 与 RIP3 相互形成蛋白复合体. 他们还利用氨基酸突变的方法抑制该蛋白复合体的形成, 发现能明显抑制由 TNF- α 诱导的细胞死亡, 表明 RIP1 与 RIP3 的相互作用在 TNF- α 诱导的细胞死亡中传递

下游信号通路并发挥极其重要的作用. 那么, RIP1 与 RIP3 谁才是诱导细胞死亡所必需的呢? Zhang 等人^[25]研究发现, 在敲降 RIP3 后, 超表达 RIP1 并不能增强 TNF- α 和 zVAD 导致的细胞坏死. 由此推测, RIP3 是诱导细胞坏死过程所必需的, 而 RIP1 只有在 RIP3 存在的条件下才能发挥诱导细胞坏死的作用. 同年, 另外两个研究团队分别从不同的研究角度发现了 RIP3 在非 caspase 酶依赖性的细胞坏死中的重要作用. Zhang 等人^[25]发现, 不表达 RIP3 基因的 A 细胞(一种 NIH-3T3 细胞系)在 TNF- α 诱导下发生凋亡, 而表达 RIP3 基因的 N 细胞(另一种 NIH-3T3 细胞系)却在 TNF- α 诱导下发生程序性坏死. caspase 广谱抑制剂 zVAD 能抑制 A 细胞的凋亡, 但不能阻止 N 细胞发生坏死. 他们进一步利用 shRNA 敲降 N 细胞中 RIP3 基因的表达后, 发现 zVAD 就能阻断 N 细胞的死亡. 另外, 他们还通过缺失和定点突变证实了 RIP3 中的激酶活性和 RHIM 结构域是细胞坏死信号通路所必需的. Cho 等人^[38,39]通过 RNAi 干扰筛选技术发现, 在经过 TNF- α 处理的病毒感染细胞中, RIP3 是细胞发生程序性坏死所必需的 10 个蛋白激酶之一. RIP3 能使坏死特异性激酶 RIP1 磷酸化, 磷酸化后的 RIP1 和 RIP3 能形成更稳定的促坏死复合体, 从而激活下游促坏死激酶活性, 最终导致细胞坏死性死亡. 因此, 综合上述研究, RIP3/RIP1 蛋白复合体是在细胞坏死途径中发挥重要作用, 在细胞坏死信号 TNF- α 等刺激下, RIP3 蛋白将 RIP1 激酶从细胞凋亡途径转换到了细胞坏死途径, 起到了从凋亡到坏死的重要开关作用^[40].

4.4 RIP3 与细胞能量代谢及 ROS 的产生

为了寻找在坏死过程中与 RIP3 发生相互作用的蛋白, Zhang 等人^[25]通过免疫磁珠共孵育形成免疫复合体, 再利用高效液相色谱(LC-MS/MS)技术发现了在经过 TNF- α 和 zVAD 处理的实验组与对照组鉴定出来的蛋白有明显的差异, 并且筛选出 3 个与 RIP3 直接相互作用的能量代谢相关的酶: 糖原磷酸化酶(PYGL)、谷氨酰胺合成酶(GLUL)和谷氨酸脱氢酶(GLUD1). 其中, PYGL 能够催化 α (1-4)糖苷键断裂而将糖原分解为葡萄糖-1-磷酸, 在细胞利用糖原作为能量来源过程中发挥重要作用; GLUL 是存在于胞浆中的一个生化酶, 能催化谷氨酸与氨结合成谷氨酰胺, GLUD1 是线粒体基质中将谷氨酸还原成 α -酮戊

二酸的酶, 二者是利用谷氨酸和谷氨酰胺作为能量来源的关键酶. 之后, 他们又利用免疫共沉淀(co-IP)的方法分别从正反方向进一步验证了他们的相互作用. 为了进一步验证 RIP3 与 PYGL, GLUL 和 GLUD1 的相互作用关系, 他们在体外重组表达 GST-RIP3 和 GST-RIP3-K51A, 发现全长蛋白 GST-RIP3 能显著增强 PYGL 及经过碱性磷酸酶(CIP)去磷酸化的 GST-GLUL 的催化活性, 而缺失了激酶活性的 GST-RIP3-K51A 对 PYGL 和 GLUL 的催化活性则基本没有影响. 由于重组表达的 GLUD1 蛋白没有活性, 他们在 293T 细胞内共转 RIP3 和 GLUD1, 同样发现了 RIP3 能显著增加 GLUD1 的活性, 并且 RIP3 的激酶活性也是这种作用所必需的. 另外, 他们还发现敲降 PYGL, GLUL, GLUD1 中的任何一个都能部分抑制 TNF- α /zVAD 联合诱导 N 细胞的坏死. 因此得出结论, RIP3 能通过增加这 3 个能量相关的代谢酶的酶促活性, 增强胞内的葡萄糖、谷氨酸和谷氨酰胺的代谢, 从而通过提升细胞的整体能量代谢水平促进细胞的程序性坏死.

ROS(reactive oxygen species)可能是细胞坏死的重要传播者和执行者^[41~44]. 有文献^[44,45]报道, 在 L929 和 MEF 细胞中, ROS 在细胞坏死信号刺激下会被诱导产生并积累, 从而导致细胞坏死, 抗氧化剂 BHA(butylated hydroxyanisole)等能显著抑制该坏死途径. TNF- α 诱导的 ROS 均来自线粒体, 具有非常高的细胞毒性, 且不易被线粒体基质上和胞质内的表达的抗氧化酶还原, 也不能被 N-乙酰半胱氨酸(N-acetyl cysteine)和谷胱甘肽(glutathione)等 ROS 清除剂清除. 然而, ROS 是如何介导细胞死亡的目前还不是很清楚. 在 TNF- α , Smac mimetic 和 zVAD 联合处理 HT-29 细胞时, 抑制 ROS 的释放并不能阻止细胞发生坏死. 这说明 ROS 的产生并不是所有细胞发生程序性坏死所必需的, 或者还有其他非依赖 ROS 的细胞坏死途径. 那么 RIP3 蛋白与 TNF- α 诱导产生的 ROS 有什么关系呢? Zhang 等人^[25]发现, ROS 的大量产生和积聚是 RIP3 蛋白依赖的, 而且 PYGL, GLUL 和 GLUD1 参与调节. 他们在敲降 N 细胞内的 RIP3 表达水平后, TNF- α 和 zVAD 处理的细胞产生的 ROS 的相对浓度比对照组明显降低. 而与之相反, 重建了 RIP3 在 A 细胞中的表达后, TNF- α 和 zVAD 处理的细胞产生了大量的 ROS. 此外, 与野生型小鼠的原代腹腔巨噬细胞相比, 在经过 TNF- α 和 zVAD, 尤

其是 LPS 和 zVAD 的共刺激下, *RIP3* 基因敲除小鼠的细胞内 ROS 的水平明显降低. 而且, 利用 RNAi 实验敲降 N 细胞内 PYGL, GLUL 和 GLUD1 的水平后, TNF- α 和 zVAD 诱导产生的 ROS 也明显降低, 与之相适应的细胞死亡也减少. 另外, 凋亡抑制蛋白 (cIAP1) 能显著抑制 RIP1/RIP3 依赖的 ROS 聚集, 从而抑制细胞发生凋亡样坏死^[46].

据此, 总结一下 RIP3 在细胞内参与的信号通路 (图 3)^[47]. TNF- α 诱导的下游信号通路会根据细胞的状态和诱导的条件不同而使细胞出现存活、凋亡或者坏死 3 种完全不同的结果^[48,49]. TNFR1 受到 TNF- α 活化后, 会通过死亡结构域 (DD) 募集 TRADD, 而 TRADD 又会募集 TRAF2, RIP1 以及 cIAP1 和 cIAP2 形成复合体 I, 该复合体会激活下游 NF- κ B 信号从而抑制细胞发生凋亡; 在 TNF- α 强凋亡刺激下, TRADD 与 RIP1 离开 TNFR1 与胞浆中的 FADD 和 caspase-8 形成复合体 II (DISC II)^[50], 引发 caspase-8 活化并切割 RIP1 和 RIP3 使其失去活性, 从而激活下游 caspase 活化诱发凋亡; 如果 caspase-8 的活性被广谱性 zVAD 抑制, RIP3 没有被 caspase-8 切割而与 RIP1 形成相互作用蛋白体, 并通过自身的激酶活性位点使 RIP1 与 RIP3 同时磷酸化, 从而活化下游坏死信号.

而具有激酶活性的 RIP3 还能与 PYGL, GLUL, GLUD1 3 个能量代谢相关酶相互作用并增强它们的催化活性, 促进葡萄糖、谷氨酸和谷氨酰胺分解代谢产生过量的 ROS, 而过量的 ROS 使得线粒体膜的通透性改变诱发细胞程序性坏死. 然而, RIP3 所参与的这条通路只是 在一些细胞中得到验证, 还不能确定该通路是具有细胞特异性还是具有普遍意义. 另外, 虽然有报道说 RIP3 能磷酸化 RIP1, 但在这条通路中, 还不能确定 RIP3 是位于 RIP1 下游的效应器还是处于 RIP1 的上游, 而且 RIP3 与 RIP1 形成相互作用蛋白复合体之后的下游信号通路还不是很清楚. 还有, RIP3 在胞内没有与任何细胞器有明显的共定位现象, 而且抑制胞内的 ROS 并不能阻止细胞坏死, 而有文献报道敲降 RIP3 后能阻止 NO 介导的细胞坏死^[51], 那么 RIP3 又是如何诱发下游细胞坏死信号的呢? 总之, 对 RIP 家族依赖的促死亡信号通路还需要进一步探讨.

综上所述, RIP3 是胞内调节细胞凋亡与细胞坏死的极其重要的开关分子, 参与细胞内多种信号通路并发挥重要的生理功能, 是哺乳动物胚胎发育成熟必不可少的蛋白分子之一^[52]. 细胞坏死是众多疾病的病理基础, 如缺血-再灌注损伤、心梗、中风、脑梗死、坏死性胰腺炎、坏死相关性肿瘤、自身免疫系

图 3 RIP3 通过线粒体功能失常促进程序性坏死^[47]

统过度活化造成的自身免疫病^[53], 还有能量代谢紊乱型坏死性疾病, 如糖尿病等. 而由 RIP3 引发下游信号通路与能量代谢相关的细胞程序性坏死, 似乎是机体在凋亡抑制下杀死病毒感染细胞^[54]、肿瘤细胞等异常细胞的重要保护机制. 而且, 已有文献^[55]报道,

RIP3 基因的变异体及其 SNPs 位点在非霍奇金淋巴瘤的发生发展中发挥重要作用. 因此, 对 RIP3 的进一步研究将有可能为上述疾病开创新的治疗策略提供理论依据和帮助, 预示 RIP3 可能的重要的临床应用价值.

参考文献

- 1 Zhang D, Lin J, Han J. Receptor-interacting protein (RIP) kinase family. *Cell Mol Immunol*, 2010, 7: 243–249
- 2 Degterev A, Hitomi J, Germesheid M, et al. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat Chem Biol*, 2008, 4: 313–321
- 3 Ramnarain D B, Paulmurugan R, Park S, et al. RIP1 links inflammatory and growth factor signaling pathways by regulating expression of the EGFR. *Cell Death Differ*, 2008, 15: 344–353
- 4 Navas T A, Baldwin D T, Stewart T A. RIP2 is a Raf1-activated mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem*, 1999, 274: 33684–33690
- 5 McCarthy J V, Ni J, Dixit V M. RIP2 is a novel NF-kappaB-activating and cell death-inducing kinase. *J Biol Chem*, 1998, 273: 16968–16975
- 6 Thiebaut R, Douchin V, Jung C, et al. RIP2 polymorphisms in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*, 2011, 17: 1055
- 7 Zhang H, Zhang R, Lin Y, et al. RIP1-mediated AIP1 phosphorylation at a 14-3-3-binding site is critical for tumor necrosis factor-induced ASK1-JNK/p38 activation. *J Biol Chem*, 2007, 282: 14788–14796
- 8 Izumi K M, Cahir M E, Ting A T, et al. The Epstein-Barr virus oncoprotein latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated proteins TRADD and receptor-interacting protein (RIP) but does not induce apoptosis or require RIP for NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol*, 1999, 19: 5759–5767
- 9 Komada Y, Inaba H, Zhou Y W, et al. mRNA expression of Fas receptor (CD95)-associated proteins (Fas-associated phosphatase-1/FAP-1, Fas-associating protein with death domain/FADD, and receptor-interacting protein/RIP) in human leukaemia/lymphoma cell lines. *Br J Haematol*, 1997, 99: 325–330
- 10 Poyet J L, Srinivasula S M, Lin J H, et al. Activation of the Ikappa B kinases by RIP via IKKgamma/NEMO-mediated oligomerization. *J Biol Chem*, 2000, 275: 37966–37977
- 11 Meylan E, Tschopp J. The RIP kinases: crucial integrators of cellular stress. *Trends Biochem Sci*, 2005, 30: 151–159
- 12 Shikama Y, Yamada M, Miyashita T. Caspase-8 and caspase-10 activate NF-kappaB through RIP, NIK and IKKalpha kinases. *Eur J Immunol*, 2003, 33: 1998–2006
- 13 Devin A, Lin Y, Liu Z G. The role of the death-domain kinase RIP in tumour-necrosis-factor-induced activation of mitogen-activated protein kinases. *EMBO Rep*, 2003, 4: 623–627
- 14 Sun X, Lee J, Navas T, et al. RIP3, a novel apoptosis-inducing kinase. *J Biol Chem*, 1999, 274: 16871–16875
- 15 Yu P W, Huang B C, Shen M, et al. Identification of RIP3, a RIP-like kinase that activates apoptosis and NFkappaB. *Curr Biol*, 1999, 9: 539–542
- 16 Pazdernik N J, Donner D B, Goebel M G, et al. Mouse receptor interacting protein 3 does not contain a caspase-recruiting or a death domain but induces apoptosis and activates NF-kappaB. *Mol Cell Biol*, 1999, 19: 6500–6508
- 17 Yang Y, Hu W, Feng S, et al. RIP3 beta and RIP3 gamma, two novel splice variants of receptor-interacting protein 3 (RIP3), downregulate RIP3-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 332: 181–187
- 18 Kasof G M, Prosser J C, Liu D, et al. The RIP-like kinase, RIP3, induces apoptosis and NF-kappaB nuclear translocation and localizes to mitochondria. *FEBS Lett*, 2000, 473: 285–291
- 19 Yang Y, Ma J, Chen Y, et al. Nucleocytoplasmic shuttling of receptor-interacting protein 3 (RIP3): identification of novel nuclear export and import signals in RIP3. *J Biol Chem*, 2004, 279: 38820–38829
- 20 Xu Y, Zhao X H. RIP3: a possible trigger of apoptosis or necrosis. *Prog Biochem Biophys*, 2010, 37: 1067–1073
- 21 Li M, Feng S, Wu M. Multiple roles for nuclear localization signal (NLS, aa 442–472) of receptor interacting protein 3 (RIP3). *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 372: 850–855
- 22 Sun X, Yin J, Starovasnik M A, et al. Identification of a novel homotypic interaction motif required for the phosphorylation of receptor-interacting protein (RIP) by RIP3. *J Biol Chem*, 2002, 277: 9505–9511

- 23 谢琳娜, 张娜, 陈明琼, 等. 抗 RIP3 抗体的制备及其亚细胞定位. *细胞与分子免疫学杂志*, 2006, 22: 660–663
- 24 Kasof G M, Prosser J C, Liu D, et al. The RIP-like kinase, RIP3, induces apoptosis and NF-kappaB nuclear translocation and localizes to mitochondria. *FEBS Lett*, 2000, 473: 285–291
- 25 Zhang D W, Shao J, Lin J, et al. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science*, 2009, 325: 332–336
- 26 Mucha E, Hoefle C, Huckelhoven R, et al. RIP3 and AtKinesin-13A - a novel interaction linking Rho proteins of plants to microtubules. *Eur J Cell Biol*, 2010, 89: 906–916
- 27 Feng S, Yang Y, Mei Y, et al. Cleavage of RIP3 inactivates its caspase-independent apoptosis pathway by removal of kinase domain. *Cell Signal*, 2007, 19: 2056–2067
- 28 Kaiser W J, Offermann M K. Apoptosis induced by the toll-like receptor adaptor TRIF is dependent on its receptor interacting protein homotypic interaction motif. *J Immunol*, 2005, 174: 4942–4952
- 29 He S D, Wang L, Miao L, et al. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha. *Cell*, 2009, 137: 1100–1111
- 30 Newton K, Sun X, Dixit V M. Kinase RIP3 is dispensable for normal NF-kappa Bs, signaling by the B-cell and T-cell receptors, tumor necrosis factor receptor 1, and Toll-like receptors 2 and 4. *Mol Cell Biol*, 2004, 24: 1464–1469
- 31 Rebsamen M, Heinz L X, Meylan E, et al. DAI/ZBP1 recruits RIP1 and RIP3 through RIP homotypic interaction motifs to activate NF-kappaB. *EMBO Rep*, 2009, 10: 916–922
- 32 Wrighton K H. Cell death: a killer puts a stop on necroptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 12: 279
- 33 Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden B T, et al. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11: 700–714
- 34 Christofferson D E, Yuan J. Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Curr Opin Cell Biol*, 2010, 22: 263–268
- 35 Berghé T V, Vanlangenakker N, Parthoens E, et al. Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. *Cell Death Differ*, 2010, 17: 922–930
- 36 陈伯年, 杜冠华. 坏死性凋亡: 一种新的细胞死亡方式. *生理科学进展*, 2010, 41: 95–99
- 37 Miao B, Degterev A. Methods to analyze cellular necroptosis. *Methods Mol Biol*, 2009, 559: 79–93
- 38 Cho Y S, Challa S, Moquin D, et al. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell*, 2009, 137: 1112–1123
- 39 Cho Y, Challa S, Chan F K. A RNA interference screen identifies RIP3 as an essential inducer of TNF-induced programmed necrosis. *Adv Exp Med Biol*, 2011, 691: 589–593
- 40 Declercq W, Vanden B T, Vandenabeele P. RIP kinases at the crossroads of cell death and survival. *Cell*, 2009, 138: 229–232
- 41 Wilkins K A, Bancroft J, Bosch M, et al. ROS and NO mediate actin reorganization and programmed cell death in the Self-Incompatibility response of Papaver. *Plant Physiol*, 2011, 156: 404–416
- 42 Li Y, Rory G C, Sang Y, et al. Camptothecin and Fas receptor agonists synergistically induce medulloblastoma cell death: ROS-dependent mechanisms. *Anticancer Drugs*, 2009, 20: 770–778
- 43 Liu W H, Cheng Y C, Chang L S. ROS-mediated p38alpha MAPK activation and ERK inactivation responsible for upregulation of Fas and FasL and autocrine Fas-mediated cell death in Taiwan cobra phospholipase A(2)-treated U937 cells. *J Cell Physiol*, 2009, 219: 642–651
- 44 Kim H S, Loughran P A, Rao J, et al. Carbon monoxide activates NF-kappaB via ROS generation and Akt pathways to protect against cell death of hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008, 295: G146–G152
- 45 Byun H S, Park K A, Won M, et al. Phorbol 12-myristate 13-acetate protects against tumor necrosis factor (TNF)-induced necrotic cell death by modulating the recruitment of TNF receptor 1-associated death domain and receptor-interacting protein into the TNF receptor 1 signaling complex: implication for the regulatory role of protein kinase C. *Mol Pharmacol*, 2006, 70: 1099–1108
- 46 Vanlangenakker N, Vanden B T, Bogaert P, et al. cIAP1 and TAK1 protect cells from TNF-induced necrosis by preventing RIP1/RIP3-dependent reactive oxygen species production. *Cell Death Differ*, 2011, 18: 656–665
- 47 Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. RIP kinases initiate programmed necrosis. *J Mol Cell Biol*, 2009, 1: 1, 8–10
- 48 Zhang D W, Zheng M, Zhao J, et al. Multiple death pathways in TNF-treated fibroblasts: RIP3- and RIP1-dependent and independent routes. *Cell Res*, 2011, 21: 368–371
- 49 Vandenabeele P, Declercq W, Van Herreweghe F, et al. The role of the kinases RIP1 and RIP3 in TNF-induced necrosis. *Sci Signal*, 2010, 3: re4
- 50 Moquin D, Chan F K. The molecular regulation of programmed necrotic cell injury. *Trends Biochem Sci*, 2010, 35: 434–441

- 51 Davis C W, Hawkins B J, Ramasamy S, et al. Nitration of the mitochondrial complex I subunit NDUFB8 elicits RIP1- and RIP3-mediated necrosis. *Free Radic Biol Med*, 2010, 48: 306–317
- 52 Kaiser W J, Upton J W, Long A B, et al. RIP3 mediates the embryonic lethality of caspase-8-deficient mice. *Nature*, 2011, 471: 368–372
- 53 Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden B T, et al. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11: 700–714
- 54 Upton J W, Kaiser W J, Mocarski E S. Virus inhibition of RIP3-dependent necrosis. *Cell Host Microbe*, 2010, 7: 302–313
- 55 Cerhan J R, Ansell S M, Fredericksen Z S, et al. Genetic variation in 1253 immune and inflammation genes and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Blood*, 2007, 110: 4455–4463

Advances in Research of RIP3 Protein

REN JianHong, ZHU Jun, ZHENG Wen, XIE Yan, SONG YuQin,
YING ZhiTao & ZHANG Chen

Key Laboratory of Carcinogenesis and Translation Research (Ministry of Education), Department of Lymphoma, Peking University School of Oncology, Beijing Cancer Hospital and Institute, Beijing 100142, China

Receptor-interacting protein 3 (RIP3) is a member of the Ser/Thr protein kinase family (RIPs). Increasing evidences have revealed that RIPs are essential sensors of cellular stress and key regulators of cell survival, apoptosis and necrosis. Recent studies have demonstrated that RIP3 participates in the signal pathway of cellular necrosis induced by TNF- α . RIP3 functions as an essential regulator of the TNF- α -induced necrosis mainly mediated by reactive oxygen species (ROS) accumulation. These new findings will offer a new target for the advanced tumor therapeutic strategy.

receptor-interacting protein 3(RIP3), reactive oxygen species (ROS), necrosis

doi: 10.1360/052011-224