

刘超英,高 洪,严玉霖. 细胞自噬、凋亡和坏死性凋亡的分子关系[J]. 江苏农业科学,2019,47(16):6-8.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.16.002

细胞自噬、凋亡和坏死性凋亡的分子关系

刘超英,高 洪,严玉霖

(云南农业大学动物科学技术学院,云南昆明 650201)

摘要:大量潜在的致死因素能够对细胞造成损伤,这些因素可以通过激活特殊的分子通路进而杀死细胞。有些死亡方式是根据细胞的形态学变化来定义的,但更多的是通过相关调控分子的作用而进行明确定义。随着对细胞死亡越来越深入透彻的研究,多种不同的细胞死亡通路也得到了更加全面、彻底的阐述,它们之间存在的分子关系也成为研究和争议的热点。本文通过阐明自噬和坏死性凋亡的分子通路及发生原理,对两者控制细胞死亡的特殊分子途径的不同特征及它们之间的分子关系进行了详细描述。

关键词:自噬;凋亡;坏死性凋亡;半胱天冬酶

中图分类号: Q255 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)16-0006-03

自噬是一种“自食”的胞内机制。在这一过程中,蛋白和细胞器被特殊的胞内囊泡包裹,并在溶酶体内蛋白酶的作用下彻底裂解后供细胞重新利用。大多数细胞在休眠状态下会发生低水平的自噬。某些刺激因素能够提高自噬的概率,如营养匮乏等。自噬小体的囊泡能够以非特异性(如大自噬)或特异性(如线粒体自噬)的方式包裹细胞质内容物。UNC-51 样激酶(UNC-51-like kinase,简称 ULK)蛋白复合物能够诱导自噬小体的形成,也会受到哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin,简称 mTOR)途径的负调控,而 mTOR 是 1 个主要的营养传感器。因此,生长因子和氨基酸的缺失以及化学抑制剂雷帕霉素都可以利用这一通路引发细胞自噬。ULK 能够促进自噬小体膜的形成,并激活磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase,简称 PI3K)复合体 III,PI3K 抑制剂能够在早期抑制自噬的发生。

1 自噬与细胞死亡的关系

促生存 BCL-2 蛋白家族成员(the pro-survival B cell lymphoma 2 family members)是 BH3(BCL-2 homology 3)拟态混合物 ABT-737 的靶标,这些家族成员能够通过结合自噬蛋白 Beclin1(BECN1/ATG6/VPS30)的 BH3 样结构域直接抑制细胞自噬。当 Beclin 1 过表达时,BCL-2 能够与 Beclin 1 发生免疫共沉淀。然而最近的研究发现,促生存的 BCL-2 蛋白家族对自噬的抑制主要依赖于固有凋亡途径功能的完整性。当固有凋亡途径由于 BAX 基因和 BAK 基因的敲除而彻底失去功能时,抗凋亡 BCL-2 家族成员的过表达便无法通过一系列刺激阻止自噬的激活^[1]。因此,与 BAX 和 BAK 基因对自噬的独立调控相反,BCL-2 家族成员或 BH3 拟态对自

噬的调控是间接的。在 BAX 和 BAK 基因敲除的细胞中,DNA 嵌入剂依托泊苷也能够引起自噬反应,然而,药物是否会因为自噬而引起细胞死亡尚未知。关键自噬基因的敲除是将自噬的功能作为一种细胞死亡类型最清晰的方式。例如,可以通过将 Bax^{-/-}、Bak^{-/-}和 ATG5^{-/-}型细胞与 3 种基因均缺陷的细胞进行比较,从遗传学上区分自噬性细胞死亡。有研究表明,在果蝇发育期间移除中肠结构后,即使在缺乏含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(caspase)的情况下,也能够发生自噬现象。在这些试验条件下对自噬基因进行沉默,结果表明,自噬的发生主要是为了消除细胞,并不依赖于 caspase 的活性。总的来说,自噬途径是一种细胞保存和重复利用资源的机制,可促进细胞死亡。有研究表明,外在的细胞死亡途径中的分子可在自噬的调控中起作用。因此可见,细胞死亡途径和自噬途径应该可以在多水平上互作。

2 凋亡与坏死性凋亡的关系

坏死是一种不可调控的细胞毒素性损伤结果,其发生不需要特殊的分子作用。然而,在最近 10 年中,人们发现了 1 种可调控形式的坏死性细胞死亡,并将其称为坏死性凋亡,因为它兼具凋亡和坏死的特征。坏死性凋亡不仅是一种特定的分子级联反应控制的过程,也具有细胞和细胞器肿胀导致细胞裂解的特征。裂解后释放的大量细胞内容物可作为损伤相关分子模型(damage-associated molecular patterns,简称 DAMPs),例如 mt DNA、HMGB1、IL-33、IL-1 或 S100a9 等,均能增强炎症反应^[2]。坏死性凋亡与大量的炎症病理相关,如胰腺炎、肠炎和疾病感染等^[3-7]。

1998 年,Vercammen 等首次在以肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α ,简称 TNF- α)或 Fas L 以及 caspase 抑制剂处理的鼠科 L929 纤维原细胞中发现了坏死性凋亡特征^[7-8]。后来的研究表明,在出现多种刺激的情况下,如 TNF 受体的信号通路、T 细胞受体刺激、干扰素、一些抗癌药物、病原相关分子模式激活 RIG-I 样或 Toll 样受体、遗传毒性或氧化应激、病毒介导的干扰素(IFN)调控因子的 DNA 依赖性激活剂(DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors,简称

收稿日期:2018-04-09

基金项目:国家自然科学基金(编号:31660704);云南省教育厅科学研究基金(编号:2017YJS028)。

作者简介:刘超英(1992—),女,河南安阳人,博士研究生,主要从事分子病理学研究。E-mail:1107946950@qq.com。

通信作者:高 洪,博士,教授,主要从事动物病理学研究。E-mail:gaohongping@163.com。

DAI) 的激活等,尤其是 caspase8 的抑制能够引起坏死性凋亡的发生^[9-10]。坏死性凋亡的发生过程需要丝氨酸/苏氨酸受体互作蛋白激酶 1 (receptor interacting protein kinases 1, 简称 RIPK1) 和 RIPK3, 以及混合系列蛋白激酶样结构域 (mixed lineage kinase like, 简称 MLKL) 的参与。目前认为,坏死性凋亡是一种由受体互作蛋白 (receptor interacting protein, 简称 RIP) 激酶和混合系列蛋白激酶样结构域 (mixed lineage kinase like, 简称 MLKL) 介导的 caspase 依赖性细胞死亡。从试验角度来讲,这通常与 caspase 抑制剂的使用或 RIPK3/MLKL 的敲除、沉默有关。

大多数报道的坏死性凋亡刺激都是由于肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, 简称 TNF) 的产生和与肿瘤坏死因子受体 1 (tumor necrosis factor receptor 1, 简称 TNFR1) 相关信号通路的激活能够刺激坏死性凋亡的发生。在试验设置中, TNFR1 的信号通路中 caspase8 和 cIAPs 的活性受到抑制时会促进坏死性凋亡的发生。TNF 与 TNFR1 的结合会导致 cIAPs 作用下的受体互作蛋白激酶 I (receptor interacting protein kinase I, 简称 RIPK1) 的多聚泛素化,从而在空间上限制 RIPK1 形成细胞死亡复合体。当 cIAPs 缺失或利用凋亡抑制剂 (inhibitor of apoptosis, 简称 IAP) 处理降解 cIAPs 后,1 种称作 RIPoptosome 的细胞死亡信号复合体就会形成,由去泛素化的 RIPK1、Fas 相关死亡结构域 (fas associated death domain, 简称 FADD)、caspase8 和 FADD 样白介素 1 β 转化酶抑制蛋白 [FADD like interleukin - 1 β converting enzyme (FLICE) inhibitory protein, 简称 cFLIP] 组成^[11-12]。在这种动态变化中,细胞的存活主要依赖于 caspase8 的活性。RIPK1 和 RIPK3 是 caspase8 的底物,在胚胎发育和炎症反应中,它们的裂解能够引发凋亡,阻止大面积的坏死^[13-14]。

在 caspase8 失活的情况下, RIPK1 和 RIPK3 不再发生裂解,两者能够通过其 RHIM 结构域发生互作,并作为激酶启动坏死性凋亡^[15]。坏死小体是由 RIPK1、RIPK3 与 MLKL 共同组成的复合物^[16]。其中, RIPK1 能够使 RIPK3 发生磷酸化,进而使 MLKL 磷酸化,直接引发细胞死亡。一旦发生磷酸化,假激酶 MLKL 会发生构象改变,从而将 1 个特殊的 4 螺旋束结构域插入细胞质膜,破坏质膜的完整性^[17-19]。最新的研究表明, RIPK1 可以通过控制 RIPK3 的寡聚化抑制自发的 RIPK3 激活。然而,缺乏 RIPK1 的细胞会增加自发的 RIPK3 依赖性的坏死性凋亡,而以坏死性凋亡抑制剂处理后的细胞就不会发生坏死性凋亡^[20-21]。围产期致命性的 *Ripk1* 基因缺陷小鼠在缺失 *Ripk3* 或 *Mkl1* 后会得到改善,这就表明 RIPK1 非依赖性 (RIPK3/MLKL 依赖性) 坏死性凋亡的存在,这与前面的结论一致。*Ripk1* 基因的敲除不能治疗 caspase8 缺陷型小鼠,而 *RIPK3* 的基因缺失可以治疗,这一事实就证明了上述想法^[22-23]。进一步的研究表明,由 TLR3/4 或 MCMV 引起的坏死性凋亡不依赖于 RIPK1^[10,24]。

由 RIP 蛋白凋亡体的组分造成的 caspase 依赖性和非依赖性的死亡应答,仍存在其他水平上的交叉调控,目前很多 RIP 蛋白凋亡体还没有研究透彻。例如, cFLIP 的长同分异构体 cFLIP_L 与 caspase8 形成了 1 种具有催化活性的异质二聚体,能够改变 caspase8 底物特异性的光谱^[25]。该二聚体能够通过抑制 RIPK3 来抑制坏死性凋亡^[26]。相反, cFLIP 的短同

分异构体 cFLIP_S 可抑制 caspase8 的活性并能在缺乏 cIAPs 的情况下促进坏死性凋亡复合体的形成^[11-12]。最新研究表明, RIPK3 和 FADD 的共缺失能够使 cFLIP 致死性基因型敲除小鼠存活,但若仅其中 1 个缺失,小鼠便会死亡^[27]。凋亡与坏死性凋亡的另 1 个分子共调控的例子就是头帕肿瘤综合征蛋白 (cylindromatosis, 简称 CYLD) 基因。这一基因编码了 1 种具有去泛素化功能的细胞质蛋白,在全基因组扫描中将其作为一种坏死调节器。CYLD 能够通过促进 RIPK1 在 TNFR1 膜受体复合物中的去泛素化而促进坏死性凋亡^[28]。caspase8 能够通过裂解 CYLD 抑制坏死性凋亡^[29]。总的来说,这些例子可以表明,坏死性凋亡和固有的凋亡途径以一种复杂而有趣的方式进行紧密结合并相互协调。各种细胞死亡方式之间的共调控与这些复杂的互作之间的不同作用都有待研究。

3 自噬和坏死性凋亡的分子关系

在多种细胞死亡方式的复杂关系网中,自噬和坏死性凋亡途径之间的互作关系目前尚不十分清楚。不过,已经有数据证明了这些互作关系。在小鼠纤维原 L929 细胞的研究中,仅仅是 pan - caspase 抑制剂 zVAD 处理就可以引发细胞死亡。部分特征就是自噬小体液泡的形成。由于 RIPK1、ATG7 或 Beclin - 1 表达量的降低抑制了死亡应答,所以试验数据一方面说明了这些自噬基因有助于坏死性凋亡细胞死亡,另一方面说明 caspase 激活能够抑制自噬性细胞死亡。对遗传改良小鼠 T 细胞的研究表明, T 细胞激活后,1 个由 FADD 和 caspase8 构成的 DISC 样复合体会与 RIPK1 在自噬小体膜上进行组装。ATG5 和 FADD 之间的蛋白 - 蛋白互作是这一复合体组装的关键。在功能的水平上,这一模型表明,自噬的某些水平需要正常增殖的 T 细胞应答。FADD、caspase8 和 RIPK1 都调控着应答的程度,因为 FADD 和 caspase8 的敲除增强了自噬,钝化了增殖,同时坏死性凋亡抑制剂对 RIPK1 的抑制能够在缺乏正常 FADD 功能的 T 细胞中恢复增殖应答。最新的研究表明, RIPK3 的缺失也能够重建细胞增殖^[30]。这一调控水平可检测在克隆繁殖中 1 种引起 T 细胞死亡的非调控性自噬发生的可能性。此外,这些数据表明, caspase8 活性的调控在 T 细胞增殖应答的调控中具有重要作用。其他受体信号系统中的自噬和坏死性凋亡途径交叉调控仍需要进一步的研究。

4 结论

相同的有害损伤能够通过不同的分子途径导致细胞死亡。一些信号途径通过相同的分子汇集起来,这些交叉点都是可调控的,细胞可能通过这些点决定它们的死亡方式^[31]。同时,有证据表明,某些胞内应激总是利用一种特定的细胞死亡途径,例如 BCL - 2 调控途径。很明显,其他细胞毒素应答也参与多种机制,细胞死亡可以通过这些机制被引发。自噬和坏死性凋亡的交叉点是分子病理学中比较有趣而且容易扩展研究的部分。有时生理学结果是细胞死亡,而激活细胞死亡途径的因子表达量的降低,影响了炎症反应的发生。自噬性细胞死亡和坏死性凋亡反应的结果都是导致细胞死亡,但两者对相似刺激是否有不同的生理学结果仍有待确定,这仍是进一步研究的热门话题。

参考文献:

- [1] Lindqvist L M, Heinlein M, Huang D C, et al. Prosurvival Bcl - 2 family members affect autophagy only indirectly, by inhibiting Bax and Bak [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111 (23) : 8512 - 8517.
- [2] Kaczmarek A, Vandenabeele P, Krysko D V. Necroptosis: the release of damage - associated molecular patterns and its physiological relevance [J]. Immunity, 2013, 38 (2) : 209 - 223.
- [3] Günther C, Martini E, Wittkopf N, et al. Caspase - 8 regulates TNF - α - induced epithelial necroptosis and terminal ileitis. [J]. Nature, 2011, 477 (7364) : 335 - 339.
- [4] Pan T, Wu S X, He X, et al. Necroptosis takes place in human immunodeficient virus type - 1 (HIV - 1) - infected CD₄⁺ T lymphocytes [J]. PLoS ONE, 2014, 9 (4) : e93944.
- [5] Robinson N, McComb S, Mulligan R, et al. Type I interferon induces necroptosis in macrophages during infection with *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* [J]. Nat Immunol, 2012, 13 (10) : 954 - 962.
- [6] Wang X, Li Y, Liu S, et al. Direct activation of RIP3/MLKL - dependent necrosis by herpes simplex virus 1 (HSV - 1) protein ICP6 triggers host antiviral defense [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111 (43) : 15438 - 15443.
- [7] Vercammen D, Beyaert R, Denecker G, et al. Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor [J]. Journal of Experimental Medicine, 1998, 187 (9) : 1477 - 1485.
- [8] Vercammen D, Brouckaert G, Denecker G, et al. Dual signaling of the Fas receptor: initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways [J]. Journal of Experimental Medicine, 1998, 188 (5) : 919 - 930.
- [9] Chromik J, Safferthal C, Serve H, et al. Smac mimetic primes apoptosis - resistant acute myeloid leukaemia cells for cytarabine - induced cell death by triggering necroptosis [J]. Cancer Letters, 2014, 344 (1) : 101 - 109.
- [10] Kaiser W J, Sridharan H, Huang C, et al. Toll - like receptor 3 - mediated necrosis via TRIF, RIP3, and MLKL [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2013, 288 (43) : 31268 - 31279.
- [11] Feoktistova M, Geserick P, Kellert B, et al. cIAPs block Ripoptosome formation, a RIP1/caspase - 8 containing intracellular cell death complex differentially regulated by cFLIP isoforms [J]. Molecular Cell, 2011, 43 (3) : 449 - 463.
- [12] Tenev T, Bianchi K, Darding M, et al. The Ripoptosome, a signaling platform that assembles in response to genotoxic stress and loss of IAPs [J]. Molecular Cell, 2011, 43 (4) : 432 - 448.
- [13] Bonnet M C, Preukschat D, Welz P S, et al. The adaptor protein FADD protects epidermal keratinocytes from necroptosis in vivo and prevents skin inflammation [J]. Immunity, 2011, 35 (4) : 572 - 582.
- [14] Zhang J K, Zhang H B, Li J H, et al. RIP1 - mediated regulation of lymphocyte survival and death responses [J]. Immunologic Research, 2011, 51 (2/3) : 227 - 236.
- [15] Li J X, McQuade T, Siemer A B, et al. The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis [J]. Cell, 2012, 150 (2) : 339 - 350.
- [16] Sun L, Wang H, Wang Z, et al. Mixed lineage kinase domain - like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase [J]. Cell, 2012, 148 (1/2) : 213 - 227.
- [17] Cai Z, Jitkaew S, Zhao J, et al. Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF - induced necroptosis [J]. Nature Cell Biology, 2014, 16 (1) : 55 - 65.
- [18] Chen X, Li W J, Ren J M, et al. Translocation of mixed lineage kinase domain - like protein to plasma membrane leads to necrotic cell death [J]. Cell Research, 2014, 24 (1) : 105 - 121.
- [19] Wang H, Sun L, Su L, et al. Mixed lineage kinase domain - like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3 [J]. Molecular Cell, 2014, 54 (1) : 133 - 146.
- [20] Kearney C J, Cullen S P, Clancy D, et al. RIPK1 can function as an inhibitor rather than an initiator of RIPK3 - dependent necroptosis [J]. The FEBS Journal, 2014, 281 (21) : 4921 - 4934.
- [21] Orozco S, Yatim N, Werner M R, et al. RIPK1 both positively and negatively regulates RIPK3 oligomerization and necroptosis [J]. Cell Death and Differentiation, 2014, 21 (10) : 1511 - 1521.
- [22] Kaiser W J, Upton J W, Long A B, et al. RIP3 mediates the embryonic lethality of caspase - 8 - deficient mice [J]. Nature, 2011, 471 (7338) : 368 - 372.
- [23] Rickard J A, O'Donnell J A, Evans J M, et al. RIPK1 regulates RIPK3 - MLKL - driven systemic inflammation and emergency hematopoiesis [J]. Cell, 2014, 157 (5) : 1175 - 1188.
- [24] Upton J W, Kaiser W J, Mocarski E S. Virus inhibition of RIP3 - dependent necrosis [J]. Cell Host & Microbe, 2010, 7 (4) : 302 - 313.
- [25] Pop C, Oberst A, Drag M, et al. FLIP(L) induces caspase 8 activity in the absence of interdomain caspase 8 cleavage and alters substrate specificity [J]. Biochem J, 2011, 433 (3) : 447 - 57.
- [26] Oberst A, Dillon C P, Weinlich R, et al. Catalytic activity of the caspase - 8 - FLIP (L) complex inhibits RIPK3 - dependent necrosis [J]. Nature, 2011, 471 (7338) : 363 - 367.
- [27] Dillon C P, Oberst A, Weinlich R, et al. Survival function of the FADD - CASPASE - 8 - cFLIP(L) complex [J]. Cell Reports, 2012, 1 (5) : 401 - 407.
- [28] Moquin D M, McQuade T, Chan F K. CYLD deubiquitinates RIP1 in the TNF α - induced necrosome to facilitate kinase activation and programmed necrosis [J]. PLoS One, 2013, 8 (10) : e76841.
- [29] O'Donnell M A, Perez - Jimenez E, Oberst A, et al. Caspase 8 inhibits programmed necrosis by processing CYLD [J]. Nature Cell Biology, 2011, 13 (12) : 1437 - 1442.
- [30] Lu J V, Weist B M, Van Raam B J, et al. Complementary roles of Fas - associated death domain (FADD) and receptor interacting protein kinase - 3 (RIPK3) in T - cell homeostasis and antiviral immunity [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108 (37) : 15312 - 15317.
- [31] 张泽英, 张辉, 赵昕, 等. shRNA 沉默 C5aR 对 LPS 诱导的大鼠肾小管上皮细胞损伤的影响 [J]. 江苏农业学报, 2017, 33 (6) : 1327 - 1332.