

RIP1介导肿瘤坏死因子 α 诱导的L929细胞 凋亡与程序性坏死

常喜喜^{1,2} 成祥² 王丽丽² 王宇² 张毅^{1,2*} 陈国柱^{2*} 于继云^{2*}

(¹安徽医科大学研究生学院, 合肥 230032; ²军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要 肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF α)诱导的L929细胞死亡是研究细胞程序性坏死的重要模型, 但也有报道称, TNF α 处理后的L929细胞发生了凋亡。该研究以所在实验室保存的L929细胞(L929-A)和从商业化细胞库购买的L929细胞(L929-N)为模型, 进一步鉴定了TNF α 诱导的L929细胞死亡类型与调控机制。结果发现, TNF α 处理后的L929-A细胞中出现了凋亡特征, 且阻断胱冬肽酶(caspase)信号通路可显著抑制TNF α 诱导的L929-A细胞死亡, 但却促进TNF α 诱导的L929-N细胞死亡。此外, 受体相互作用蛋白1(receptor-interacting protein 1, RIP1)在TNF α 诱导的两种L929细胞死亡过程中都具有关键性的调控作用, 表明TNF α 处理后的L929-A细胞发生了RIP1依赖的细胞凋亡, 而L929-N细胞发生了程序性坏死(necroptosis)。同时, 启动细胞程序性坏死的关键蛋白RIP3(receptor-interacting protein 3)在L929-N细胞中表达水平显著高于L929-A细胞, 因此, RIP3的这种差异表达可能是决定两种L929细胞在TNF α 处理后发生不同类型细胞程序性死亡的重要原因。

关键词 L929细胞; 肿瘤坏死因子 α ; 细胞程序性坏死; 细胞凋亡; 受体相互作用蛋白1

RIP1 Mediates Apoptosis and Necroptosis Induced by Tumor Necrosis Factor Alpha in L929 Cells

Chang Xixi^{1,2}, Cheng Xiang², Wang Lili², Wang Yu², Zhang Yi^{1,2*}, Chen Guozhu^{2*}, Yu Jiyun^{2*}

(¹College of Graduate Student, Medical University of Anhui, Hefei 230032, China;

²Institute of Basic Medical Science, Academy of Military Medicine Science, Beijing 100850, China)

Abstract L929 cell death induced by tumor necrosis factor alpha (TNF α) has been identified as the well-established model of necroptosis, a new kind of programmed cell death. However, some other studies report that TNF α induces apoptosis but not necroptosis in L929 cells, so it is confused about the exact model of cell death induced by TNF α in L929 cells. In this research, we further explored L929 cell death and the involved mechanism in response to TNF α . Two kinds of L929 cell lines were used in this study, and named L929-A cells (derived from our laboratory cell bank) and L929-N cells (derived from commercial cell bank), respectively. Many kinds of apoptotic characters have been detected in L929-A cells followed TNF α treatment, including DNA ladder and activation of

收稿日期: 2016-04-23 接受日期: 2016-08-10

国家自然科学基金(批准号: 31201041)和国家重大科技专项重大新药创制项目(批准号: 2014ZX09304313-003)资助的课题

*通讯作者。Tel: 010-66930315, E-mail: zhangyi@nic.bmi.ac.cn; Tel: 010-66932316, E-mail: chengguozhu2002@126.com; Tel: 010-66931379, E-mail: yujiyun@126.com

Received: April 23, 2016 Accepted: August 10, 2016

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31201041) and National Key Technologies R&D Program for New Drugs (Grant No.2014ZX09304313-003)

*Corresponding authors. Tel: +86-10-66930315, E-mail: zhangyi@nic.bmi.ac.cn; Tel: +86-10-66932316, E-mail: chengguozhu2002@126.com; Tel: +86-10-66931379, E-mail: yujiyun@126.com

网络出版时间: 2016-10-28 13:32:03

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20161028.1332.004.html>

caspase signaling pathway. Moreover, suppressing activation of caspase signaling pathway with pan caspase inhibitor or knockdown of caspase 8 almost completely blocked TNF α -induced L929-A cell death, but significantly promoted L929-N cell death induced by TNF α . In addition, cell death of L929-A and L929-N cells induced by TNF α was significantly inhibited by RIP1 knockdown or RIP1 inhibitor. Therefore, TNF α induces RIP1-dependent apoptosis in L929-A cells, but necroptosis in L929-N cells. In addition, RIP3 expression level in L929-N cells is significantly higher than that in L929-A cells. As RIP3 is a key target protein in initiating necroptosis, so it is reasonable that the differential expression of RIP3 in L929-A and L929-N cells contributes to the different programmed cell death in these two cell lines in response to TNF α treatment.

Keywords L929 cell; tumor necrosis factor alpha; necroptosis; apoptosis; receptor-interacting protein 1 (RIP1)

细胞程序性坏死(programmed necrosis, necroptosis)是近年来鉴定的一种可调控的细胞程序性死亡,由于死亡细胞呈现出典型的细胞坏死特征(细胞器肿胀及细胞膜破裂等),从而被命名为细胞程序性坏死^[1-2]。与细胞凋亡一样,细胞程序性坏死也具有诱导因子和调控靶点,从而组成信号转导通路,其中肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF α)是目前研究最多的细胞程序性坏死诱导因子^[3]。

TNF α 是一种多效的细胞因子,既能在低水平时活化细胞内的存活信号通路,也能作为死亡配体来激活死亡受体凋亡信号通路,从而诱导细胞凋亡^[4]。近年来研究发现, TNF α 也是诱导细胞程序性坏死的重要因素,能够单独诱导L929细胞的程序性坏死^[5],也能在胱冬肽酶(caspase)抑制剂Z-VAD-FMK(Z-VAD)抑制细胞凋亡的情况下与SMAC模拟物(smac mimetic)联合诱导HT-29细胞程序性坏死^[6],或与放线菌酮联合诱导小鼠胚胎成纤维细胞程序性坏死^[7]。因此,细胞程序性坏死一般是在细胞凋亡被抑制的情况下发生的细胞死亡方式。

受体相互作用蛋白1(receptor-interacting protein 1, RIP1)是第一个被鉴定出来的细胞程序性坏死调控靶蛋白^[8],它是一种丝/苏氨酸蛋白激酶,在TNF α 及其他因素诱导细胞程序性坏死的过程中被磷酸化并激活,从而启动细胞程序性坏死^[9]。作为RIP1的别构抑制剂, Necrostatin-1(Nec-1)能够有效抑制RIP1的激酶活性及其介导的细胞程序性坏死,因而常与Z-VAD联合用于检测细胞的死亡类型,其中Z-VAD抑制的细胞死亡为细胞凋亡,而Z-VAD促进且Nec-1抑制的细胞死亡为程序性坏死^[2,10]。

L929细胞是一种小鼠成纤维细胞,因其对TNF α 诱导的细胞杀伤特别敏感,故常用于TNF α 效价的检测。部分研究结果发现, Z-VAD能够有效

抑制TNF α 诱导的L929细胞死亡,因而L929细胞在TNF α 处理后发生了凋亡^[11]。但也有报道发现, Z-VAD并不抑制TNF α 诱导的L929细胞死亡,反而促进细胞死亡,所以L929细胞在TNF α 处理后发生了细胞程序性坏死^[12]。因此, L929细胞在TNF α 处理后发生了何种类型的细胞死亡目前存在争议。本研究以不同来源的L929细胞为模型,对这一现象进行深入研究,从而阐明L929细胞在TNF α 处理后发生凋亡或程序性坏死的机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

本实验室培养并保存的L929细胞购自商业化细胞库,传代多次,命名为L929-A细胞。购自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心的L929细胞,自购买后传自第7代,命名为L929-N细胞。慢病毒包装细胞293TN购自System Biosciences公司。其余试剂有: TNF α (Peprotech公司)、Z-VAD-FMK(Medchem Express公司)、Necrostatin-1(Sellek公司)、Q-VD-OPH(Calbiochem公司)、DMEM细胞培养液(Gibco公司)、胎牛血清(天津康源生物技术有限公司)、凋亡检测试剂盒(北京宝赛生物技术有限公司)、DNA ladder检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)、PARP抗体、cleaved caspase 3抗体及actin抗体(Cell Signaling Technology公司)、RIP1抗体(BD Bioscience公司)、caspase 8抗体(Enzo Lifescience公司)、二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司)、BCA蛋白定量试剂盒(Pierce公司)、ECL(上海天能科技有限公司)、Chemifect转染试剂及慢病毒包装试剂盒(北京丰锐生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与药物处理 L929-A与L929-N细胞

使用含10%胎牛血清的高糖DMEM培养基(Gibco公司), 在含5% CO₂、37 °C及饱和湿度条件下培养, 并利用含10% DMSO及30%胎牛血清的冻存液冻存在液氮罐中。胰蛋白酶消化法收集细胞并计数, 按照一定数目接种于6孔板, 24 h后加入药物或TNF α 处理。

1.2.2 MTT比色实验 胰蛋白酶消化法收集细胞, 计数, 接种于96孔板, 每孔1 000个细胞, 并设置只有培养液但没有细胞的空白孔。在测定时间点, 向培养液中加入20 μ L MTT存储液(20 mg/mL), 继续培养4 h, 弃培养液, 加入150 μ L DMSO, 震荡并溶解细胞内结晶, 分光光度计测定492 nm处吸光度值(*D values*)。

1.2.3 细胞死亡检测 首先, 在显微镜下观察细胞形态变化并拍照, 判断细胞死亡情况, 再利用流式细胞术定量检测细胞死亡率。因此, 将接种细胞的培养板放置于倒置显微镜上, 打开显微镜及拍照系统与软件, 拍照并整理。拍照完毕后, 利用胰蛋白酶消化法收集细胞, PBS洗涤1次, 加入细胞凋亡检测试剂盒中的Annexin-FITC染液染色10 min, 再加入碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色5 min, 流式细胞术检测, 用细胞存活率(cell survival ratio, %)反映细胞存活与死亡情况。

1.2.4 蛋白印迹实验(Western blot) 胰蛋白酶消化法收集细胞, 加适量Laemmli Sample Buffer(Bio-Rad公司)充分裂解细胞, 100 °C加热10 min, 冰水混合物中冷却5 min, 4 °C、10 000 \times g离心5 min, 弃沉淀, 上清为含有蛋白质的细胞裂解液。用BCA蛋白定量试剂盒检测细胞裂解液中的蛋白质浓度, 每个样品中蛋白质上样量为60 μ g, 经SDS-PAGE电泳后, 转移至PVDF膜, 用含5%脱脂奶粉的TBST溶液室温封闭1 h, 加一抗(按照说明书进行稀释)孵育, 4 °C过夜, TBST洗涤3次, 每次5 min, 加入相应二抗(辣根过氧化物酶标记), 室温孵育1 h, TBST洗涤2次, 用ECL化学发光液处理, 天能化学发光成像系统显影并拍照。

1.2.5 DNA ladder分析 利用上海碧云天生物技术有限公司的DNA ladder提取试剂盒来提取DNA。具体操作是: 利用胰蛋白酶消化法收集不同处理组的细胞(包括培养液中漂浮的死细胞), PBS洗涤后重悬, 加入RNase A孵育, 降解RNA。加入蛋白酶K孵育, 降解蛋白; 加入裂解液, 裂解细胞, 释放DNA; 加入乙醇, 沉淀DNA, 并转移到DNA纯化柱上, 洗涤液洗涤DNA纯化柱; 加入洗脱液, 溶解并洗脱DNA。利用1%的琼脂糖凝胶分析DNA, DL2000 marker作为

对照, 采用天能凝胶成像系统拍照并分析。

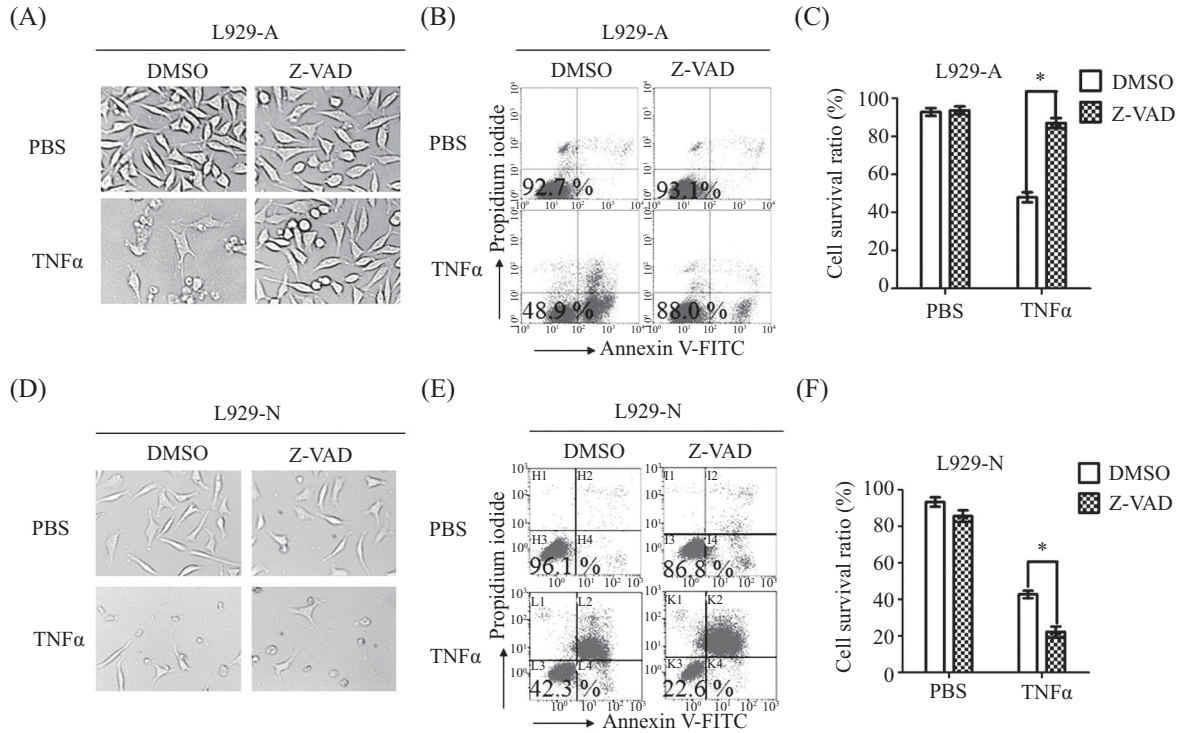
1.2.6 慢病毒介导的胱冬肽酶8及RIP1敲低 以pLKO-TRC质粒为模板, 构建胱冬肽酶8 shRNA质粒及RIP1 shRNA质粒, 靶序列分别为: 胱冬肽酶8 shRNA(5'-GAA TGG AAC CTG GTA TAT T-3')和RIP1 shRNA(5'-GCC TGA GAA TAT CCT CGT T-3')。利用北京丰锐生物技术公司的慢病毒包装试剂盒包装慢病毒。具体过程是: 胰蛋白酶消化法收集293TN细胞(System Biosciences公司), 传代接种于培养皿, 24 h后进行转染实验。将胱冬肽酶8 shRNA质粒及RIP1 shRNA质粒分别与慢病毒包装质粒混合并加入OPTI-MEM溶液重悬, 再加入转染试剂Chemifect(北京丰锐生物技术有限公司), 混合, 室温静置30 min以形成转染复合物, 转移到培养液中, 48 h后收取培养液, 离心, 上清即为包含慢病毒颗粒的培养液。按照一定比例将含有慢病毒颗粒的培养液上清加入到正在培养的细胞中, 并加入Polybrene, 轻轻混匀, 12 h后换液, 72 h后收集细胞, 利用Western blot检测胱冬肽酶8与RIP1敲低情况, 或接种于6孔板检测TNF α 杀伤情况。

1.2.7 统计学分析 所有实验独立重复3次以上, 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 应用Graphpad Prism 5对数据进行统计学分析。不同处理组之间的细胞存活率(cell survival, %)数据采用 t 检验。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Z-VAD对TNF α 诱导的L929-A和L929-N细胞死亡的影响

利用本实验室保存的L929细胞(L929-A)及从中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心购买的L929细胞(L929-N)为模型, 我们进一步检测了TNF α 诱导的L929细胞死亡类型。结果发现, TNF α 处理L929-A及L929-N细胞72 h后, 两种细胞都发生了明显的死亡现象, 表现为细胞皱缩, 破碎形成大量细胞碎片(图1A和图1D)。Z-VAD是泛胱冬肽酶抑制剂, 能够抑制细胞凋亡, 促进细胞程序性坏死。本研究发现, Z-VAD显著抑制TNF α 诱导的L929-A细胞死亡, 但对TNF α 诱导L929-N细胞死亡没有阻断效果(图1A和图1D)。流式细胞术定量检测结果表明, 在L929-A细胞中, TNF α 单独及与Z-VAD联合处理组的细胞存活率分别为47.30% \pm 3.76%和



A、D: Z-VAD在TNF α 诱导的L929-A和L929-N细胞死亡过程中调控作用。B、E: Z-VAD抑制TNF α 诱导的L929-A细胞死亡, 但促进TNF α 诱导的L929-N细胞死亡。C、F: 细胞存活率的统计分析。对不同处理组L929-A和L929-N细胞的存活率数据进行统计分析, $*P < 0.05$ 。

A,D: the effect of Z-VAD on TNF α -induced cell death in L929-A and L929-N cells; B,E: Z-VAD inhibits TNF α -induced cell death in L929-A cells but promotes TNF α -induced cell death in L929-N cells; C,F: statistical analysis of cell survival ratio. *t* test was used to determine the significance between different group, $*P < 0.05$.

图1 Z-VAD对TNF α 诱导的L929-A和L929-N细胞死亡的影响

Fig.1 The effects of Z-VAD on TNF α -induced cell death in L929-A and L929-N cells

87.67% \pm 3.51%, 两组相比差异显著($P < 0.05$)(图1B和图1C), 表明Z-VAD显著抑制TNF α 诱导的L929-A细胞死亡, L929-A细胞发生了胱冬肽酶依赖的细胞凋亡。但在L929-N细胞中, TNF α 及TNF α 与Z-VAD联合处理组的细胞存活率分别为42.76% \pm 2.04%与22.03% \pm 3.02%, 两组之间差异显著($P < 0.05$)(图1E和图1F), 表明Z-VAD促进了TNF α 诱导的L929-N细胞死亡, L929-N细胞发生了细胞程序性坏死。

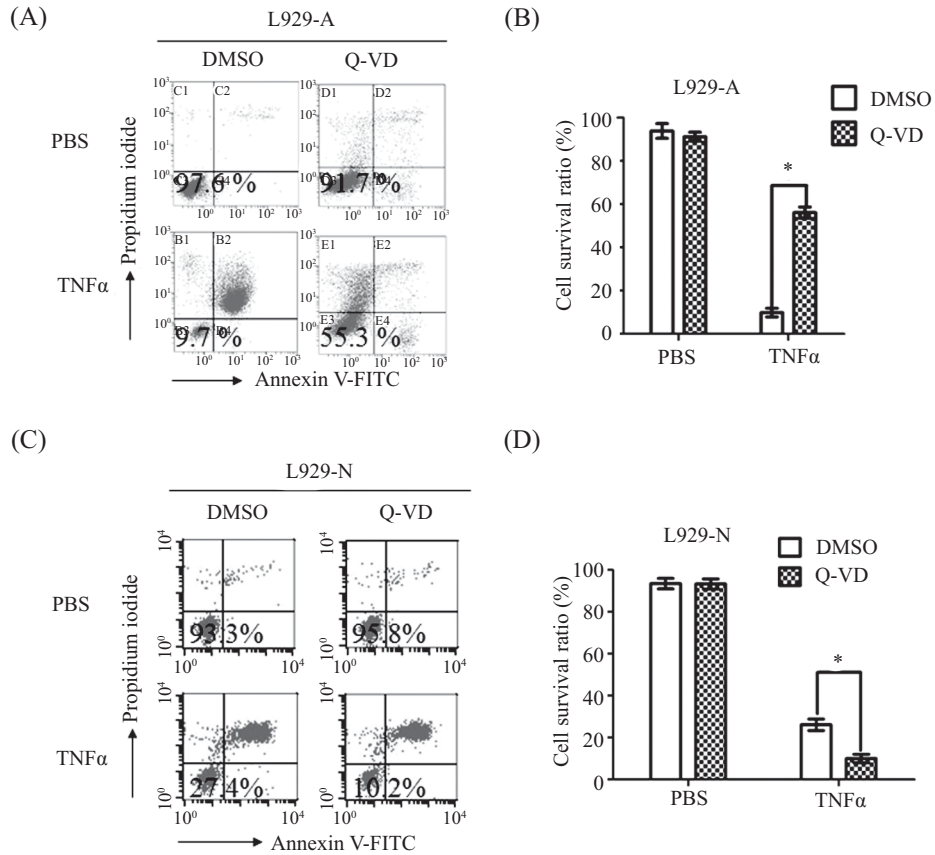
2.2 Q-VD-OPH对TNF α 诱导L929-A及L929-N细胞死亡的差异调控

为了进一步验证TNF α 诱导的L929-A及L929-N细胞死亡类型之间的差异, 我们检测了另一种泛胱冬肽酶抑制剂Q-VD-OPH(Q-VD)对TNF α 诱导的L929-A及L929-N细胞死亡的影响。结果发现, 在L929-A细胞中, TNF α 单独处理组及与Q-VD联合处理组的细胞存活率分别为9.90% \pm 2.01%及56.13% \pm 2.59%, 两组之间差异显著($P < 0.05$)(图2A和图2B), 表明Q-VD显著抑制TNF α 诱导的L929-A细胞死亡。但在L929-N细胞中,

TNF α 单独及与Q-VD联合处理组的细胞存活率分别为26.13% \pm 2.73%及9.63% \pm 2.52%, 两组实验结果之间差异显著($P < 0.05$)(图2C和图2D), 表明Q-VD显著促进TNF α 诱导的L929-N细胞死亡。因此, Q-VD对TNF α 诱导的L929-A及L929-N细胞死亡的差异调控进一步表明TNF α 处理后, L929-A细胞发生了凋亡, 而L929-N细胞发生了程序性坏死。

2.3 TNF α 处理后L929-A及L929-N细胞中DNA ladder的变化

凋亡细胞中的染色体能被核酸内切酶剪切, 形成以核小体为基本单位的剪切体, 琼脂糖电泳检测结果中呈现DNA ladder, 是鉴定细胞凋亡的重要方法之一, 而细胞程序性坏死则没有此生化特征。本研究发现, TNF α 处理后的L929-A细胞中检测到明显的DNA ladder, 且DNA ladder的量随着TNF α 处理时间的延长而增加, 表现出一定的时间依赖性(图3A)。但在L929-N细胞中没有检测到DNA ladder(图3B)。因此, DNA ladder实验结果表明, TNF α 处理后L929-

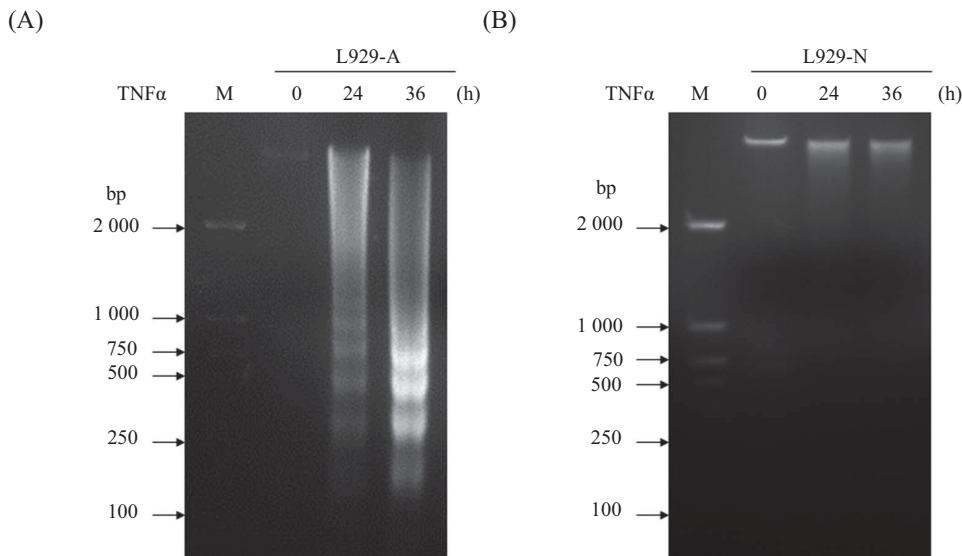


A、C: Q-VD抑制TNF α 诱导的L929-A细胞死亡, 但促进TNF α 诱导的L929-N细胞死亡; B、D: 细胞存活率的统计分析。不同处理组细胞存活率之间进行t检验分析, * $P < 0.05$ 。

A,C: Q-VD inhibits TNF α -induced L929-A cell death but promotes TNF α -induced L929-N cell death; B,D: statistical analysis of cell survival ratio. *t* test was used to determine the significance between different group, * $P < 0.05$ 。

图2 Q-VD对TNF α 诱导的L929-A和L929-N细胞死亡的影响

Fig.2 The effects of Q-VD on TNF α -induced cell death in L929-A and L929-N cells



A、B: TNF α 分别处理L929-A和L929-N细胞24 h和36 h, 胰蛋白酶消化法收集细胞, 提取DNA, 1%琼脂糖凝胶检测。M: DL2000 marker。

A,B: L929-A and L929-N cells were treated with TNF α at the indicated time, and then harvested to extract DNA. 1% agarose gel was used to detect DNA ladder. M: DL2000 marker.

图3 TNF α 处理后L929-A和L929-N细胞中DNA ladder的变化

Fig.3 The changes of DNA ladder in L929-A and L929-N cells treated with TNF α

A细胞发生了凋亡。

2.4 TNF α 对L929-A与L929-N细胞中胱冬肽酶信号通路的影响

胱冬肽酶信号通路活化是启动细胞凋亡的主要因素,也是判断细胞凋亡的重要标志,但在细胞程序性坏死过程中并不发生。因此,我们检测了TNF α 处理后L929-A和L929-N细胞中胱冬肽酶信号通路的活化情况,结果发现,TNF α 处理后,L929-A细胞中胱冬肽酶3及其底物PARP蛋白发生了明显的剪切,且这种剪切能够被Z-VAD及Q-VD所阻断或减轻(图4A和图4B)。但在TNF α 处理后的L929-N细胞中并没有检测到胱冬肽酶3及PARP的剪切(图4A)。因此,TNF α 能够活化L929-A细胞中的胱冬肽酶信号通路,但对L929-N细胞中的胱冬肽酶信号通路没有活化作用,表明TNF α 处理后L929-A细胞发生了胱冬肽酶依赖的凋亡,而L929-N细胞发生了胱冬肽酶非依赖的细胞死亡。

2.5 胱冬肽酶8在TNF α 诱导的L929-A及L929-N细胞死亡中的调控作用

胱冬肽酶8是死亡配体(如TNF α)诱导细胞凋亡信号转导通路中的重要调控靶点,通过活化其下游的效应胱冬肽酶(如胱冬肽酶3、6和7)来启动细胞凋亡,但对细胞程序性坏死具有负调控作用^[3]。本研究利用慢病毒介导的RNA干扰技术有效地敲低了L929-A与L929-N细胞中的胱冬肽酶8(图5A)。在L929-A细胞中,TNF α 处理后的慢病毒对照组及胱冬肽酶8敲低组细胞的存活率分别是28.77% \pm 3.03%及82.87% \pm 2.01%,两组之间差异显著($P < 0.05$)(图5B和图5C)。但在L929-N细胞中,TNF α 处理后慢病毒对照组及胱冬肽酶8敲低组的细胞存活率分别是

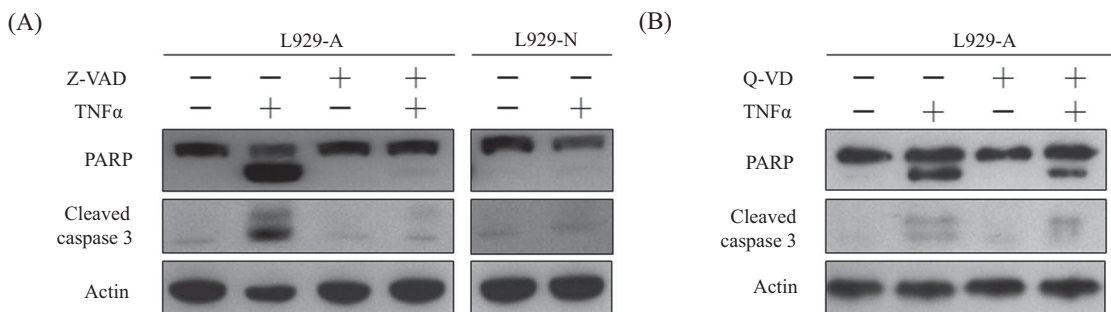
50.53% \pm 2.50%及49.63% \pm 3.50%,两组之间没有显著差异($P = 0.7203$)(图5D和图5E)。这些结果表明,胱冬肽酶8的敲低显著抑制TNF α 诱导的L929-A细胞死亡,但对TNF α 诱导的L929-N细胞死亡没有阻断作用,进一步表明,TNF α 处理后,L929-A细胞发生了凋亡,而L929-N细胞发生了胱冬肽酶非依赖的细胞死亡。

2.6 Nec-1对TNF α 诱导的L929-A及L929-N细胞死亡的影响

Nec-1是RIP1蛋白激酶的别构抑制剂,能够抑制RIP1的激酶活性及其介导的细胞程序性坏死。本研究检测了Nec-1对TNF α 诱导的L929-A和L929-N细胞死亡的调控作用,结果发现,在L929-A细胞中,TNF α 单独及与Nec-1联合处理组的细胞存活率分别为9.93% \pm 2.61%及89.87% \pm 3.58%,两组之间差异显著($P < 0.05$)(图6A和图6B)。在L929-N细胞中,TNF α 单独及与Nec-1联合处理组的细胞存活率分别为18.21% \pm 2.55%及94.03% \pm 2.01%,两组之间差异显著($P < 0.05$)(图6C和图6D)。以上结果表明,在L929-A及L929-N细胞中,Nec-1都显著抑制TNF α 诱导的细胞死亡。因此,在L929-A细胞中,RIP1介导了TNF α 诱导的细胞凋亡,但在L929-N细胞中,RIP1启动了TNF α 诱导的细胞程序性坏死。

2.7 RIP1对TNF α 诱导的L929-A细胞凋亡的影响

为了进一步验证RIP1在TNF α 诱导L929-A细胞凋亡中的调控作用,我们检测了RIP1敲低对TNF α 诱导的L929-A细胞死亡的影响。结果发现,慢病毒介导的RNA干扰技术能够显著敲低L929-A细胞中的RIP1蛋白质水平(图7A)。在TNF α 处理后,慢病毒对照组及RIP1敲低组的细胞存活率分别是



A: TNF α 活化L929-A细胞中的胱冬肽酶信号通路,但不活化L929-N细胞中的胱冬肽酶信号通路; B: Q-VD抑制TNF α 对L929-A细胞中胱冬肽酶信号通路的活化。

A: TNF α induces activation of caspase signaling pathway in L929-A cells but not L929-N cells; B: Q-VD suppresses TNF α -induced activation of caspase signaling pathway in L929-A cells.

图4 TNF α 对L929-A和L929-N细胞中胱冬肽酶信号通路活化的影响

Fig.4 The effects of TNF α on the activation of caspase pathway in L929-A and L929-N cells

19.23%±3.53%和52.47%±3.14%, 两组之间差异显著 ($P<0.05$)(图7B和图7C), 表明RIP1的敲低显著抑制TNF α 诱导的L929-A细胞凋亡。

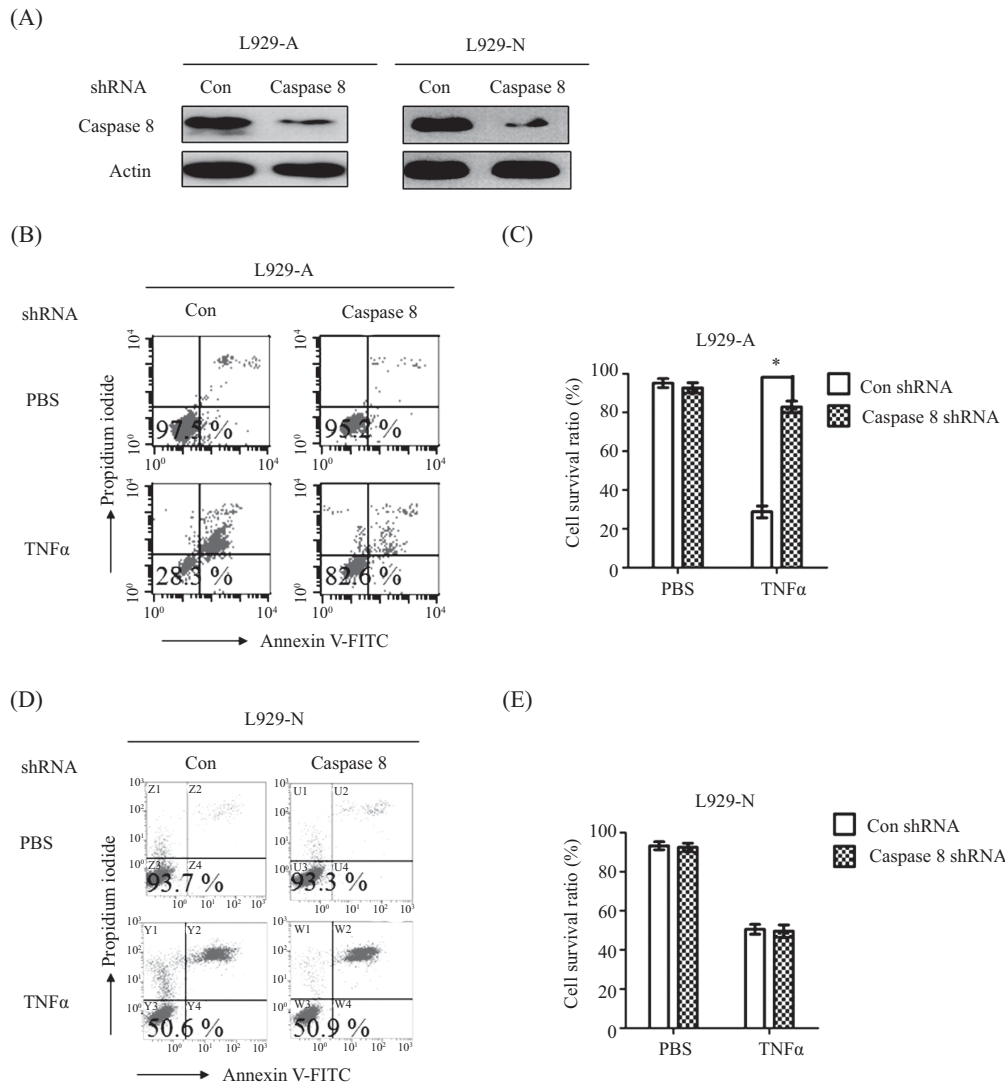
2.8 RIP1对TNF α 诱导的胱冬肽酶信号通路活化的调控作用

为了探索RIP1在TNF α 诱导的L929-A细胞凋亡过程中的调控机制, 我们检测了RIP1对TNF α 活化的胱冬肽酶信号通路的影响。结果发现, 在L929-A细胞中, RIP1抑制剂Nec-1可显著抑制TNF α 诱导的胱冬肽酶3及其底物PARP的剪切(图8A)。同时, 在RIP1敲低的L929-A细胞中, TNF α 诱导的胱冬肽酶3

及其底物PARP的剪切程度也显著减少(图8B)。因此, 在TNF α 诱导L929-A细胞凋亡过程中, RIP1能够介导胱冬肽酶信号通路的活化, 从而启动细胞凋亡。

2.9 L929-A与L929-N细胞生长速度的差异

为了检测L929-A细胞与L929-N细胞之间的差异, 我们利用MTT比色技术检测了二者生长速度的差异。如图9所示, 以相同数目接种于96孔板的L929-A与L929-N细胞在接种第2 d后开始增殖, 但细胞数量无显著差异, 随后进入对数生长期, L929-A细胞的增殖速度显著快于L929-N细胞。

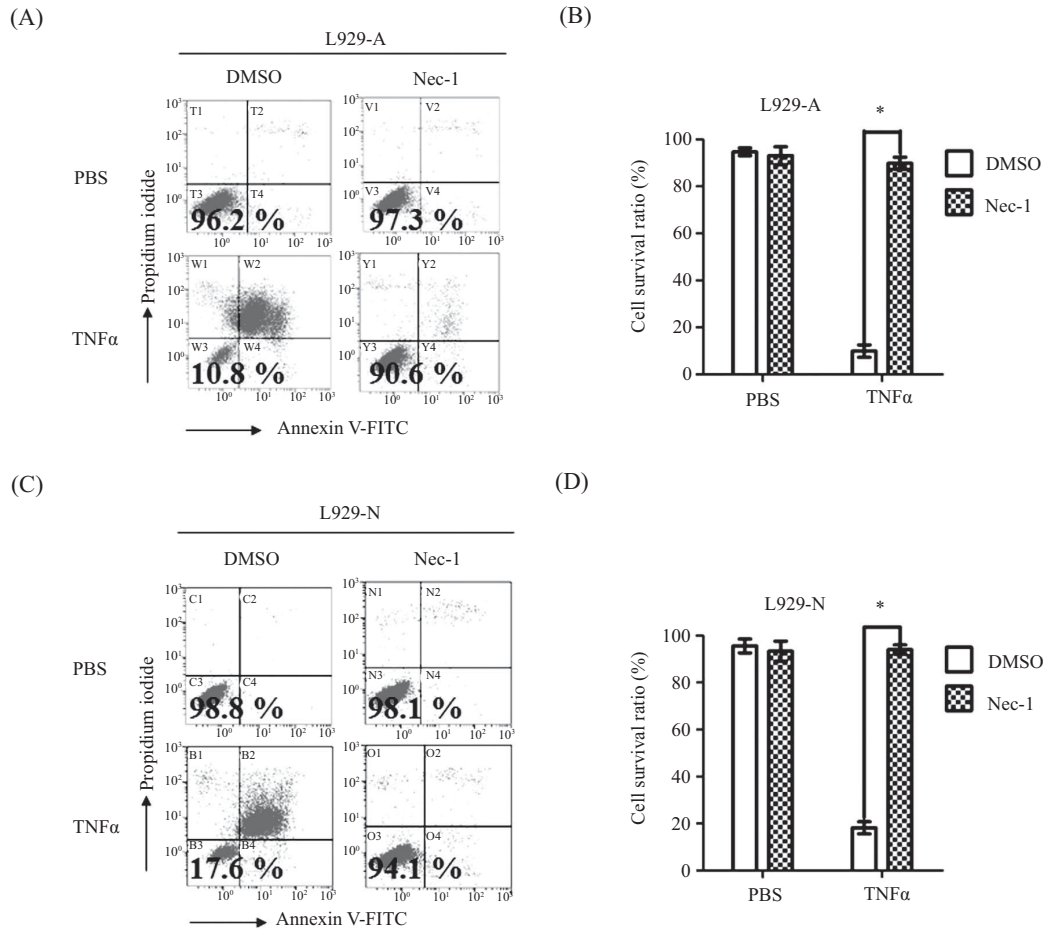


A: 慢病毒介导的胱冬肽酶8敲低; B、D: 胱冬肽酶8敲低抑制TNF α 诱导的L929-A细胞死亡, 但对TNF α 诱导的L929-N细胞死亡的没有影响; C、E: 细胞存活率的统计分析。不同处理组L929-A和L929-N细胞的存活率数据进行t检验分析, $*P<0.05$ 。

A: knockdown of caspase 8 mediated by caspase 8 shRNA lentivirus. B,D: knockdown of caspase 8 significantly inhibits TNF α -induced cell death in L929-A cells but not L929-N cells. C,E: statistical analysis of cell survival ratio. *t* test was used to determine the significance between different group, $*P<0.05$.

图5 胱冬肽酶8在TNF α 诱导的L929-A和L929-N细胞死亡过程中的调控作用

Fig.5 The role of caspase 8 in regulating TNF α -induced cell death in L929-A and L929-N cells

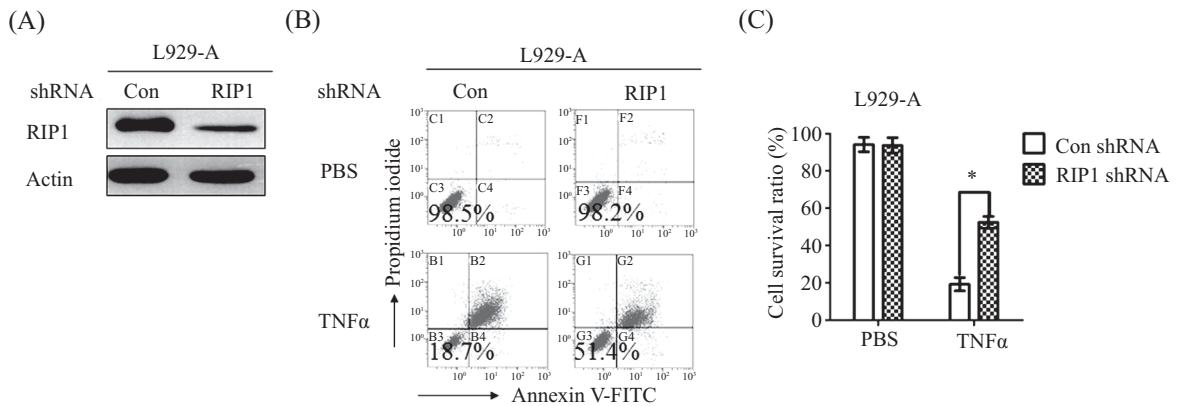


A、C: Nec-1抑制TNF α 诱导的L929-A和L929-N细胞死亡; B、D: 细胞存活率的统计分析。不同处理组L929-A和L929-N细胞的存活率数据进行t检验分析, * $P < 0.05$ 。

A,C: Nec-1 inhibits TNF α -induced cell death in both L929-A and L929-N cells; B,D: statistical analysis of cell survival ratio. *t* test was used to determine the significance between different group, * $P < 0.05$ 。

图6 Nec-1对TNF α 诱导的L929-A和L929-N细胞死亡的影响

Fig.6 The effect of Nec-1 on TNF α -induced cell death in L929-A and L929-N cells

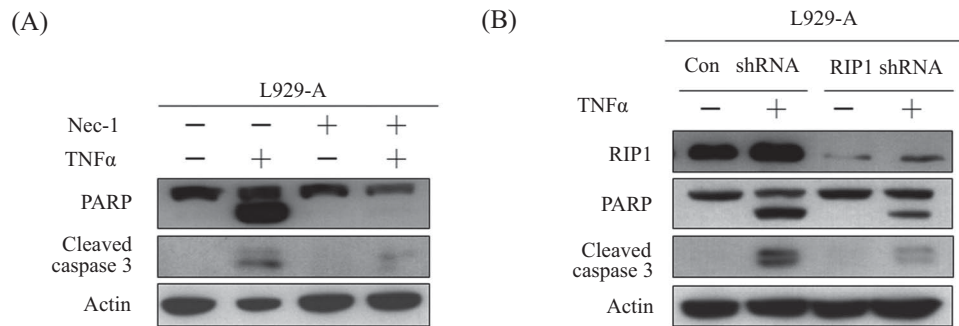


A: 慢病毒介导的RIP1敲低; B: RIP1敲低抑制TNF α 诱导的L929-A细胞死亡; C: 细胞存活率的统计分析。不同处理组L929-A细胞的存活率数据进行t检验分析, * $P < 0.05$ 。

A: knockdown of RIP1 mediated by RIP1 shRNA lentivirus; B: RIP1 knockdown inhibits TNF α -induced L929-A cell death; C: statistical analysis of cell survival ratio. *t* test was used to determine the significance between different group, * $P < 0.05$ 。

图7 RIP1敲低对TNF α 诱导的L929-A细胞死亡的影响

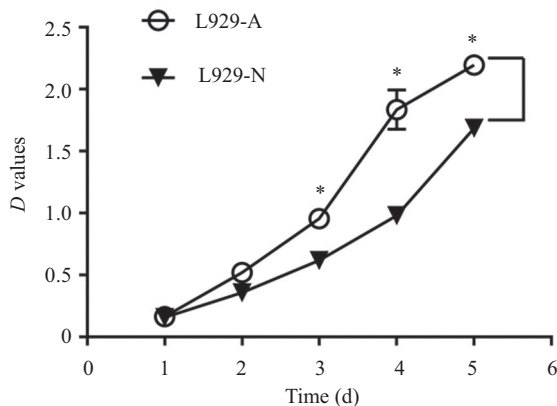
Fig.7 The effect of RIP1 knockdown on TNF α -induced L929-A cell death



A: Nec-1抑制TNF α 对L929-A细胞中胱冬肽酶信号通路的活化; B: 敲低RIP1抑制TNF α 对L929-A细胞中胱冬肽酶信号通路的活化。
A: Nec-1 suppresses TNF α -induced activation of caspase signaling pathway in L929-A cells; B: knockdown of RIP1 inhibits TNF α -induced activation of caspase signaling pathway in L929-A cells.

图8 RIP1对TNF α 诱导的胱冬肽酶信号通路的活化影响

Fig.8 The effect of RIP1 on activation of caspase signaling pathway induced by TNF α



L929-A与L929-N细胞接种于96孔板, 利用MTT比色技术, 连续5 d测定96孔板中不同细胞组的吸光度(D)值, 并统计分析, * $P < 0.05$, 与L929-N细胞比较。

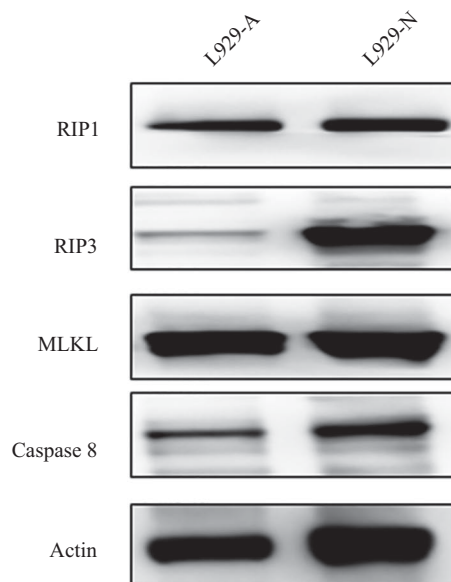
L929-A and L929-N cells were seeded in 96-well plate, and then MTT assay was used to determine the *D* values of specific wells in 96-well plates. Graphpad prism was used to analyze *D* values and draw graph of growth curve, * $P < 0.05$ vs L929-N cells.

图9 L929-A和L929-N细胞的生长曲线

Fig.9 Growth curve of L929-A and L929-N cells

2.10 L929-A与L929-N细胞中细胞程序性死亡相关调控蛋白的表达水平差异

为了进一步研究TNF α 诱导的L929-A与L929-N细胞程序性死亡的差异调控机制, 我们检测了两种细胞中细胞程序性坏死与细胞凋亡相关调控蛋白质的水平。如图10显示, 3个调控细胞程序性坏死的靶蛋白中, RIP1与MLKL(mixed lineage kinase domain-like protein)在两种细胞之间的水平没有显著差异, 但受体相互作用蛋白3(receptor-interacting protein 3, RIP3)在L929-N细胞中的水平显著升高。此外, 细胞凋亡调控蛋白胱冬肽酶8的表达水平在L929-N细胞中也略有升高。



收集L929-A与L929-N细胞, Laemmli buffer裂解, Western blot检测RIP1、RIP3、MLKL和胱冬肽酶8的表达, actin作为对照。

L929-A and L929-N cells were collected and then lysed by Laemmli buffer. Western blot was used to detect RIP1, RIP3, MLKL and caspase 8. Actin was used as loading control.

图10 细胞程序性死亡相关调控蛋白在L929-A与L929-N细胞中的表达水平变化

Fig.10 Change of the levels of proteins associated with programmed cell death in L929-A and L929-N cells

3 讨论

细胞程序性坏死与细胞凋亡都是可调控的细胞程序性死亡, 虽然二者共享某些刺激因子和调控蛋白质, 但却具有各自的形态特征、调控靶点与信号转导通路, 且细胞程序性坏死一般是在细胞凋亡被抑制的情况下发生的细胞程序性死亡, 因此, 二者虽然相互关联, 但却是完全不同的细胞程序性死亡^[10,13]。

鉴于L929细胞对TNF α 诱导的细胞杀伤异常敏感,因此常用于TNF α 的效价检测,但TNF α 通过何种方式来诱导L929细胞死亡目前尚存在争议。本研究发现, TNF α 处理两种L929后, L929-A细胞中的胱冬肽酶信号通路发生活化, 并出现DNA ladder等细胞凋亡特征, 而敲低胱冬肽酶8能够抑制TNF α 诱导的L929-A细胞死亡, 且泛胱冬肽酶抑制剂Z-VAD与Q-VD也能够阻断TNF α 对L929-A细胞的杀伤, 充分表明在L929-A细胞中, TNF α 通过活化胱冬肽酶8及其下游的信号通路来诱导细胞凋亡。以往研究发现, TNF α 单独或与其他化合物(如放线菌素或放线菌酮等)联合诱导L929细胞死亡过程中出现染色质凝集和DNA ladder等现象^[14-16]。而流式细胞术检测结果表明, TNF α 处理后的L929细胞中出现明显的Sub G₁峰^[17]。TUNEL实验则发现, TNF α 处理后的L929细胞中阳性细胞比例显著升高^[18]。这些结果表明, 在TNF α 处理后的L929细胞中出现了明显的凋亡特征。此外, Piret等^[11]也发现, TNF α 能够活化L929细胞内的胱冬肽酶信号通路, 而Z-VAD能够阻断TNF α 诱导的L929细胞死亡。Moshnikova等^[19]则发现, 在L929细胞中过表达抗凋亡基因*Bcl-2*及*Bcl-xL*能够减少TNF α 诱导的细胞死亡, 而过表达促凋亡基因*Bax*则促进TNF α 对细胞的杀伤。这些研究结果表明, TNF α 通过活化胱冬肽酶信号通路来诱导L929细胞凋亡, 与本研究L929-A细胞的实验结果一致, 从细胞的形态特征、生化特征、胱冬肽酶信号通路活化及凋亡靶基因的调控作用等不同层次证明了TNF α 处理后的L929细胞发生了凋亡。

但本研究也发现, 在TNF α 处理后的L929-N细胞中并没有检测到胱冬肽酶信号通路活化及DNA ladder等细胞凋亡特征, 且泛胱冬肽酶抑制剂并没有抑制TNF α 诱导的L929-N细胞死亡, 反而促进了TNF α 的杀伤效果, 表明TNF α 诱导的L929-N细胞死亡是细胞程序性坏死。Vercammen等^[12,20]也发现, TNF α 处理后的L929细胞中出现坏死样的形态特征, 而泛胱冬肽酶抑制剂Z-VAD能够促进TNF α 诱导的L929细胞死亡, 过表达胱冬肽酶8抑制蛋白CrmA也能够取得类似结果。这一现象在后续的研究中得到了进一步验证, 并且发现细胞内活性氧浓度的升高及MAPK(mitogen-activated protein kinase)信号通路的活化参与调控TNF α 诱导的L929细胞程序性坏死^[21-23]。鉴于TNF α 单独及与泛胱冬肽酶抑制剂联合均能诱

导L929细胞程序性坏死, 该模型成为细胞程序性坏死研究中的经典模型, 被广泛用于细胞程序性坏死的靶点筛选与调控机制研究^[5,24-25]。因此, 以上文献报道表明, TNF α 诱导了L929细胞程序性坏死, 而不是凋亡, 进一步验证了本研究中L929-N细胞的实验结果。

L929-A与L929-N同为L929细胞, 但在TNF α 处理后分别发生凋亡与程序性坏死两种完全不同的细胞程序性死亡, 而我们也发现, L929-A细胞的生长速度显著快于L929-N细胞, 证明两种细胞之间存在很大差异, 可能导致两种细胞在应对TNF α 刺激时产生不同类型的细胞死亡。TNF α 是一种多功能的炎症细胞因子, 与细胞膜上的受体(TNF α receptor, TNFR)结合后, 导致TNFR细胞内结构域构象改变, 招募TRADD(TNF receptor 1-associated death domain)及RIP1等蛋白结合, 形成复合体, 激活MAPK及NF- κ B信号通路, 促进细胞增殖与分化^[3,26-27]。当RIP1与TRADD从TNFR解离并进入细胞质后, 能够与FADD(fas-associated death domain protein)及胱冬肽酶8结合形成新的复合体, 从而活化胱冬肽酶8及其下游的效应胱冬肽酶(胱冬肽酶3、6和7), 诱导细胞凋亡^[28-29]。但在RIP3高表达的细胞中, RIP1与RIP3结合, 形成坏死复合体(necrosome), 并通过直接或间接的相互磷酸化而激活, 进而活化RIP3下游靶蛋白MLKL, 促进其多聚化与细胞膜转移, 破坏细胞膜的结构, 诱导细胞程序性坏死^[6,30-32]。因此, 细胞中RIP3的表达水平是决定细胞能否发生程序性坏死的关键因素^[33]。本研究发现, L929-N细胞中的RIP3表达水平显著高于L929-A细胞, 而RIP1与MLKL等细胞程序性坏死靶蛋白的表达水平在两种细胞之间并没有明显的变化, 因此, L929-N细胞中RIP3蛋白质的高水平表达可能是决定L929-N细胞在TNF α 处理后发生程序性坏死的重要原因, 而RIP3表达水平较低的L929-A细胞在TNF α 处理后通过活化胱冬肽酶信号通路发生凋亡。近期的部分研究也表明, 在Hela细胞中过表达RIP3可以启动TNF α 诱导的细胞程序性坏死^[34-35], 而RIP3可以不依赖RIP1而单独介导病毒诱导的细胞程序性坏死^[36], 从而进一步表明RIP3表达水平差异可能是导致L929-A和L929-N细胞在TNF α 处理后分别发生凋亡与程序性坏死的重要原因。

RIP1是最早鉴定的细胞程序性坏死靶蛋白, 具

有丝/苏氨酸蛋白激酶活性, 其别构抑制剂Nec-1能够抑制RIP1的激酶活性及其介导的细胞程序性坏死, 因而常用于细胞程序性坏死的鉴定^[37-38]。本研究发现, Nec-1不但抑制TNF α 诱导的L929-N细胞的程序性坏死, 也能够抑制TNF α 诱导的L929-A凋亡。此外, 敲低L929-A细胞中的RIP1也能够抑制TNF α 诱导的胱冬肽酶信号通路活化及细胞凋亡, 从而表明RIP1在TNF α 诱导L929-A细胞凋亡过程中也具有重要调控作用。Micheau等^[29]发现, 在TNF α 诱导H1080细胞凋亡的过程中, RIP1能够与TRADD、FADD及胱冬肽酶8结合形成蛋白复合体, 从而促进胱冬肽酶信号通路的活化及后续的细胞凋亡。Wang等^[28]发现, TNF α 与SMAC模拟物联合处理Panc-1细胞后, 细胞发生了明显的凋亡, 且敲低RIP1的表达则能够显著提高细胞的存活率, 表明TNF α 与SMAC模拟物联合诱导了RIP1依赖的细胞凋亡。但是, 敲低RIP1并不抑制TNF α 与放线菌酮联合诱导的Panc-1细胞凋亡, 表明RIP1只是在某些特定因素诱导细胞凋亡的过程中发挥重要的调控作用^[28]。近期研究也发现, RIP1在TNF α 与SMAC模拟物或TAK抑制剂联合诱导细胞凋亡过程中都具有重要的调控作用^[39-41]。因此, RIP1并不仅仅是调控细胞程序性坏死的关键靶点, 在某些因子诱导的细胞凋亡过程中也具有重要的调控作用。

本研究发现, L929-A和L929-N两种L929细胞在TNF α 处理后分别发生了凋亡与程序性坏死两种截然不同甚至相互对立的细胞程序性死亡方式, 而两种L929细胞中RIP3的表达水平差异可能是决定两种细胞在TNF α 处理后发生不同类型细胞程序性死亡的重要因素。此外, RIP1虽然是细胞程序性坏死的关键调控蛋白, 但也参与调控TNF α 诱导的细胞凋亡, 因此, 并不能单纯地通过检测RIP1对细胞死亡的调控作用来判断细胞是否发生了程序性坏死, 而应该再检测泛胱冬肽酶抑制剂、RIP3抑制剂GSK/872及MLKL抑制剂Necrosulfonamide等化合物对细胞死亡的调控作用, 最终鉴定细胞是否发生程序性坏死。

参考文献 (References)

- Vandenabeele P, Vanden BT, Festjens N. Caspase inhibitors promote alternative cell death pathways. *Sci STKE*; 2006(358): pe44.
- Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol* 2005; 1(2): 112-9.
- Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden BT, Kroemer G. Molecular mechanisms of necroptosis: An ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11(10): 700-14.
- Chen Y, Zou Z, Wu Z, Zhao Z, Luo X, Xie C, et al. TNF α -induced programmed cell death in the pathogenesis of acquired aplastic anemia. *Expert Rev Hematol* 2015; 8(4): 515-26.
- Hitomi J, Christofferson DE, Ng A, Yao J, Degterev A, Xavier RJ, et al. Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell* 2008; 135(7): 1311-23.
- He S, Wang L, Miao L, Wang T, Du F, Zhao L, et al. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF α . *Cell* 2009; 137(6): 1100-11.
- Moquin DM, McQuade T, Chan FK. CYLD deubiquitinates RIP1 in the TNF α -induced necrosis to facilitate kinase activation and programmed necrosis. *PLoS One* 2013; 8(10): e76841.
- Holler N, Zaru R, Micheau O, Thome M, Attinger A, Valitutti S, et al. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol* 2000; 1(6): 489-95.
- Humphries F, Yang S, Wang B, Moynagh PN. RIP kinases: Key decision makers in cell death and innate immunity. *Cell Death Differ* 2015; 22(2): 225-36.
- Nikolietopoulou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1833(12): 3448-59.
- Piret JP, Arnould T, Fuks B, Chatelain P, Remacle J, Michiels C. Caspase activation precedes PTP opening in TNF α -induced apoptosis in L929 cells. *Mitochondrion* 2004; 3(5): 261-78.
- Vercammen D, Beyaert R, Denecker G, Goossens V, Van Loo G, Declercq W, et al. Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1998; 187(9): 1477-85.
- Lalaoui N, Lindqvist LM, Sandow JJ, Ekert PG. The molecular relationships between apoptosis, autophagy and necroptosis. *Semin Cell Dev Biol* 2015; 39: 63-9.
- Kyprianou N, Alexander RB, Isaacs JT. Activation of programmed cell death by recombinant human tumor necrosis factor plus topoisomerase II-targeted drugs in L929 tumor cells. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83(5): 346-50.
- Fady C, Gardner A, Jacoby F, Briskin K, Tu Y, Schmid I, et al. Atypical apoptotic cell death induced in L929 targets by exposure to tumor necrosis factor. *J Interferon Cytokine Res* 1995; 15(1): 71-80.
- Hakoda S, Ishikura H, Takeyama N, Tanaka T. Tumor necrosis factor-alpha plus actinomycin D-induced apoptosis of L929 cells is prevented by nitric oxide. *Surg Today* 1999; 29(10): 1059-67.
- Cheng Y, Qiu F, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T. ERK and JNK mediate TNF α -induced p53 activation in apoptotic and autophagic L929 cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 376(3): 483-8.
- Koike T, Fehsel K, Zielasek J, Kolb H, Burkart V. Gangliosides protect from TNF α -induced apoptosis. *Immunol Lett* 1993; 35(3): 207-12.
- Moshnikova AB, Krotova KE, Galat VV, Afanas'ev VN, Sa-

- dovnikov VB, Beletskii IP. Apoptosis of L929 cells induced by tumor necrosis factor. *Tsitologiya* 2000; 42(6): 561-7.
- 20 Vercammen D, Vandenabeele P, Beyaert R, Declercq W, Fiers W. Tumour necrosis factor-induced necrosis versus anti-Fas-induced apoptosis in L929 cells. *Cytokine* 1997; 9(11): 801-8.
- 21 Leroux E, Auzenne E, Weidner D, Wu ZY, Donato NJ, Klostergaard J. Febrile and acute hyperthermia enhance TNF-induced necrosis of murine L929 fibrosarcoma cells via caspase-regulated production of reactive oxygen intermediates. *J Cell Physiol* 2001; 187(2): 256-63.
- 22 Huang J, Wu L, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T. The augmentation of TNF α -induced cell death in murine L929 fibrosarcoma by the pan-caspase inhibitor Z-VAD-fmk through pre-mitochondrial and MAPK-dependent pathways. *Acta Med Okayama* 2005; 59(6): 253-60.
- 23 Xie C, Zhang N, Zhou H, Li J, Li Q, Zarubin T, *et al.* Distinct roles of basal steady-state and induced H-ferritin in tumor necrosis factor-induced death in L929 cells. *Mol Cell Biol* 2005; 25(15): 6673-81.
- 24 Li L, Chen W, Liang Y, Ma H, Li W, Zhou Z, *et al.* The G $\beta\gamma$ -Src signaling pathway regulates TNF-induced necroptosis via control of necrosome translocation. *Cell Res* 2014; 24(4): 417-32.
- 25 Kim YS, Morgan MJ, Choksi S, Liu ZG. TNF-induced activation of the Nox1 NADPH oxidase and its role in the induction of necrotic cell death. *Mol Cell* 2007; 26(5): 675-87.
- 26 Vanlangenakker N, Bertrand MJ, Bogaert P, Vandenabeele P, Vanden BT. TNF-induced necroptosis in L929 cells is tightly regulated by multiple TNFR1 complex I and II members. *Cell Death Dis* 2011; 2: e230.
- 27 Workman LM, Habelhah H. TNFR1 signaling kinetics: Spatiotemporal control of three phases of IKK activation by posttranslational modification. *Cell Signal* 2013; 25(8): 1654-64.
- 28 Wang L, Du F, Wang X. TNF- α induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell* 2008; 133(4): 693-703.
- 29 Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 2003; 114(2): 181-90.
- 30 Zhang DW, Shao J, Lin J, Zhang N, Lu BJ, Lin SC, *et al.* RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science* 2009; 325(5938): 332-6.
- 31 Cai Z, Jitkaew S, Zhao J, Chiang HC, Choksi S, Liu J, *et al.* Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis. *Nat Cell Biol* 2014; 16(1): 55-65.
- 32 Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. MLKL regulates necrotic plasma membrane permeabilization. *Cell Res* 2014; 24(2): 139-40.
- 33 Cook WD, Moujalled DM, Ralph TJ, Lock P, Young SN, Murphy JM, *et al.* RIPK1- and RIPK3-induced cell death mode is determined by target availability. *Cell Death Differ* 2014; 21(10): 1600-12.
- 34 Chen X, Li W, Ren J, Huang D, He WT, Song Y, *et al.* Translocation of mixed lineage kinase domain-like protein to plasma membrane leads to necrotic cell death. *Cell Res* 2014; 24(1): 105-21.
- 35 Karl I, Jossberger-Werner M, Schmidt N, Horn S, Goebeler M, Leverkus M, *et al.* TRAF2 inhibits TRAIL- and CD95L-induced apoptosis and necroptosis. *Cell Death Dis* 2014; 5: e1444.
- 36 Upton JW, Kaiser WJ, Mocarski ES. DAI/ZBP1/DLM-1 complexes with RIP3 to mediate virus-induced programmed necrosis that is targeted by murine cytomegalovirus vIRA. *Cell Host Microbe* 2012; 11(3): 290-7.
- 37 Degterev A, Hitomi J, Germscheid M, Ch'en IL, Korkina O, Teng X, *et al.* Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat Chem Biol* 2008; 4(5): 313-21.
- 38 Christofferson DE, Yuan J. Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Curr Opin Cell Biol* 2010; 22(2): 263-8.
- 39 Kim S, Ohoka N, Okuhira K, Sai K, Nishimaki-Mogami T, Naito M. Modulation of RIP1 ubiquitylation and distribution by MeBS to sensitize cancer cells to tumor necrosis factor α -induced apoptosis. *Cancer Sci* 2010; 101(11): 2425-9.
- 40 Reiter M, Eckhardt I, Haferkamp A, Fulda S. Smac mimetic sensitizes renal cell carcinoma cells to interferon- α -induced apoptosis. *Cancer Lett* 2016; 375(1): 1-8.
- 41 Boutaffala L, Bertrand MJ, Remouchamps C, Seleznik G, Reisinger F, Janas M, *et al.* NIK promotes tissue destruction independently of the alternative NF- κ B pathway through TNFR1/RIP1-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 2015; 22(12): 2020-33.