

缺氧/复氧通过激活程序性坏死 RIP1/RIP3 信号诱导心肌细胞坏死

沈鑫,胡媛萍,李建涛,阙玲琳,李跃华*

(南京医科大学病理生理学系,江苏南京 211166)

[摘要] 目的:研究缺氧/复氧(hypoxia/reoxygenation,H/R)刺激是否可通过激活程序性坏死信号通路诱导心肌细胞坏死。方法:体外培养新生大鼠原代心肌细胞,采用缺氧 2 h 复氧 4 h 的方法复制心肌细胞损伤模型,碘化丙脒(propidium iodide,PI)染色检测心肌细胞坏死情况,Western blot 和免疫共沉淀方法检测程序性坏死信号通路中受体相互作用蛋白 1(receptor interacting protein-1,RIP1)、受体相互作用蛋白 3(receptor interacting protein-3,RIP3)的蛋白表达水平和 RIP1/RIP3 复合物 II 形成情况,以及 RIP1、RIP3 的泛素化水平。结果:与对照组相比,缺氧/复氧组心肌细胞坏死数量明显增多,RIP1、RIP3 蛋白表达水平显著升高,RIP1/RIP3 复合物 II 的形成增多,且 RIP1 与 RIP3 的泛素化水平也有所增加。结论:缺氧复氧可诱导心肌细胞坏死,其机制可能与激活程序性坏死 RIP1/RIP3 信号通路有关。

[关键词] 缺氧/复氧;心肌细胞坏死;程序性坏死;RIP1/RIP3 信号

[中图分类号] R329.26

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)05-544-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20160507

Hypoxia and reoxygenation injury induces cardiomyocytes necrosis through regulation of RIP1/RIP3 dependent necroptosis signaling pathway

Shen Xin, Hu Yuan Ping, Li Jian Tao, Que Ling Li, Li Yue Hua*

(Department of Pathophysiology, NJMU, Nanjing 211166, China)

[Abstract] **Objective:** To study whether hypoxia and reoxygenation (H/R) injury induces the necrosis of cardiomyocyte via regulation of programmed necrosis (necroptosis). **Methods:** Neonatal rats ventricular myocytes were isolated from neonatal Sprague - Dawley rats. The incubated cells were subjected to reoxygenation (4 h) after hypoxia (2 h). The effect of H/R injury on the necrosis of cardiomyocytes was determined by PI (propidium iodide) staining. Western blot and Co-IP were performed to test the protein expression of receptor interacting protein (RIP) 1 and 3, the formation of RIP1/RIP3 complex II, and the ubiquitination level of RIP1 and RIP3. **Results:** When subjected to reoxygenation (4 h) after hypoxia (2 h), the protein expression levels of RIP1 and RIP3 were significantly increased compared with those of control. Besides, H/R injury also promoted the formation of RIP1/RIP3 complex II and upregulated the ubiquitination of RIP1 and RIP3. **Conclusion:** Hypoxia and reoxygenation injury could induce the necrosis of cardiomyocytes, which may be involved in regulation of RIP1/RIP3 dependent programmed necrosis signaling pathway.

[Key words] hypoxia and reoxygenation injury; cardiomyocyte necrosis; necroptosis; RIP1/RIP3 signaling

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(05): 544-548]

急性心肌梗死(acute myocardial infarction, MI)是临床常见的高发病率与高病死率疾病, 尽早恢复缺血心肌的血液再灌注是治疗急性心肌梗死最为有效的方法^[1]。然而, 某些情况下, 缺血后再灌注, 心肌组织的结构与功能损伤不仅没有改善, 反而加重, 甚至发生不可逆性损伤, 即出现心肌

缺血-再灌注损伤(myocardial ischemia-reperfusion injury, IR)。迄今为止, IR 的机制尚未完全阐明^[2]。既往的研究发现, 在心肌发生 IR 时, 心肌细胞的损伤包括细胞凋亡(apoptosis)与细胞坏死(necrosis), 且细胞坏死尤为显著, 表明心肌细胞坏死在心肌 IR 的发生发展中起着至关重要的作用^[3]。

长期以来, 细胞坏死一直被认为是各种病理因素导致的细胞随机被动性死亡。但近年来的大量研究证明, 细胞坏死有可能是细胞“程序性死亡”的另

[基金项目] 国家自然科学基金(81270292, 81470418)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: yhli@njmu.edu.cn

一种表现方式,称为程序性坏死(programmed necrosis or necroptosis)。程序性坏死同样是可以受调控的,主要是通过受体相互作用蛋白 1(receptor interacting protein-1, RIP1) 和受体相互作用蛋白 3(receptor interacting protein-3, RIP3)介导。在心肌梗死、心肌缺血-再灌注、心力衰竭等心血管疾病的发生发展过程中,细胞的程序性坏死具有重要影响^[3-4]。因此,对程序性坏死的研究,将有助于进一步阐明心肌 IR 的发生机制。缺氧/复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R) 诱导细胞损伤是从体外细胞水平研究缺血-再灌注损伤的公认模型, 本文主要通过建立体外心肌细胞 H/R 模型, 探讨程序性坏死 RIP1/RIP3 信号通路是否参与 H/R 诱导的心肌细胞坏死的调控。

1 材料和方法

1.1 材料

出生 1~3 d 的 (Sprague-Dawley, SD) 新生大鼠 (南京医科大学实验动物中心), DMEM 高糖培养基、DMEM 无糖培养基、胎牛血清 (Gibco 公司, 美国), 小牛血清 (浙江天杭生物科技有限公司, 中国), 胰酶 (杭州碧云天生物技术研究所), 三气培养箱、CO₂ 培养箱 (Thermo Fisher Scientific 公司, 美国), 荧光正置显微镜 (奥林巴斯公司, 日本), BCA 蛋白测定试剂盒 (Pierce 公司, 美国), PI 染液 (Biosharp 公司), DAPI 染液、Protein A 琼脂糖珠 (Sigma-Aldrich 公司, 美国), GAPDH、RIP1、RIP3、Ub 抗体 (Santa Cruz 公司, 美国), HRP-标记的山羊抗兔 IgG、山羊抗小鼠 IgG 二抗 (北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 新生大鼠原代心肌细胞的培养

取出生 1~3 d 的 SD 大鼠, 取心脏置于低温 1×PBS 中清洗。取心室组织, 加入适量 0.08% 的胰酶, 37℃ 水浴振荡进行分次消化。加小牛血清终止消化后 1 800 r/min 离心 5 min, 收集沉淀。将收集下来的所有沉淀重新混悬, 经 100 目筛网过滤, 收集滤液。将含 10% 胎牛血清的细胞悬液接种至培养皿中, 37℃ 5%CO₂ 细胞培养箱培养 3 h 后, 利用细胞差速贴壁原理, 取上清培养液, 加入 Brdu (bromodeoxyuridine, 0.1 mmol/L) 以防止其中少量心肌成纤维细胞的增殖, 后重新接种至新的培养皿得心肌细胞。

1.2.2 缺氧/复氧模型的建立

37℃ 5%CO₂ 细胞培养箱培养 36 h 后, 取生长

状态良好的心肌细胞进行处理。弃培养液, 给予不含胎牛血清的无糖培养基于 37℃ 5% CO₂, 1% O₂, 94% N₂ 缺氧培养箱中培养 2 h, 取出细胞, 加葡萄糖后于 37℃ 5%CO₂ 细胞培养箱培养 4 h。

对照组为 37℃ 5%CO₂ 细胞培养箱中培养的心肌细胞, 不进行缺氧复氧处理。

1.2.3 心肌细胞 PI 染色

弃去培养液, 预冷的 1×PBS 清洗 3 遍, 加入含 10 μg/mL PI, 0.1% Triton-X-100 的染液 4℃ 避光孵育 30 min, 吸弃染液, 1×PBS 清洗 3 遍后, 加入 1:10 稀释的 DAPI 染液。荧光显微镜下进行观察, 拍照。

1.2.4 蛋白泛素化水平的检测

通过免疫共沉淀的方法检测蛋白泛素化水平, 每组取心肌细胞总蛋白 500 μg, 从中取出少量蛋白以备 Western blot 分析, 剩下的蛋白中加入相应抗体 5 μg 后 4℃ 缓慢摇晃孵育过夜。第 2 天取适量 protein A 琼脂糖珠, 细胞裂解液清洗 2 遍后将其加入到和抗体孵育过夜的细胞裂解液中, 4℃ 缓慢摇晃孵育 4 h, 使抗体与 protein A 琼脂糖珠偶连。5 000 r/min, 4℃, 离心 5 min, 弃上清, 细胞裂解液清洗 3 遍, 加入 40 μL 1×SDS loading buffer, 煮沸 5 min。5 000 r/min, 4℃, 离心 5 min, 取上清上样, 进行 Western blot, 一抗用 Ub 抗体孵育。

1.2.5 Western blot

提取心肌细胞总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。配制合适浓度的聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE 胶), 每组取 60 μg 蛋白, 加入 5×SDS loading buffer, 煮沸 5 min 后上样电泳。电泳结束后用湿转的方法将蛋白条带转移至 PVDF 膜上, 将膜置于含 5% 脱脂奶粉的 1×TBS-T 中, 室温封闭 1 h。封闭结束后, 1×TBS-T 洗膜 3 次, 加入一抗 4℃ 孵育过夜, 第 2 天 1×TBS-T 洗膜 3 次, 二抗室温孵育 2h, 1×TBS-T 洗膜 3 次, ECL 显色液显影, 采用 Image J 图像分析软件对条带灰度进行分析, 并以 GAPDH 作为内参, 计算比值, 统计结果。

1.3 统计学方法

所涉及数据均用 GraphPad Prism 5 统计软件进行处理, 数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间变异度分析用 ANOVA 方法。P ≤ 0.05 认为差异具有统计学意义。

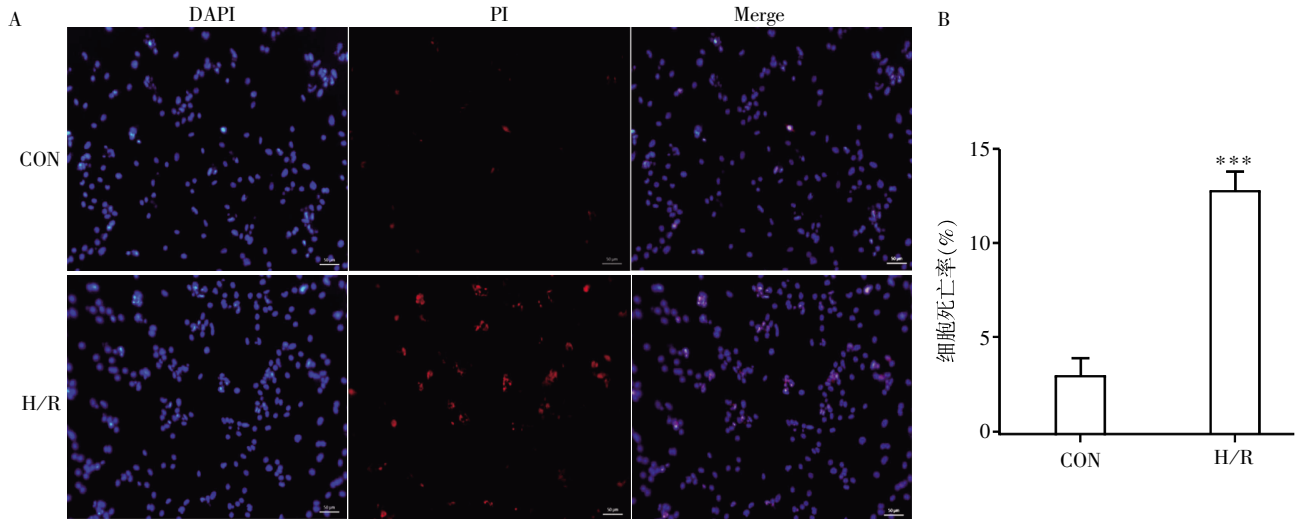
2 结果

2.1 缺氧/复氧诱导心肌细胞坏死

PI 是一种可以对 DNA 染色的细胞核染色剂,

不能穿透细胞膜,所以对具有完整细胞膜的正常细胞或者凋亡细胞都不能进行染色,而坏死细胞已不具备细胞膜完整性,所以 PI 染色可以鉴定坏死细

胞。如图 1 所示,与对照组相比,H/R 组心肌细胞 PI 染色的坏死数量明显增加($P < 0.001$,图 1A)。提示,H/R 刺激可以诱导心肌细胞坏死。



A: 心肌细胞 PI 染色;B: 图 A 统计图。与对照组相比,*** $P < 0.001$ ($n=6$)。CON: 对照组;H/R: 缺氧复氧组。

图 1 H/R 刺激对心肌细胞坏死的影响

Figure 1 The effect of H/R injury on the necrosis of cardiomyocytes

2.2 缺氧/复氧增加心肌细胞 RIP1、RIP3 的蛋白表达水平

RIP1 和 RIP3 是诱导程序性坏死信号通路激活的两个关键蛋白。Western blot 检测结果发现,心肌细胞缺氧 2 h 复氧 4 h 后,与对照组相比,心肌细胞内 RIP1 的蛋白表达水平有所增加($P < 0.05$),RIP3 的蛋白表达水平则显著上升($P < 0.01$,图 2A、B),提示 RIP1 与 RIP3 可能参与调节 H/R 诱导的心肌细胞坏死。

2.3 缺氧/复氧促进心肌细胞 RIP1/RIP3 复合物 II 形成

RIP1 与 RIP3 形成的 RIP1/RIP3 复合物 II 对于程序性坏死信号通路的激活是必须的。免疫共沉淀实验结果显示:与对照组相比,H/R 组 RIP1 与 RIP3 的结合水平有所上升(图 3),说明 RIP1/RIP3 复合

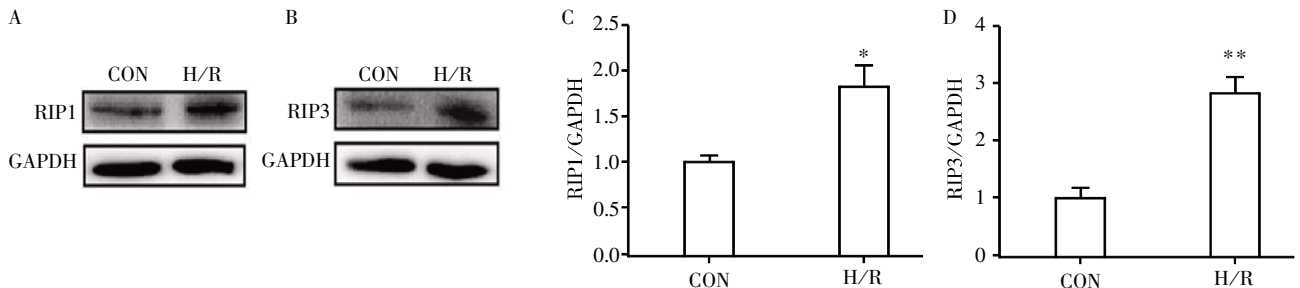
物 II 形成增多。以上结果表明,RIP1、RIP3 介导的程序性坏死信号通路可能参与了 H/R 诱导心肌细胞坏死的调节过程。

2.4 缺氧/复氧增加心肌细胞 RIP1 与 RIP3 的泛素化水平

蛋白质泛素化是蛋白修饰的一种常见形式,在介导程序性坏死信号通路的过程中,RIP1 与 RIP3 会发生泛素化等修饰从而介导下游信号通路。图 4 实验结果显示,心肌细胞缺氧 2 h 复氧 4 h 后,与对照组相比,RIP1 与 RIP3 的泛素化水平均明显上升。

3 讨论

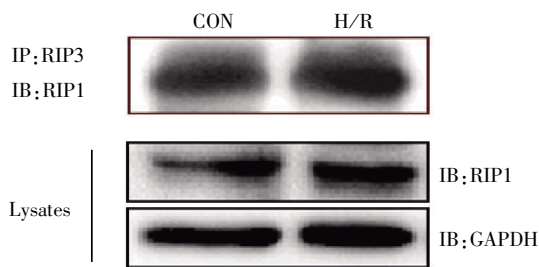
在心肌梗死、心肌缺血-再灌注损伤、心力衰竭等心血管疾病的发生发展过程中,心肌细胞死亡在其中具有不可估量的推动作用^[3]。虽然在这些疾病



A: Western blot 检测 RIP1 蛋白表达水平;B: Western blot 检测 RIP3 蛋白表达水平;C: 图 A 统计图;D: 图 B 统计图。与对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ ($n=4$)。CON: 对照组;H/R: 缺氧复氧组。

图 2 H/R 刺激对 RIP1、RIP3 蛋白表达的影响

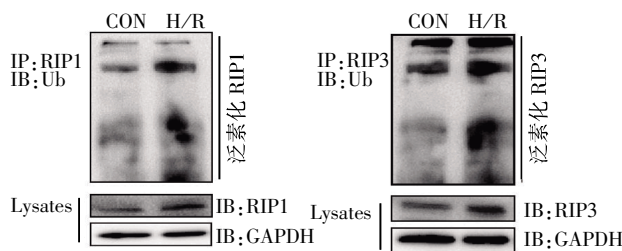
Figure 2 The effect of H/R injury on RIP1 and RIP3 protein expression



CON:对照组;H/R:缺氧复氧组;IP:免疫沉淀;IB:免疫印迹。

图 3 H/R 刺激对 RIP1/RIP3 复合物 II 形成的影响

Figure 3 The effect of H/R injury on RIP1/RIP3 complex II formation



CON:对照组;H/R:缺氧复氧组;IP:免疫沉淀;IB:免疫印迹。

图 4 H/R 刺激对 RIP1 与 RIP3 泛素化水平的影响

Figure 4 The effect of H/R injury on ubiquitination level of RIP1 and RIP3

发生以后,凋亡细胞的数量成百倍地增加,但依然只占细胞总死亡数量的不到 1%,而坏死则为细胞死亡的主要形式^[5-6]。长期以来,细胞坏死一直被认为是一种被动的无序的死亡形式而被研究者们忽略,但近期大量研究表明,还存在着一种严格受分子机制调控的细胞坏死形式,称为程序性坏死。有文献报道,受调控的细胞坏死,即程序性坏死,在许多心血管疾病发生发展的过程中具有重要的调控作用^[7-11]。本文通过建立体外模拟心肌缺血-再灌注损伤的心肌细胞 H/R 损伤模型研究程序性坏死在其中可能发挥的作用及机制。

研究发现,缺氧 2 h 复氧 4 h 可导致心肌细胞大量坏死。这种心肌细胞坏死是一种被动的无序的细胞死亡,亦或是由受严格调控的程序性坏死信号通路介导的死亡?程序性坏死是由死亡受体启动激活的,而死亡受体中最主要的是 TNF 受体 1(TNFR1),当 TNF- α 与 TNFR1 结合后,激活 RIP1,活化的 RIP1 可以通过激活不同的信号通路从而诱导细胞凋亡或者坏死^[8,12-14]。当招募并激活前体 caspase8 时 RIP1 介导细胞凋亡信号通路;RIP1 与 RIP3 蛋白都含有同型相互作用区(homotypic interaction motif, RHIM),当 RIP1 通过 RHIM 与下游 RIP3 相互结合

成复合物 II 时则介导细胞发生程序性坏死^[15-17]。本研究结果显示,心肌细胞 H/R 损伤后,细胞内 RIP1、RIP3 的蛋白表达水平和 RIP1/RIP3 复合物 II 形成增多,提示心肌细胞 H/R 损伤引起的心肌细胞坏死与程序性坏死 RIP1/RIP3 信号通路相关。

当 TNF- α 与 TNFR1 结合激活 RIP1 后,TNFR1 可以与 RIP1 结合形成复合物 I,复合物 I 包括 TNFR1、TRADD(TNF-receptor associated death domain)、RIP1、TRAF2(TNFR-associated factors 2)、cIAP1/2(cellular inhibitors of apoptosis 1 and 2),其中 cIAP1/2 可以作为一种 E3 泛素化连接酶使 RIP1 发生泛素化,使 RIP1 活化介导后续的信号通路,导致细胞凋亡或者坏死^[7,18-19]。研究发现,H/R 可导致心肌细胞内 RIP1 泛素化水平增加,这也初步证实了心肌细胞 H/R 损伤可以激活程序性坏死相关的 RIP1 信号。当 RIP1 从复合体 I 中游离出来后,与 RIP3 结合形成复合物 II,有文献报道,在形成复合物 II 时,RIP3 会发生泛素化,它是 RIP3 的一种活化形式^[9,20]。研究发现,在给予 H/R 刺激后,心肌细胞内 RIP3 泛素化水平亦明显增加,表明 H/R 损伤诱导心肌细胞发生程序性坏死与 RIP3 泛素化激活相关。

综上所述,H/R 损伤可以诱导心肌细胞坏死,其机制可能与激活程序性坏死 RIP1/RIP3 信号通路相关,为进一步阐明心肌细胞 H/R 损伤及心肌 IR 的发病机制提供了重要的依据。

[参考文献]

- [1] Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, et al. Heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2010, 121(7): e46-e215
- [2] 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
- [3] Wang JX, Zhang XJ, Li Q, et al. MicroRNA-103/107 regulate programmed necrosis and myocardial ischemia/reperfusion injury through targeting FADD[J]. *Circ Res*, 2015, 117(4): 352-363
- [4] Whelan RS, Kaplinskiy V, Kitsis RN. Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance[J]. *Annu Rev Physiol*, 2010, 72(1): 19-44
- [5] Dorn GN. Apoptotic and non-apoptotic programmed cardiomyocyte death in ventricular remodelling[J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 81(3): 465-473
- [6] Wang K, Long B, Li N, et al. MicroRNA-2861 regulates

- programmed necrosis in cardiomyocyte by impairing adenine nucleotide translocase 1 expression[J]. *Free Radic Biol Med*, 2016, 91(1): 58–67
- [7] Linkermann A, Green DR. Necroptosis[J]. *N Engl J Med*, 2014, 370(5): 455–465
- [8] Kung G, Konstantinidis K, Kitsis RN. Programmed necrosis, not apoptosis, in the heart[J]. *Circ Res*, 2011, 108(8): 1017–1036
- [9] Luedde M, Lutz M, Carter N, et al. RIP3, a kinase promoting necroptotic cell death, mediates adverse remodeling after myocardial infarction[J]. *Cardiovasc Res*, 2014, 103(2): 206–216
- [10] He S, Liang Y, Shao F, et al. Toll-like receptors activate programmed necrosis in macrophages through a receptor-interacting kinase-3-mediated pathway[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(50): 20054–20059
- [11] Linkermann A, Brasen JH, Darding M, et al. Two independent pathways of regulated necrosis mediate ischemia-reperfusion injury [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(29): 12024–12029
- [12] Linkermann A, Hackl MJ, Kunzendorf U, et al. Necroptosis in immunity and ischemia-reperfusion injury [J]. *Am J Transplant*, 2013, 13(11): 2797–2804
- [13] Moriwaki K, Chan FK. Necrosis-dependent and independent signaling of the RIP kinases in inflammation[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2014, 25(2): 167–174
- [14] Narayan N, Lee IH, Borenstein R, et al. The NAD-dependent deacetylase SIRT2 is required for programmed necrosis[J]. *Nature*, 2012, 492(7428): 199–204
- [15] Blander JM. A long-awaited merger of the pathways mediating host defence and programmed cell death[J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(9): 601–618
- [16] Lamothe B, Lai Y, Xie M, et al. TAK1 is essential for osteoclast differentiation and is an important modulator of cell death by apoptosis and necroptosis[J]. *Mol Cell Biol*, 2013, 33(3): 582–595
- [17] 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
- [18] Khan N, Lawlor KE, Murphy JM, et al. More to life than death; molecular determinants of necroptotic and non-necroptotic RIP3 kinase signaling[J]. *Curr Opin Immunol*, 2014, 26(1): 76–89
- [19] Christofferson DE, Yuan J. Necroptosis as an alternative form of programmed cell death[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2010, 22(2): 263–268
- [20] Cho YS, Challa S, Moquin D, et al. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation [J]. *Cell*, 2009, 137(6): 1112–1123

[收稿日期] 2016-02-03

热烈祝贺《南京医科大学(自然科学版)》在第三届中国学术期刊评价中被评为“RCCSE 中国核心学术期刊(A)”! 本次共有 6448 种中文学术期刊参与评价, 经过综合评价后得到期刊相应的等级, 共计 1939 种学术期刊进入核心期刊区。