

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.16.001

· 基础研究 ·

小鼠不同组织及缺氧损伤后的大鼠心肌细胞中 RIP3 的表达 *

单冬凯 邹路路 宋晓伟 赵仙先 荆 清[△]

(第二军医大学长海医院心血管内科 上海 200433 中国)

摘要 目的:检测小鼠组织中受体相互作用丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族(RIPs)表达谱,并检测 RIP3 在大鼠心肌细胞缺氧损伤后的表达。**方法:**① 采用荧光实时定量 PCR 分别检测 RIPs 家族基因在小鼠组织(心、肝、肺、肾、脑、小肠、骨骼肌、脾和主动脉)中的 mRNA 表达谱,并采用 Western blot 进一步检测 RIP3 在小鼠组织的蛋白表达谱。② 将培养的大鼠心肌细胞分为缺氧组和对照组,缺氧组置于缺氧环境中培养 48 h,采用 western blot 检测其中 RIP3 的表达变化。**结果:**① mRNA 水平:RIP1 mRNA 在脑组织中表达最高,心脏、肺、肾、骨骼肌较低;RIP2 在心脏和肺表达量较其他组织高;RIP3 在肠中表达较其他组织高出 4 倍以上,脑组织中未检测到 RIP3 表达;RIP4 的表达以肺最高,而骨骼肌、脑和血管中表达量低。② 蛋白水平:在小鼠组织中,RIP3 表达以脑、骨骼肌中最高,心脏、肝、肺中表达较低。③ 培养的大鼠心肌细胞中,缺氧组心肌细胞的 RIP3 表达量显著高于对照组($P<0.05$)。**结论:**RIPs 在小鼠组织中呈现差异表达,而在培养的大鼠心肌细胞缺氧损伤后 RIP3 表达升高。

关键词:丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族;心肌细胞;缺氧;坏死

中图分类号:Q95-3;R54 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)16-3001-04

Expression Profile of Receptor Interacting Protein 3 in Different Mouse Tissues and Rat's Myocardial Cells with Hypoxia Injury*

SHAN Dong-kai, ZOU Lu-lu, SONG Xiao-wei, ZHAO Xian-xian, JING Qing[△]

(Department of Cardiology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai, 200433, China)

ABSTRACT Objective: To detect the expression profile of receptor interacting proteins (RIPs) in mouse tissues, and to detect the expression of RIP3 in rat's myocardial cells with hypoxia injury. **Methods:** ① We detected the expression profile of RIPs family in mouse tissues (heart, liver, lung, kidney, brain, intestine, skeletal muscles, spleen and aorta) by real-time fluorescent quantitative PCR, then detected the expression profile of RIP3 protein. ② The myocardial cells of rat were divided into hypoxia group and control. We treated the first group for 48 h on hypoxia to obtain hypoxia injured models, then quantitated the expression of RIP3 by western blot. **Results:** ① On mRNA level, the expression of RIP1 was highest in brain, but lower in heart, lung, kidney and skeletal muscle; the expression of RIP2 was higher in heart and lung than other tissues; RIP3 in the intestine was 4 times higher than other, but it was very low expression in brain; the expression of RIP4 was highest in lung, and was lowest in skeletal muscle, brain, spleen, and vessel. ② Western blot results showed the expression of RIP3 at protein level. It was higher expressed in brain, skeletal muscle, however, lower in heart, liver and lung. ③ After treated on hypoxia, RIP3 of hypoxia group was significantly higher than control in the cultured rat myocardial cell ($P<0.05$). **Conclusions:** The expression of RIPs represented various level in mouse tissues. RIP3 increased in rat myocardial cells under hypoxia injured condition.

Key words: Receptor interacting proteins(RIPs); Myocardial cells; Hypoxia; Necrosis

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3; R54 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)16-3001-04

前言

细胞在遭受有害刺激下发生病理性死亡,并伴有组织炎症反应^[1],称为细胞坏死,例如心肌梗死后急性心肌细胞坏死。近期研究发现,受体相互作用蛋白家族(receptor interacting pro-

teins, RIPs)是调控细胞坏死的重要分子之一。RIPs 是一类具有丝氨酸/苏氨酸激酶活性的蛋白激酶,表达于机体各组织细胞中,成员包括 RIP1~RIP7^[2],其中,受体相互作用丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 3 (receptor interacting serine threonine kinase 3, RIP3)因与细胞凋亡^[3,4]、细胞坏死^[5]、胚胎发育^[6]、肿瘤发生^[7,8]关

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81130005, 31100830)

作者简介:单冬凯(1984-),男,硕士研究生,医师,主要研究方向:心血管疾病,电话:021-31161266, E-mail: shandongkai1234@163.com

△ 通讯作者:荆清, E-mail: qjing@sibs.ac.cn

(收稿日期:2013-10-15 接受日期:2013-11-13)

系密切而受到关注。RIP3 全长 1557 bp, 编码 518 个氨基酸, 最早由 Sun^[9]和 Yu^[10]等人发现。RIP3 的结构包括一个 RIPs 家族成员共有的具有激酶活性的 N 末端, 而其 C 末端则不同于其他 RIPs^[9,10]。RIP3 在细胞坏死中扮演着重要角色, 但它在缺氧所导致的心肌细胞坏死方面尚未见报道, 故本实验旨在通过检测 RIP3 表达水平, 发现 RIP3 在缺氧诱导的细胞坏死中的表达改变。

1 材料和方法

1.1 主要材料与试剂

荧光实时定量 PCR 引物、Trizol 购买自 Invitrogen 公司。心肌细胞基础培养基购买自 Sigma 公司。胎牛血清购买自杭州四

季青生物工程材料有限公司。C57BL/6J 小鼠、SD 乳鼠均由第二军医大学实验动物中心提供。

1.2 荧光实时定量 PCR

5 只 6 月龄 C57BL/6J 小鼠, 雌雄不拘, 体重 18~30 g。10 % 水合氯醛腹腔注射 0.1 mL 麻醉后, 取心脏、肝、肺、肾、脑、小肠、下肢骨骼肌、脾各 80~100 mg, 并取整条主动脉, 液氮速冻后, 研磨成粉加入 1 mL Trizol, 按照 Trizol 说明书分别提取总 RNA, 取 500 ng RNA 按照逆转录试剂盒说明书逆转录成 cDNA, 将 1 μ L cDNA 加入 5 μ L Master mix 中, 随后加入各 0.2 μ L 的上游和下游引物, 使用定量 PCR 仪(corbett RG-3000A)对各个组织的 3 份 cDNA 模版扩增 40 个循环。引物见表 1。

表 1 荧光实时定量 PCR 检测 RIP1~RIP4 引物序列

Table1 The primer sequences used for detecting RIP1~RIP4 by real-time fluorescent quantitative PCR

RIPs members	Upstream primer	Downstream primer
RIP1	5'-ACTGCTGAAGATAGGTGCTTCAGAT-3'	5'-GTAAACGGCTTCATCTACTGACCAT-3'
RIP2	5'-TGAAGTCATTAGCACCAAACCTACA-3'	5'-TTTGTAAGTGAAGTCTCTCCCAAAG-3'
RIP3	5'-AAGTGCAGATTGGGAAGTACAAGTC-3'	5'-AGAATGTTGTGAGCTTCAGGAAGTG-3'
RIP4	5'-TGTCATGTCACTGTGGTATTGATTG-3'	5'-TTAAGAAGCCACTATGCCTTCAGAG-3'

1.3 心肌细胞培养和缺氧损伤模型建立

出生 1 天的 SD 乳鼠 8 只, 75 % 酒精消毒, 无菌条件下开胸取心室, 快速置入冷却的 D-Hanks 液中, 剪除心房, 随后将心室剪成约 1 mm³ 组织碎块, 加入胰蛋白酶于 37 $^{\circ}$ C 重复消化直至组织块消失, 终止液终止消化。细胞计数后, 以 $3 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 孔的密度接种于 12 孔板上, 用含 10 % 胎牛血清的 DMEM 培养基于 CO₂ 孵箱、37 $^{\circ}$ C 培养。将培养的心肌细胞进行无血清处理 12 h 使细胞同步化, 然后继续置于无血清培养液中, 在 1 % O₂、94 % N₂、5 % CO₂ 低氧气体环境中培养 48 h 制备缺氧损伤模型, 以无血清常氧培养作为对照, 缺氧组和对照组各 4 组细胞, 48 h 后收集细胞上清, 用来检测 RIP3 蛋白。

1.4 Western blot

将约 50 mg 小鼠组织样品加入 500 μ L 细胞裂解液, 匀浆后离心, 取上清, 12000 rpm 离心 30 min, 取上清保存于 -20 $^{\circ}$ C 备用。用 BCA 法测定蛋白质质量, 取等量蛋白质进行凝胶电泳, 电转移至 PVDF 膜。脱脂奶粉封闭, 加入 RIP3 抗体(1:1000), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBS-T 洗脱后, 加入二抗(1:1000), 室温孵育 120 min。内参为 GAPDH。ECL 化学发光显影, Image J 软件分析。

缺氧损伤心肌细胞的 RIP3 检测与组织检测方法类似, 将心肌细胞缺氧处理后, 分别加入 25 μ L 细胞裂解液, 裂解后收集上清, 12000 rpm 离心 30 min, 取上清保存。后续方法同上, 内参为 GAPDH。

1.5 统计方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行 Student's t 检验, 实验数据以均数 $\pm$ 标准差表示, P<0.05 有统计学意义。

2 结果

2.1 RIP1~RIP4 在小鼠组织中 mRNA 表达谱

荧光实时定量 PCR 结果显示: RIP1 mRNA 在脑组织中表达最高, 脾次之, 心脏、肺、肾、骨骼肌较低; RIP2 在心脏和肺表达量较其他组织高; RIP3 在肠中表达较其他组织高出 4 倍以上, 脑组织中未检测到 RIP3 表达; RIP4 的表达以肺最高, 而骨骼肌、脑和血管中表达量低, 脾组织中几乎未检测到 RIP4。

2.2 RIP3 在小鼠组织中的蛋白表达谱

Western blot 结果显示, 在小鼠组织中(见图 2), RIP3 表达在脑、骨骼肌中最高, 心脏、肝、肺中表达较少, 而 RIP3 mRNA 水平表达最高的肠组织中 RIP3 蛋白含量并不高。

2.3 RIP3 在大鼠心肌细胞缺氧处理后表达升高

Western blot 结果显示, 经过缺氧处理后的大鼠心肌细胞中 RIP3 表达水平是对照组的 4 倍左右, 表明 RIP3 蛋白在缺氧心肌细胞中表达升高(*P<0.05, 见图 3)。

3 讨论

RIPs 是重要的细胞应激传感分子, 参与调控细胞存活、细胞凋亡和细胞坏死过程。本研究结果显示, 在 mRNA 水平, RIP1、RIP3 主要表达于心脏、肾、脑等组织中。而既往研究发现, RIP1 和 RIP3 能够形成促坏死复合体 II, 诱导细胞坏死^[11]。RIP3 作为 RIP1 的上游蛋白, 调节 RIP1 的磷酸化^[9], 并且二者在结构上存在同源结构域 RHIM(RIP homotypic interaction motif), 表明它们功能相似和表达趋同, 这一点在我们的实验中也得到验证。RIP2 组织表达普遍较低, 主要存在于心脏、肺和血管中, 据报道, 可能与细胞增殖和免疫反应相关^[12,13]。

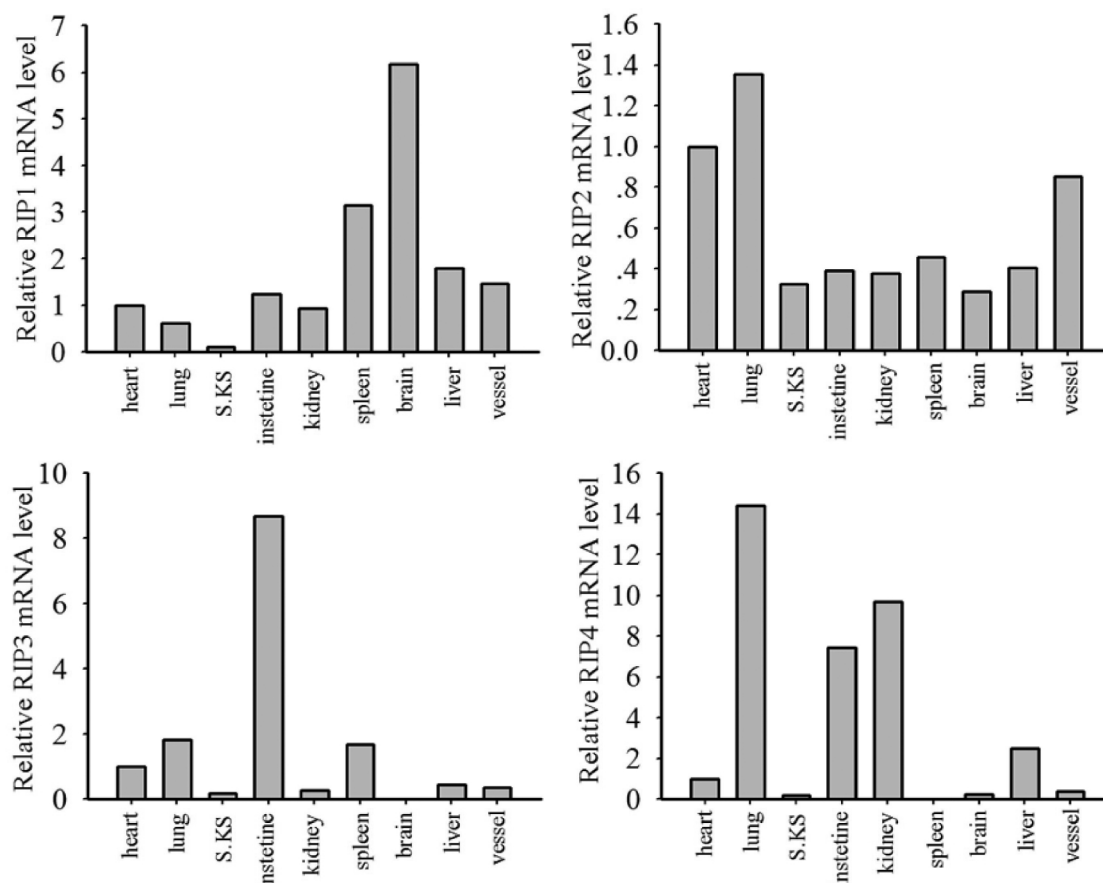


图1 小鼠 RIP1~RIP4 mRNA 表达谱

注:S.KS 骨骼肌

Fig. 1 The mRNA expression profile of RIP1~RIP4 in mouse

Note; S.KS, skeletal muscle

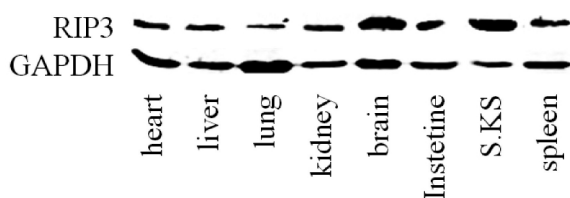


图2 小鼠 RIP3 蛋白表达谱注:S.KS 骨骼肌

Fig. 2 The protein expression profile of RIP3 in mouse Note; S.KS, skeletal muscle

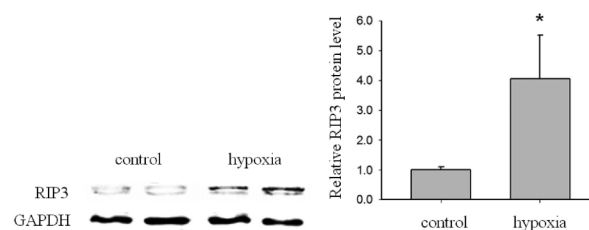


图3 缺氧处理后的大鼠心肌细胞中 RIP3 表达升高

Fig.3 The expression of RIP3 increased in mouse myocardial cells after hypoxia treated

由于心脏组织中 RIP1、RIP3、RIP4 mRNA 表达较低,且有文献报道 RIP3 与细胞坏死密切相关,因此我们设计选取了 RIP3 作为研究对象。既往表明,在 Phoenix A、HeLa、293E、MCF7 等多种细胞中过表达 RIP3 将导致细胞凋亡^[9,14,15]。但近期研究发现,RIP3 也与细胞坏死关系密切。RIP3 能够正向调控肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor α , TNF- α),采用 RNAi 干扰 RIP3 表达后,TNF- α 诱导的细胞坏死受到显著抑制^[7]。TNF- α 处理的 A 细胞(一种不表达 RIP3 的 NIH-3T3 细胞系)发生凋亡,而 N 细胞(一种高表达 RIP3 的 NIH-3T3 细胞系)却在 TNF- α 诱导下发生细胞坏死^[16],这表明 RIP3 是参与调节细胞

凋亡与坏死相互转换的开关分子。此外,RIP3 既能促进核转录因子 NF- κ B 的活化,也能够抑制其活化^[9,14],研究发现,这种作用差异与 RIP1 有关。RIP3 促进了 RIP1 的磷酸化,抑制 RIP1 诱导的 NF- κ B 活化^[17,18],同时 RIP3 也能够直接活化 NF- κ B,促进 NF- κ B 的核转位,但作用仅相当于 RIP1 的 50%左右^[14]。

在缺氧的心肌细胞中,升高的 RIP3 增强了糖原磷酸化酶(PYGL)、谷氨酰胺合成酶(GLUL)和谷氨酸脱氢酶(GLUD1)的催化活性,促进了下游产物活性氧(reactive oxygen species, ROS)的蓄积,而已知 ROS 是细胞坏死的重要参与者^[5,16],因此,

RIP3 可能是通过增加 ROS 产物导致了细胞坏死^[9]。RIP3 能够稳定调节促坏死复合体,激活促坏死激酶活性,促进 ROS 产物增加^[5]。敲低 N 细胞中的 RIP3 表达,TNF- α 和 zVAD(一种 caspase 抑制剂) 诱导处理后所产生的 ROS 相对浓度比对照组明显降低;相反,恢复 A 细胞中 RIP3 表达后,ROS 表达升高^[16]。而 Vanlangenakker 等人^[20] 则发现 cIAP1 能够通过阻止 RIP1/RIP3 依赖的 ROS 产物蓄积,保护细胞免遭 TNF 诱导的坏死,这表明 RIP3 在 ROS 产物诱导的细胞坏死中是必需的。本实验中,缺氧心肌细胞中 RIP3 的表达升高,与以往研究结果相吻合,进一步证实了 RIP3/ROS 参与诱导细胞坏死,但更深层次的机制尚不清楚。

值得注意的是,RIP3 的 western blot 与荧光实时定量 PCR 组织表达谱结果并不一致,可能是 RIP3 蛋白受到转录后调控所致,其诱导坏死的活性应当与蛋白表达高低相对应。

综上所述,RIP3 是决定细胞坏死的重要分子,通过检测缺氧心肌细胞中 RIP3 表达,找到这种小分子参与调节缺氧条件下细胞死亡的证据,探索并发现心肌细胞缺氧损伤机制,对提高细胞应对缺氧的能力具有重要意义。

参考文献(References)

- [1] Festjens N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1757(9-10): 1371-1387
- [2] Zhang D, Lin J, Han J. Receptor-interacting protein (RIP) kinase family[J]. *Cell Mol Immunol*, 2010, 7(4): 243-249
- [3] Sun X, Lee J, Navas T, et al. RIP3, a novel apoptosis-inducing kinase [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(24): 16871-16875
- [4] Kasof GM, Prosser JC, Liu D, et al. The RIP-like kinase, RIP3, induces apoptosis and NF-kappaB nuclear translocation and localizes to mitochondria[J]. *FEBS Lett*, 2000, 473(3): 285-291
- [5] 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
- [6] Kaiser WJ, Upton JW, Long AB, et al. RIP3 mediates the embryonic lethality of caspase-8-deficient mice [J]. *Nature*, 2011, 471(7338): 368-372
- [7] He S, Wang L, Miao L, et al. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha [J]. *Cell*, 2009, 137(6): 1100-1111
- [8] Cerhan JR, Ansell SM, Fredericksen ZS, et al. Genetic variation in 1253 immune and inflammation genes and risk of non-Hodgkin lymphoma [J]. *Blood*, 2007, 110(13): 4455-4463
- [9] Yu PW, Huang BC, Shen M, et al. Identification of RIP3, a RIP-like kinase that activates apoptosis and NFkappaB [J]. *Curr Biol*, 1999, 9(10): 539-542
- [10] Izumi KM, Cahir McFarland ED, Ting AT, 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[J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(8): 5759-5767
- [11] 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
- [12] Ehlers S, Mueck T, Adams S, et al. RIP2 regulates growth and differentiation of normal myoblasts and of rhabdomyosarcoma cells [J]. *Eur J Cell Biol*, 2008, 87(3): 163-172
- [13] Adams S, Valchanova RS, Munz B. RIP2: a novel player in the regulation of keratinocyte proliferation and cutaneous wound repair? [J]. *Exp Cell Res*, 2010, 316(5): 728-736
- [14] Pazdernik NJ, Donner DB, Goebel MG, et al. Mouse receptor interacting protein 3 does not contain a caspase-recruiting or a death domain but induces apoptosis and activates NF-kappaB [J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(10): 6500-6508
- [15] Cho Y, Challa S, Chan FK. A RNA interference screen identifies RIP3 as an essential inducer of TNF-induced programmed necrosis [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2011, 691: 589-593.
- [16] Zhang DW, Shao J, Lin J, et al. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis [J]. *Science*, 2009, 325(5938): 332-336
- [17] Sun X, Yin J, Starovasnik MA, et al. Identification of a novel homotypic interaction motif required for the phosphorylation of receptor-interacting protein (RIP) by RIP3 [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(11): 9505-9511
- [18] Kaiser WJ, Offermann MK. Apoptosis induced by the toll-like receptor adaptor TRIF is dependent on its receptor interacting protein homotypic interaction motif [J]. *J Immunol*, 2005, 174(8): 4942-4952
- [19] Vandenabeele P, Declercq W, Van Herreweghe F, et al. The role of the kinases RIP1 and RIP3 in TNF-induced necrosis [J]. *Sci Signal*, 2010, 3(115): re4
- [20] Vanlangenakker N, Vanden Berghe T, Bogaert P, et al. cIAP1 and TAK1 protect cells from TNF-induced necrosis by preventing RIP1/RIP3-dependent reactive oxygen species production [J]. *Cell Death Differ*, 2011, 18(4): 656-665