

## · 综述 ·

## 坏死性凋亡与糖尿病及慢性微血管并发症关系的研究进展

李丽 曹明明

哈尔滨医科大学附属第一医院内分泌科, 哈尔滨 150000

通信作者: 曹明明, Email: mmcao1983@hotmail.com

**【摘要】** 糖尿病是 21 世纪全球面临的最严重、最危急的健康问题之一。我国糖尿病患者人数目前位居全球第一。糖尿病微血管病变是糖尿病最普遍的并发症,严重影响人们的生活质量。坏死性凋亡是近年来发现的一种新型的细胞程序性死亡途径,参与炎症反应。研究表明坏死性凋亡参与糖尿病的发病过程,抑制坏死性凋亡可以减轻糖尿病慢性微血管并发症的发生。该综述就坏死性凋亡在糖尿病及其微血管并发症中的作用机制展开论述。

**【关键词】** 坏死性凋亡;受体相互作用蛋白激酶 1/3;混合谱系激酶结构域样蛋白;糖尿病;糖尿病微血管并发症

**基金项目:**国家自然科学基金项目(82100884);国家重点研发计划(2018YFC1313902)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121383-20220226-02065

**Research progress on the relationship between necroptosis and diabetes mellitus and chronic microvascular complications** Li Li, Cao Mingming. Endocrinology Department, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Haerbin 150000, China

Corresponding author: Cao Mingming, Email: mmcao1983@hotmail.com

**【Abstract】** Diabetes mellitus is one of the most serious and critical health problems in the 21st century. At present, the number of diabetes patients in our country ranks first in the world. Diabetic microangiopathy is one of the most common complications of diabetes mellitus, which affects people's quality of life seriously. Necroptosis is a new found programmed cell death pathway, which is involved in inflammatory reaction. Studies have shown that necroptosis is involved in the pathogenesis of diabetes mellitus, and inhibition of necroptosis can reduce the occurrence of chronic microvascular complications of diabetes mellitus. This review focuses on the role of necroptosis in diabetes and its microvascular complications.

**【Keywords】** Necroptosis; Receptor interaction protein kinase 1/3; Mixed lineage kinase domain-like protein; Diabetes; Diabetic microvascular complications

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China(82100884); National Key Research and Development Program(2018YFC1313902)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121383-20220226-02065

糖尿病被认为是一种全球性疾病,已经成为人类健康最大的隐形杀手。根据国际糖尿病联盟(IDF)发布的第 10 版《全球糖尿病地图》数据显示:预计到 2045 年全球糖尿病患者人数将达到 7.83 亿。2021 年约有 670 万成年人死于糖尿病或其并发症,占全球全因死亡人数的十分之一以上<sup>[1]</sup>。糖尿病是由于胰岛素分泌及(或)作用缺陷引起的以血糖升高为特征的代谢病。长期血糖欠佳,可能导致心脏、肾脏、眼等多种器官发生慢性损伤及功能障碍。坏死性凋亡是近年来在人类疾病中发现的

一种可受调控的细胞死亡形式,在多种细胞内外因素的刺激下,坏死性凋亡关键蛋白被逐级激活发生磷酸化,导致质膜完整性丧失,逐步放大炎症反应,参与糖尿病及慢性并发症的发生发展。

## 1 坏死性凋亡

**1.1 坏死性凋亡的发生机制** 坏死性凋亡,又名程序性坏死,是一种新发现的调节性细胞死亡方式,在发生机制上为一种独特的不同于凋亡信号通路的细胞程序性死亡。受体相互作用蛋白激酶 1/3(receptor interacting protein kinase 1/3, RIPK1/3)及

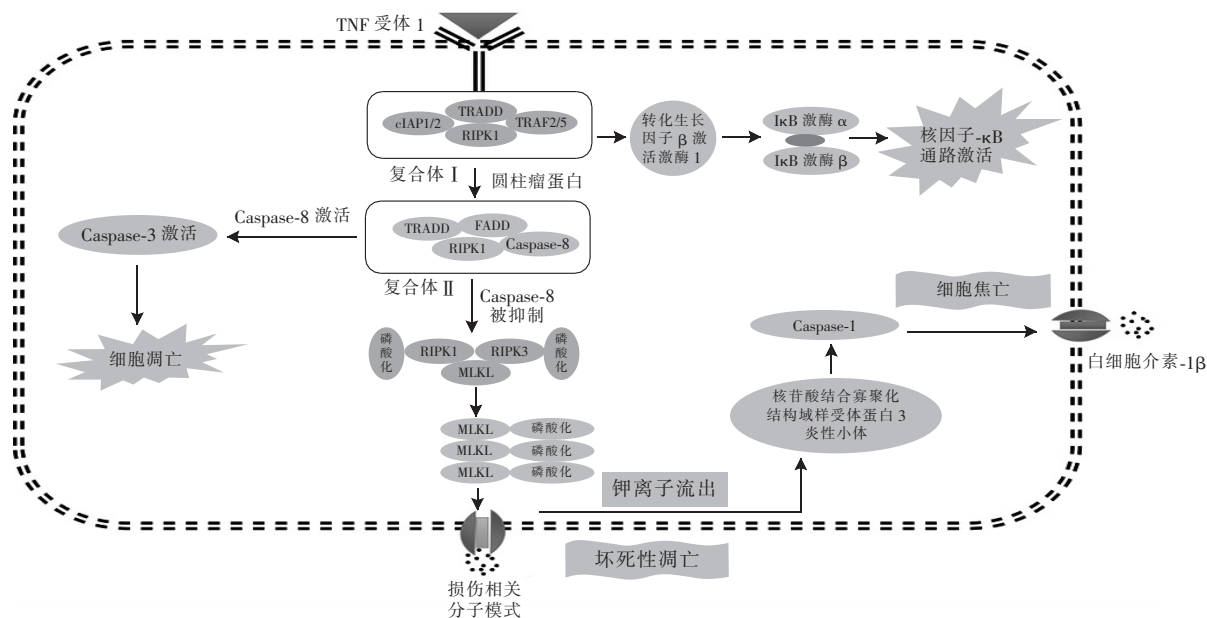
下游效应蛋白混合谱系激酶结构域样蛋白 (mixed lineage kinase domain-like protein, MLKL) 是该途径的关键信号分子。细胞在受到不同的刺激,主要是肿瘤坏死因子 (TNF), 可以激活坏死性凋亡途径<sup>[2]</sup>。在缺乏半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-8 (caspase-8) 活性的情况下, RIPK1 会在其丝氨酸/苏氨酸残基位点发生自身磷酸化, 并且与 RIPK3 通过 RIP 同型作用结构域 (RIP homotypic interaction motif, RHIM) 相结合, 形成坏死体 RIPK1-RIPK3, 募集并激活下游效应蛋白 MLKL, 并使其发生磷酸化, 然后转移至细胞膜, 造成细胞膜发生爆炸样破裂, 释放损伤相关分子模式 (damage-associated molecular patterns, DAMPs) 触发炎症反应, 从而介导坏死性凋亡的发生<sup>[3]</sup>。

1.2 凋亡、坏死性凋亡及焦亡的区别与联系 程序性细胞死亡途径包括凋亡、坏死性凋亡和焦亡, 3 者并不是相互平行的, 它们既紧密联系, 又相互区别<sup>[4]</sup>。TNF 与 TNF 受体 1 (TNFR1) 结合募集 RIPK1、TNF 受体相关因子 2/5 (TRAF2/5)、细胞凋亡抑制蛋白 1/2 (inhibitor of apoptosis protein 1/2, cIAP1/2) 及 TNF 受体相关死亡结构域蛋白 (TRADD) 形成复合物 I。RIPK1 在 cIAP 和 TRAF 的作用下, 发生泛素化, 导致核因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 通路被激活, 从而促进细胞存活。此外, 当 RIPK1 被圆柱瘤蛋白 (cylindroma, CYLD) 去泛素化时, 形成了由 RIPK1、TRADD、caspase-8 和

Fas 相关死亡结构域蛋白 (fas-associating death domain-containing protein, FADD) 组成的复合物 II<sup>[5]</sup>。细胞发生凋亡还是坏死性凋亡主要取决于 caspase-8<sup>[6]</sup>, caspase-8 可以通过蛋白水解切割使 RIPK1 和 RIPK3 失活, 从而导致细胞凋亡。反之, 当 caspase-8 活性被抑制时, 坏死性凋亡途径激活。焦亡与坏死性凋亡在 DAMPs 的释放和炎症的传播有相似之处, 但是它们潜在的分子调节和局部组织损伤的能力是不同的。焦亡是 caspase 依赖性的, 效应蛋白为消皮素 (gasdermins) 家族, 质膜逐渐肿胀至破裂, 而坏死性凋亡是非 caspase 依赖性的, 效应蛋白为 MLKL, 细胞发生渗透膨胀以使其质膜发生爆炸样破裂<sup>[7]</sup>。MLKL 介导的质膜破裂后引起钾离子外流, 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (nucleotides bind to oligomeric domain-like receptor proteins 3, NLRP3) 炎症小体被激活, 进一步激活 caspase-1 并释放白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), 诱导细胞焦亡<sup>[8]</sup>, 见图 1。

## 2 坏死性凋亡与糖尿病

慢性炎症是胰岛素抵抗和胰岛  $\beta$  细胞损伤的重要原因。人们为了确定斑马鱼肌肉胰岛素抵抗模型中  $\beta$  细胞损失的分子机制, 选择了 3 种细胞死亡抑制剂, 其中 RIPK1 抑制剂 (necrostatin-1, Nec-1) 和 RIPK3 抑制剂 GSK'872 均能防止  $\beta$  细胞损伤。相反, 细胞凋亡抑制剂则无明显效果。这些结果表明 RIPK1-RIPK3 介导的坏死性炎症在营养过剩诱



注: TNF: 肿瘤坏死因子; TRADD: 肿瘤坏死因子受体相关死亡结构域蛋白; cIAP1/2: 细胞凋亡抑制蛋白 1/2; TRAF2/5: 肿瘤坏死因子受体相关因子 2/5; RIPK1/3: 受体相互作用蛋白激酶 1/3; FADD: Fas 相关死亡结构域蛋白; MLKL: 混合谱系激酶结构域样蛋白; Caspase-1/3/8: 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1/3/8。

图 1 坏死性凋亡涉及途径示意图

导的  $\beta$  细胞损伤中的重要作用<sup>[9]</sup>。高脂诱导的肥胖小鼠 (ob/ob) 模型中, RIPK1、RIPK3、MLKL 在脂肪相关组织中的表达上调, MLKL<sup>-/-</sup> 小鼠和使用 Nec-1 均可改善 ob/ob 小鼠的胰岛素抵抗和葡萄糖耐量受损<sup>[10]</sup>。在许多组织中, RIPK3 表达上调会增加细胞对坏死性凋亡的敏感性, 从而介导炎症反应, 但是 Gautheron 等<sup>[11]</sup> 研究发现 RIPK3 在肥胖小鼠的白色脂肪组织中过度表达, RIPK3 可通过抑制 caspase-8 依赖性脂肪细胞凋亡来维持体内平衡并抑制炎症, 防止胰岛素信号传导异常和葡萄糖稳态受损。此外, Xu 等<sup>[10]</sup> 研究发现抑制坏死性凋亡蛋白 MLKL 可以通过调节肝细胞中的胰岛素信号传导分子磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸 (phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate, PI-3,4,5-P3) 所诱导的丝氨酸苏氨酸蛋白激酶 (serine/threonine protein kinases, AKT) 磷酸化水平, 从而改善胰岛素抵抗。上述研究证明, 凋亡和坏死性凋亡是促进还是抑制炎症作用, 与不同组织和不同刺激密切相关。

### 3 坏死性凋亡与糖尿病视网膜病变

糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是糖尿病最典型的微血管并发症之一, 也是导致成人致盲的首要原因。DR 的病理基础是视网膜微血管基底膜增厚, 导致周细胞丢失和血视网膜屏障功能受损。视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 是 DR 早期受影响的第一个细胞, 具有最高的凋亡率。高血糖会增加视网膜细胞中的过氧化物水平, 促进细胞活力受损和细胞凋亡。Gao 等<sup>[12]</sup> 研究发现高糖培养的 RGCs 中坏死性凋亡关键蛋白 RIPK1 和 RIPK3 的表达显著增加, 从而诱导坏死小体聚集, 级联放大炎症反应, 使用 Nec-1 可以显著增加细胞内尼氏体数量, 减轻 RGCs 损伤, 证实 Nec-1 可抑制高糖诱导下的 RGCs 中 RIPK1-RIPK3 介导的坏死性凋亡途径。DR 易导致视网膜缺血, 视网膜作为高代谢器官, 对缺血缺氧非常敏感。在视网膜缺血再灌注损伤 (retinal ischemia-reperfusion injury, RIRI) 模型中, 组织切片免疫荧光染色均发现 RIP1/RIP3 在 RIRI 发生后 1 d 及 2 d 时显著增高, 随后呈下降趋势, 推测在 RIRI 的早期以坏死性凋亡为主, 而在 RIRI 的晚期以凋亡为主<sup>[13]</sup>。给予 Nec-1 治疗的缺血性视网膜中, RGC 坏死减少, 存活率增加, 同时编码促炎标志物 *Il1b*、*Ccl5*、*Cxcl10*、*Nos2Cybb* 的基因表达显著降低, 证实坏死性凋亡可通过直接导致细胞丢失和诱导相关炎症反应导致缺血再灌注后的视网膜损伤。Kim 等<sup>[14]</sup> 发现 RIRI

发生过程中, 神经节细胞层中 TNF- $\alpha$  表达增加, 从而激活坏死性凋亡相关因子释放, 使用 Nec-1 可抑制坏死性凋亡, 减轻视网膜细胞损伤。上述实验结果表明坏死性凋亡可能参与 DR 的损伤过程, 开发坏死性凋亡抑制剂对该疾病的早期预防具有重大意义。

### 4 坏死性凋亡与糖尿病肾脏病

据统计, 糖尿病肾脏病 (diabetic kidney disease, DKD) 已经成为全球范围内导致终末期肾衰竭和患者死亡的主要因素之一。越来越多的研究证实坏死性凋亡参与慢性肾脏病的损伤过程。糖尿病患者长期的高血糖、脂代谢紊乱和氧化应激导致肾脏晚期糖基化终末产物 (advanced glycation end products, AGEs) 的产生和累积。AGEs 可促进细胞分泌大量细胞因子, 其中 TNF- $\alpha$  与其受体结合后被激活, 可诱导坏死性凋亡的发生, 进一步加重 DKD 的炎症反应。宋瑞婧等<sup>[15]</sup> 在 DKD 大鼠肾脏中发现坏死性凋亡蛋白 RIP1/PIP3/MLKL 表达量明显增多, 同时伴随着 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1)、转化生长因子- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)、NF- $\kappa$ B mRNA 表达水平升高。与之一致的是, Guo 等<sup>[16]</sup> 也在 DKD 小鼠中检测出 p-RIPK1、p-RIPK3 和 p-MLKL 的蛋白表达水平相应增加, 坏死性凋亡抑制剂 Nec-1 治疗显著降低了尿微量白蛋白、尿素氮 (BUN) 及 DKD 小鼠肾脏中的促炎细胞因子 (IL-1 $\beta$ ) 水平, 并且抑制系膜细胞增殖, 减少基质增加、基底膜增厚和间质炎症细胞浸润。Nec-1 通过抑制细胞坏死和氧化应激, 有效防止肾缺血和再灌注损伤。总的来说, 这些数据表明 Nec-1 显著改善 DKD 小鼠的肾功能、肾脏重塑和纤维化。此外, 众所周知, DKD 其中一个主要病因来自于足细胞的消耗, 已被证明与凋亡相关, 而坏死性凋亡与凋亡共享数个上游信号元件, 所以人们推测坏死性凋亡可能也参与其中。人们还发现泛素羧基末端水解酶-1 (ubiquitin C-terminal hydrolase L1, UCHL1) 通过 RIPK1/RIPK3 通路调节高糖背景下诱导的足细胞凋亡和坏死性凋亡, 并且证实坏死性凋亡在诱导细胞死亡中占据主导地位<sup>[17]</sup>。综上所述, 坏死性凋亡与 DKD 的肾固有细胞损伤密切相关。

### 5 坏死性凋亡与糖尿病心肌病

糖尿病心肌病 (diabetic cardiomyopathy, DCM) 是指在糖尿病基础上, 心脏血管病变及代谢紊乱引发心肌广泛缺血坏死。研究发现抑制坏死性凋亡通过降低钙离子/钙调素依赖性蛋白激酶 II (Ca<sup>2+</sup>/



calmodulin-dependent protein kinase II, CaMK II) 氧化磷酸化水平来改善心肌线粒体超微结构<sup>[18]</sup>。此外,孙硕等<sup>[19]</sup>发现高糖状态下的心肌细胞长期处于低水平的炎症状态,同时伴随着心肌纤维化及氧化应激,这可能与 RIPK1-RIPK3-MLKL 的信号通路激活介导的坏死性凋亡相关。Song 等<sup>[20]</sup>发现糖尿病小鼠心肌中去乙酰化酶 3 (sirtuin 3, SIRT3) 的缺乏会加重高血糖引起的线粒体损伤,增加活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的积累,通过激活坏死性凋亡途径从而激活 NLRP3 炎症小体,最终加剧小鼠的 DCM。使用 Nec-1 干预可抑制坏死性凋亡、减少心脏炎症及改善糖尿病前期大鼠的心脏功能<sup>[21]</sup>。

## 6 坏死性凋亡与糖尿病相关的认知障碍

研究表明葡萄糖耐量或胰岛素敏感性受损与认知灵活性、流体智力、工作记忆、视觉空间能力和语言记忆密切相关,坏死性凋亡标志物 RIPK1 和 RIPK3 在糖尿病前期大鼠的大脑中被上调。Nec-1 通过减少脑炎症、小胶质细胞活性、脑线粒体功能障碍、坏死性凋亡和阿尔茨海默病相关蛋白水平,在海马依赖性和非海马依赖性认知功能改善方面表现出相似的功效<sup>[22]</sup>。此外, RIPK3 可通过激活 NLRP3 炎症小体介导炎症反应, NLRP3 炎症小体信号传导与糖尿病和神经退行性疾病的发展密切相关,抑制 NLRP3 炎症小体可改善糖尿病介导的认知障碍和缺血后血管神经元重构<sup>[23]</sup>。

## 7 总结与展望

综上所述,坏死性凋亡可能通过介导坏死性炎症参与胰岛素抵抗、视网膜细胞、心肌细胞、肾固有细胞及脑损伤从而参与糖尿病及相关慢性并发症的发生发展。抑制坏死性凋亡,靶向调控坏死性凋亡途径,进一步阻断细胞死亡信号可能对于多种疾病的治疗具有潜在的转化应用价值,同时也为糖尿病及其相关并发症的防治提供新的思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参 考 文 献

- [1] Sun H, Saeedi P, Karuranga S, et al. IDF diabetes atlas: global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2022, 183: 109119. DOI: 10.1016/j.diabres.2021.109119.
- [2] Lee SY, Kim H, Li CM, et al. Casein kinase-1 $\gamma$ 1 and 3 stimulate tumor necrosis factor-induced necroptosis through RIPK3 [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10 (12): 923. DOI: 10.1038/s41419-019-2146-4.
- [3] Chen J, Kos R, Garssen J, et al. Molecular insights into the mechanism of necroptosis: the necrosome as a potential therapeutic target [J]. *Cells*, 2019, 8 (12): 1486. DOI: 10.3390/cells8121486.
- [4] Bertheloot D, Latz E, Franklin BS. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death [J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18 (5): 1106-1121. DOI: 10.1038/s41423-020-00630-3.
- [5] Yeap HW, Chen KW. RIPK1 and RIPK3 in antibacterial defence [J]. *Biochem Soc Trans*, 2022, 50 (6): 1583-1594. DOI: 10.1042/BST20211242.
- [6] Fritsch M, Günther SD, Schwarzer R, et al. Caspase-8 is the molecular switch for apoptosis, necroptosis and pyroptosis [J]. *Nature*, 2019, 575 (7784): 683-687. DOI: 10.1038/s41586-019-1770-6.
- [7] Frank D, Vince JE. Pyroptosis versus necroptosis: similarities, differences, and crosstalk [J]. *Cell Death Differ*, 2019, 26 (1): 99-114. DOI: 10.1038/s41418-018-0212-6.
- [8] Zhan C, Huang M, Yang X, et al. MLKL: Functions beyond serving as the executioner of necroptosis [J]. *Theranostics*, 2021, 11 (10): 4759-4769. DOI: 10.7150/thno.54072.
- [9] Yang B, Maddison LA, Zaborska KE, et al. RIPK3-mediated inflammation is a conserved  $\beta$  cell response to ER stress [J]. *Sci Adv*, 2020, 6 (51): eabd7272. DOI: 10.1126/sciadv.abd7272.
- [10] Xu H, Du X, Liu G, et al. The pseudokinase MLKL regulates hepatic insulin sensitivity independently of inflammation [J]. *Mol Metab*, 2019, 23: 14-23. DOI: 10.1016/j.molmet.2019.02.003.
- [11] Gautheron J, Vucur M, Schneider AT, et al. The necroptosis-inducing kinase RIPK3 dampens adipose tissue inflammation and glucose intolerance [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 11869. DOI: 10.1038/ncomms11869.
- [12] Gao S, Huang X, Zhang Y, et al. Investigation on the expression regulation of RIPK1/RIPK3 in the retinal ganglion cells (RGCs) cultured in high glucose [J]. *Bioengineered*, 2021, 12 (1): 3947-3956. DOI: 10.1080/21655979.2021.1944456.
- [13] 孔蕾, 胡敏, 华启云, 等. 实验性视网膜缺血-再灌注损伤中坏死性凋亡相关因子的表达变化 [J]. *眼科新进展*, 2016, (12): 1109-1112. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2016.0296.
- [14] Kim CR, Kim JH, Park HL, et al. Ischemia reperfusion injury triggers TNF $\alpha$  induced-necroptosis in rat retina [J]. *Curr Eye Res*, 2017, 42 (5): 771-779. DOI: 10.1080/02713683.2016.1227449.
- [15] 宋瑞婧, 张欣欣, 高飞, 等. 加味升降散通过介导 RIP1/RIP3/MLKL 通路抑制坏死性凋亡减轻糖尿病肾病大鼠肾脏纤维化 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28 (17): 33-42. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20221792.
- [16] Guo M, Chen Q, Huang Y, et al. High glucose-induced kidney injury via activation of necroptosis in diabetic kidney disease [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2023, 2023: 2713864. DOI: 10.1155/2023/2713864.
- [17] Xu Y, Gao H, Hu Y, et al. High glucose-induced apoptosis and necroptosis in podocytes is regulated by UCHL1 via RIPK1/RIPK3 pathway [J]. *Exp Cell Res*, 2019, 382 (2): 111463. DOI: 10.1016/j.yexcr.2019.06.008.
- [18] Chen Y, Li X, Hua Y, et al. RIPK3-mediated necroptosis in diabetic cardiomyopathy requires CaMKII activation [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 6617816. DOI: 10.1155/2021/6617816.
- [19] 孙硕, 戎李, 莫辰, 等. 糖尿病大鼠心肌损伤中程序性坏死通路相关蛋白的表达 [J]. *蚌埠医学院学报*, 2020, 45 (4): 437-441, 446. DOI: 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2020.04.005.
- [20] Song S, Ding Y, Dai GL, et al. Sirtuin 3 deficiency exacerbates diabetic cardiomyopathy via necroptosis enhancement and NLRP3 activation [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42 (2): 230-241. DOI: 10.1038/s41401-020-0490-7.
- [21] Apaijai N, Jinawong K, Singhanat K, et al. Necrostatin-1 reduces cardiac and mitochondrial dysfunction in prediabetic rats [J]. *J Endocrinol*, 2021, 251 (1): 27-39. DOI: 10.1530/JOE-21-0134.
- [22] Jinawong K, Apaijai N, Wongsuchai S, et al. Necrostatin-1 mitigates cognitive dysfunction in prediabetic rats with no alteration in insulin sensitivity [J]. *Diabetes*, 2020, 69 (7): 1411-1423. DOI: 10.2337/db19-1128.
- [23] Ward R, Li W, Abdul Y, et al. NLRP3 inflammasome inhibition with MCC950 improves diabetes-mediated cognitive impairment and vasoneuronal remodeling after ischemia [J]. *Pharmacol Res*, 2019, 142: 237-250. DOI: 10.1016/j.phrs.2019.01.035.

(收稿日期: 2022-02-26)