

RIP3 在心肌细胞坏死中的作用及其机制

李娜 黄煜 何庆

西南交通大学医学院 西南交通大学附属医院 / 成都市第三人民医院 610031

通信作者: 何庆, Email: Kk555888@126.com

【摘要】 心肌缺血 / 再灌注 (I/R) 损伤严重危害人类健康, 是治疗心血管疾病的潜在隐患, 其中心肌坏死是心肌 I/R 损伤发生机制之一。大量研究表明, 坏死因子广泛参与心肌细胞坏死的调控, 但其具体机制尚未完全清楚。受体相互作用蛋白 3 / 受体相互作用蛋白激酶 3 (RIP3/RIPK3) 是程序化细胞坏死通路中不可或缺的蛋白质, 激活 RIP3 可引起心肌细胞不可逆坏死。本文在介绍 RIP3 分子的基础上, 重点阐述 RIP3 相关细胞坏死通路在心肌细胞坏死中的作用及其机制, 以期治疗心肌 I/R 损伤提供新的思路和见解。

【关键词】 受体相互作用蛋白 3; 心肌坏死; 缺血 / 再灌注损伤, 心肌

基金项目: 国家自然科学基金 (81501640); 四川省成都市科技计划重点研发项目 (2017FZ0058)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.08.028

Vital role of RIP3 in the mechanism of myocardial cell necroptosis

Li Na, Huang Yu, He Qing

Southwest Jiaotong University of Medicine; Southwest Jiaotong University Affiliated Chengdu Third People's Hospital, Chengdu 610031, Sichuan, China

Corresponding author: He Qing, Email: Kk555888@126.com

【Abstract】 Myocardial ischemia/reperfusion (I/R) injury seriously endangers human health and is a potential hidden danger in the treatment of cardiovascular diseases, among which myocardial necrosis is one of the mechanisms of myocardial I/R injury. Numerous studies have shown that necrosis factor is widely involved in the regulation of myocardial cell necrosis, but its specific mechanism is not fully understood. Receptor interacting protein 3/receptor interacting protein kinase 3 (RIP3/RIPK3) is an essential protein in necroptosis pathways, and activated RIP3 can cause irreversible necrosis of myocardial cells. On the basis of introducing RIP3 molecule, this paper focused on the role and mechanism of RIP3 mediated necroptosis pathway in myocardial cell necroptosis, with a view to providenew ideas and insights for the treatment of myocardial I/R injury.

【Key words】 Receptor interacting protein 3; Myocardial cell necroptosis; Myocardial ischemia/reperfusion injury

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81501640); Key Research and Development Projects of Chengdu Science and Technology Plan in Sichuan Province (2017FZ0058)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.08.028

心肌缺血后梗死通常采用溶栓治疗或初级经皮冠状动脉介入治疗 (PPCI) 的方法进行及时有效的心肌再灌注, 但心肌再灌注本身会导致进一步的心肌细胞死亡, 这种现象称为心肌缺血 / 再灌注 (I/R) 损伤^[1-2]。目前临床上尚缺乏有效的治疗措施来预防心肌 I/R 损伤。有研究证实, 受体相互作用蛋白 3 (RIP3) 介导的心肌细胞坏死广泛参与了心肌 I/R 损伤的病理生理过程^[2-3], 具有潜在的治疗价值。现针对 RIP3 分子及其相关的细胞坏死信号通路在心肌细胞坏死中的作用机制进行综述, 以进一步了解 RIP3 在心肌 I/R 损伤中可能的作用。

1 RIP3 分子概述

RIP 激酶家族是一类丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶, 包括 RIP1、RIP2、RIP3、RIP4、RIP5、RIP6 和 RIP7 等 7 个成员, 它们虽然共有一个同源激酶结构域, 但其有不同的功能域^[4]。RIP3 激酶由氨基末端激酶结构域、RIP 同质相互作用基序 (RHIM) 结构域和独特的羧基末端结构域组成。激酶结构域

是活性区, RHIM 可能介导 RIP3 蛋白质与其他蛋白质之间的相互作用^[5]。RIP3 激酶具有结合、水解三磷酸腺苷 (ATP) 等经典激酶共有的能力^[6]。当 RIP3 过度表达时还可以诱导细胞发生凋亡、坏死以及核转录因子- κ B (NF- κ B) 活化^[7]。Newton 等^[8]发现, RIP3 是一种能量代谢调节剂, 能够决定细胞的死亡方式 (凋亡或坏死)。

RIP3 的表达与细胞发生坏死的易感性直接相关, 在心肌细胞坏死中起决定性作用^[9]。当 RIP3 在心肌细胞中过度表达时, RIP1/RIP3 复合物形成增加, 心肌细胞破裂坏死, 引发心肌 I/R 损伤^[10]。Zhu 等^[11]研究发现, RIP3 基因消融和基因敲除可减轻心肌 I/R 损伤模型小鼠的心肌坏死水平。Fang 等^[12]在高糖诱导的 H9c2 心肌细胞坏死模型中发现, RIP3 的 mRNA 和蛋白表达水平均明显升高。小鼠腹腔注射百草枯会导致急性心肌细胞坏死, 其发生机制与坏死相关蛋白 RIP1、RIP3 和混合谱系激酶结构域 (MLKL) 过度表达以及 RIP1/RIP3 复合物形成有关^[13]。此外有研究表明, RIP3

介导的细胞坏死是急性病毒性心肌炎小鼠发生心肌细胞死亡的主要途径^[14]。综上, RIP3 是程序化细胞坏死的分子开关^[15], 其介导的心肌细胞坏死通路影响各种心血管疾病的发生发展。

2 RIP3 相关细胞坏死通路对心肌细胞坏死的调控

程序化细胞坏死是不依赖天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶家族 (caspase) 的一种细胞死亡形式^[16], 其突出特征即 RIP3 是信号通路中必需的上游激酶^[6, 17]。细胞在接受体内外死亡信号及其他细胞应激反应时, 激活死亡受体相关信号通路, 诱发细胞、细胞器肿胀, 线粒体广泛破坏, 质膜不可逆破裂, 最终导致细胞内容物流出, 从而促进进一步的炎症反应和邻近细胞损伤^[17-18]。有研究表明, 心肌细胞坏死在心肌 I/R 损伤后心肌细胞丢失程度、缺血后不良重构和心功能障碍的发生发展中起着关键作用^[19]。由 RIP3 介导的细胞坏死是目前研究最广泛的一种坏死类型^[20-21]。

2.1 RIP1-RIP3-MLKL 途径: 心肌 I/R 损伤后缺血心室不良重构及心肌细胞坏死可能与 RIP1-RIP3-MLKL 轴密切相关。

有研究显示, 在结扎冠状动脉左前降支诱导心肌 I/R 损伤的雄性 Wistar 大鼠模型中, RIP3 参与了心肌细胞坏死和缺血后心室不良重构^[19]。此项研究首次表明了高强度间歇训练对心脏保护作用的分子靶点是 RIP1-RIP3-MLKL 轴, 从而揭示了心肌 I/R 损伤的心肌细胞坏死是基于 RIP1-RIP3-MLKL 轴的激活。对 RIP1 特异性抑制剂坏死抑制素-1 (Necrostatin-1) 的广泛研究进一步诠释了 RIP1-RIP3-MLKL 途径介导的心肌细胞坏死在心肌 I/R 损伤中不可或缺的作用^[13, 22-24]。因此, RIP1-RIP3-MLKL 途径可能在心肌细胞坏死中发挥重要作用, 研究其在心肌 I/R 损伤的作用机制至关重要。

关于心肌坏死通路研究最多的是肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 诱导的级联反应^[25]。TNF- α 与其同源受体 1 (TNFR-1) 结合形成膜相关复合物 I (complex I)。complex I 包括 TNFR 相关死亡结构域 (TRADD)、TNFR 相关因子 2 (TRAF2)、TNFR 相关因子 5 (TRAF5)、RIP1 和细胞凋亡抑制剂 1/2 (cIAP1/2)。在该复合物中, 当 cIAP1/2 缺失或其反调节酶活性增加导致聚二氮化反应失活时^[21], RIP1 去泛素化^[26], complex I 发生内化并招募 Fas 相关死亡域 (FADD) 和 caspase-8 形成复合物 complex II。complex II 中的细胞 FLICE 样抑制蛋白亚型 (cFLIPS) 阻断 caspase-8 蛋白水解 RIP1, 使具有活性的 RIP1 和 RIP3 发生磷酸化^[21]。磷酸化的 RIP1 和 RIP3 通过 RHIM 结构域聚合成丝状 β 淀粉样结构, 即坏死小体^[27]。坏死小体进一步募集下游效应器 MLKL, 在 RIP3 催化下使 MLKL 的 Thr357 位点和 Ser358 位点磷酸化并发生构象变化, 暴露其氨基末端的死亡效应结构域, 使 MLKL 转移到质膜上, 导致细胞质膜透化, 最终导致程序化细胞坏死^[6, 28]。Weber 等^[25]研究还发现, 在 TNF- α 诱导心肌细胞坏死后, RIP3 和 MLKL 在细胞核中被激活后持续穿梭在细胞核与细胞质之间, 促使坏死小体的形成。此外, Koudstaal 等^[22]在与人类疾病相关的临床前大型动物模型

研究中首次证明了, Necrostatin-1 可成为一种广泛适用于 ST 段抬高型心肌梗死患者的心脏保护药物。Necrostatin-1 作为 RIP1 激酶的特异性抑制剂, 能够阻碍 RIP1-RIP3-MLKL 信号通路中关键物质 RIP1/RIP3 复合物的形成, 使依赖 RIP3 的心肌细胞坏死途径受到抑制, 从而实现心脏保护作用。关于 Necrostatin-1 的相关研究为 RIP1-RIP3-MLKL 途径介导的心肌坏死参与心肌 I/R 损伤的发生发展提供了间接依据。

2.2 RIP3-钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II-线粒体通透性转换孔 (RIP3-CaMK II-mPTP) 途径: 新的研究揭示了另一种调控心肌程序化坏死的模式, 即 RIP3-CaMK II-mPTP 途径^[29-30]。

在心肌发生缺血和氧化应激反应时, RIP3 表达上调, 从而激活 RIP3-CaMK II-mPTP 通路来诱导心肌细胞坏死, 与其他细胞坏死不同的原因在于它不需要激活 RIP1-RIP3-MLKL 级联反应^[30]。Luedde 等^[20]研究也发现, RIP3 诱导的心肌细胞坏死不受 RIP1 基因敲除的影响。小鼠实验结果显示, 进行 RIP3 基因敲除或使用 CaMK II 抑制剂能够改善 I/R 损伤诱导的心肌细胞坏死和心力衰竭, 这直接表明 RIP3 和 CaMK II 在心肌细胞坏死中发挥重要作用^[30]。

Zhang 等^[30]利用小干扰 RNA (siRNA) 介导 RIP1 和 MLKL 基因沉默技术, 首次证明了 RIP1 和 MLKL 在 I/R 诱导 RIP3 依赖的心肌坏死中的作用是可替代的。其进一步研究表明, CaMK II 是 RIP3 的底物。RIP3 诱导的坏死通过多功能蛋白激酶 CaMK II 介导, 活化的 CaMK II 进一步激活下游效应器 mPTP, 触发 mPTP 开放, 导致线粒体膜电位去极化, 线粒体凋亡, 最终造成心肌坏死、心室重构和心力衰竭。该实验证实心肌 I/R 损伤通过两种机制激活 RIP3-CaMK II-mPTP 通路: ① RIP3 磷酸化 CaMK II 直接激活信号通路; ② 活性氧 (ROS) 介导 CaMK II 氧化间接激活信号通路。总之, CaMK II 是促进心肌细胞死亡的节点信号, 但其上下游通路和靶点仍未完全了解, 还需要进一步研究^[31]。

2.3 其他途径: 小鼠 I/R 损伤模型实验首次揭示了 RIP3 介导细胞坏死的另一条途径, 即 I/R 损伤可激活 RIP3-内质网应激通路来诱导心肌细胞坏死。

小鼠 I/R 损伤致 RIP3 基因过度表达并引起内质网应激, 内质网应激作为钙超载中介进而激活钙超载/黄嘌呤氧化酶/ROS/mPTP 开放轴引发心肌细胞坏死^[11]。此外, 研究证实线粒体介导的不依赖 RIP3 的细胞凋亡是心肌 I/R 损伤诱发心肌细胞死亡的另一主要类型, 其可能的机制是上调的 RIP3 通过 FUNDC1 磷酸化位点的转录后修饰使其失活, 抑制 FUNDC1 依赖的有丝分裂, 使受限的吞噬作用未能完全清除线粒体碎片或限制细胞色素 C 的扩散, 最终导致 caspase-9 介导的细胞凋亡^[32]。Zhou 等^[33]研究还发现, RIP3 介导的细胞凋亡途径能够影响微血管稳态和内皮细胞凋亡, 这为治疗心脏微循环 I/R 损伤提供了潜在的靶点。目前关于心肌细胞坏死的具体机制尚不明确, 因此深入研究 I/R 损伤诱导的心肌细胞坏死分子基础, 可能会开辟新的治疗途径, 这也是临床上治疗 I/R 损伤的迫切需要。

综上所述, RIP3 与多种蛋白激酶分子相互作用形成不

同信号转导通路,在调控心肌细胞坏死过程中发挥重要作用。然而这些研究大部分是在 I/R 动物模型中进行的,在人类疾病组织中, RIP3 介导的相关细胞坏死通路的表达和功能是否异常,以及是否会成为影响心肌细胞的关键因素,目前鲜见报道,这可能成为今后的一个研究方向。RIP3 相关细胞坏死信号通路也可能成为治疗心肌 I/R 损伤的新靶点。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Moe GW, Marín-García J. Role of cell death in the progression of heart failure [J]. Heart Fail Rev, 2016, 21 (2): 157-167. DOI: 10.1007/s10741-016-9532-0.
- [2] Hou H, Wang Y, Li Q, et al. The role of RIP3 in cardiomyocyte necrosis induced by mitochondrial damage of myocardial ischemia-reperfusion [J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2018, 50 (11): 1131-1140. DOI: 10.1093/abbs/gmy108.
- [3] Linkermann A, Hackl MJ, Kunzendorf U, et al. Necroptosis in immunity and ischemia-reperfusion injury [J]. Am J Transplant, 2013, 13 (11): 2797-2804. DOI: 10.1111/ajt.12448.
- [4] Humphries F, Yang S, Wang B, et al. RIP kinases: key decision makers in cell death and innate immunity [J]. Cell Death Differ, 2015, 22 (2): 225-236. DOI: 10.1038/cdd.2014.126.
- [5] Witt A, Vucic D. Diverse ubiquitin linkages regulate RIP kinases-mediated inflammatory and cell death signaling [J]. Cell Death Differ, 2017, 24 (7): 1160-1171. DOI: 10.1038/cdd.2017.33.
- [6] Xie T, Peng W, Yan C, et al. Structural insights into RIP3-mediated necroptotic signaling [J]. Cell Rep, 2013, 5 (1): 70-78. DOI: 10.1016/j.celrep.2013.08.044.
- [7] Zhang D, Lin J, Han J. Receptor-interacting protein (RIP) kinase family [J]. Cell Mol Immunol, 2010, 7 (4): 243-249. DOI: 10.1038/cmi.2010.10.
- [8] Newton K, Dugger DL, Wickliffe KE, et al. Activity of protein kinase RIPK3 determines whether cells die by necroptosis or apoptosis [J]. Science, 2014, 343 (6177): 1357-1360. DOI: 10.1126/science.1249361.
- [9] Koo GB, Morgan MJ, Lee DG, et al. Methylation-dependent loss of RIP3 expression in cancer represses programmed necrosis in response to chemotherapeutics [J]. Cell Res, 2015, 25 (6): 707-725. DOI: 10.1038/cr.2015.56.
- [10] Li C, Xue H, Yang Z, et al. GW28-e0894 impaired autophagosome clearance triggers myocardial necroptosis in ischemia/reperfusion injury [J]. J Am Coll Cardiol, 2017, 70 (16): C33. DOI: 10.1016/j.jacc.2017.07.114.
- [11] Zhu P, Hu S, Jin Q, et al. Ripk3 promotes ER stress-induced necroptosis in cardiac IR injury: a mechanism involving calcium overload/XO/ROS/mPTP pathway [J]. Redox Biol, 2018, 16: 157-168. DOI: 10.1016/j.redox.2018.02.019.
- [12] Fang T, Cao R, Wang W, et al. Alterations in necroptosis during ALDH2-mediated protection against high glucose-induced H9c2 cardiac cell injury [J]. Mol Med Rep, 2018, 18 (3): 2807-2815. DOI: 10.3892/mmr.2018.9269.
- [13] Zhang L, Feng Q, Wang T. Necrostatin-1 protects against paraquat-induced cardiac contractile dysfunction via RIP1-RIP3-MLKL-dependent necroptosis pathway [J]. Cardiovasc Toxicol, 2018, 18 (4): 346-355. DOI: 10.1007/s12012-017-9441-z.
- [14] Zhou F, Jiang X, Teng L, et al. Necroptosis may be a novel mechanism for cardiomyocyte death in acute myocarditis [J]. Mol Cell Biochem, 2018, 442 (1-2): 11-18. DOI: 10.1007/s11010-017-3188-5.
- [15] Moriwaki K, Chan FK. RIP3: a molecular switch for necrosis and inflammation [J]. Genes Dev, 2013, 27 (15): 1640-1649. DOI: 10.1101/gad.223321.113.
- [16] Pasparakis M, Vandenabeele P. Necroptosis and its role in inflammation [J]. Nature, 2015, 517 (7534): 311-320. DOI: 10.1038/nature14191.
- [17] Green DR, Llambi F. Cell death signaling [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015, 7 (12). pii: a006080. DOI: 10.1101/cshperspect.a006080.
- [18] Oerlemans MI, Koudstaal S, Chamuleau SA, et al. Targeting cell death in the reperfused heart: pharmacological approaches for cardioprotection [J]. Int J Cardiol, 2013, 165 (3): 410-422. DOI: 10.1016/j.ijcard.2012.03.055.
- [19] Ghardashi Afousi A, Gaeini A, Rakhshan K, et al. Targeting necroptotic cell death pathway by high-intensity interval training (HIIT) decreases development of post-ischemic adverse remodelling after myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. J Cell Commun Signal, 2019, 13 (2): 255-267. DOI: 10.1007/s12079-018-0481-3.
- [20] Luedde M, Lutz M, Carter N, et al. RIP3, a kinase promoting necroptotic cell death, mediates adverse remodelling after myocardial infarction [J]. Cardiovasc Res, 2014, 103 (2): 206-216. DOI: 10.1093/cvr/cvu146.
- [21] Adameova A, Goncalvesova E, Szobi A, et al. Necroptotic cell death in failing heart: relevance and proposed mechanisms [J]. Heart Fail Rev, 2016, 21 (2): 213-221. DOI: 10.1007/s10741-016-9537-8.
- [22] Koudstaal S, Oerlemans MI, Van der Spoel TL, et al. Necrostatin-1 alleviates reperfusion injury following acute myocardial infarction in pigs [J]. Eur J Clin Invest, 2015, 45 (2): 150-159. DOI: 10.1111/eci.12391.
- [23] Zhang A, Mao X, Li L, et al. Necrostatin-1 inhibits Hmgbl-IL-23/IL-17 pathway and attenuates cardiac ischemia reperfusion injury [J]. Transpl Int, 2014, 27 (10): 1077-1085. DOI: 10.1111/tri.12349.
- [24] Oerlemans MI, Liu J, Arslan F, et al. Inhibition of RIP1-dependent necrosis prevents adverse cardiac remodeling after myocardial ischemia-reperfusion *in vivo* [J]. Basic Res Cardiol, 2012, 107 (4): 270. DOI: 10.1007/s00395-012-0270-8.
- [25] Weber K, Roelandt R, Bruggeman I, et al. Nuclear RIPK3 and MLKL contribute to cytosolic necrosome formation and necroptosis [J]. Commun Biol, 2018, 1: 6. DOI: 10.1038/s42003-017-0007-1.
- [26] Vanden Berghe T, Linkermann A, Jouan-Lanhouet S, et al. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15 (2): 135-147. DOI: 10.1038/nrm3737.
- [27] Li J, McQuade T, Siemer AB, et al. The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis [J]. Cell, 2012, 150 (2): 339-350. DOI: 10.1016/j.cell.2012.06.019.
- [28] Wang H, Sun L, Su L, et al. Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3 [J]. Mol Cell, 2014, 54 (1): 133-146. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.03.003.
- [29] Kung G, Constantinidis K, Kitsis RN. Programmed necrosis, not apoptosis, in the heart [J]. Circ Res, 2011, 108 (8): 1017-1036. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.225730.
- [30] Zhang T, Zhang Y, Cui M, et al. CaMK II is a RIP3 substrate mediating ischemia- and oxidative stress-induced myocardial necroptosis [J]. Nat Med, 2016, 22 (2): 175-182. DOI: 10.1038/nm.4017.
- [31] Feng N, Anderson ME. CaMK II is a nodal signal for multiple programmed cell death pathways in heart [J]. J Mol Cell Cardiol, 2017, 103: 102-109. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2016.12.007.
- [32] Zhou H, Zhu P, Guo J, et al. Ripk3 induces mitochondrial apoptosis via inhibition of FUNDC1 mitophagy in cardiac IR injury [J]. Redox Biol, 2017, 13: 498-507. DOI: 10.1016/j.redox.2017.07.007.
- [33] Zhou H, Wang J, Zhu P, et al. Ripk3 regulates cardiac microvascular reperfusion injury: The role of IP3R-dependent calcium overload, XO-mediated oxidative stress and F-action/filopodia-based cellular migration [J]. Cell Signal, 2018, 45: 12-22. DOI: 10.1016/j.cellsig.2018.01.020.

(收稿日期: 2019-06-04)

广告声明

依照广告审批的相关规定,按广告厂家要求,本刊刊登的爱尔辛泰广告图片和内容均按广告审查批准文号的原件刊出,故广告内容中“适应症”未按标准医学名词术语修改为“适应证”,部分药品计量单位仍出现了双斜线,部分时间单位仍用汉字表示。特此声明!