



DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2023.230153

RIP3/MLKL 通过激活 4EBP1-eIF4E 通路诱导程序性坏死

王树超¹, 徐玫丽²

(1. 中南大学湘雅二医院医学实验研究中心, 长沙 410011; 2. 中南大学湘雅二医院老年医学科, 长沙 410011)

[摘要] 目的: 程序性坏死是一种由受体相互作用蛋白3(receptor interacting protein 3, RIP3)和混合谱系激酶域样蛋白(mixed lineage kinase domain-like protein, MLKL)介导的细胞死亡形式, 有研究指出哺乳动物雷帕霉素靶蛋白通路可能参与程序性坏死的调控, 真核细胞翻译起始因子4E结合蛋白1(eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1, 4EBP1)-真核起始因子4E(eukaryotic initiation factor 4E, eIF4E)通路是哺乳动物雷帕霉素靶蛋白最重要的下游分子通路之一, 然而此通路是否参与程序性坏死的发生, 目前尚无相关研究。本研究旨在探索4EBP1-eIF4E通路在程序性坏死中是否发生改变。**方法:** 首先向小鼠上皮样成纤维细胞系L929细胞中加入程序性坏死诱导剂TSZ(TNF- α /SM-164/Z-VAD-FMK), 在光学显微镜下观察细胞坏死情况; 进一步向敲除RIP3和MLKL基因的L929细胞中加入TSZ, 采用碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色观察细胞坏死情况, 实时荧光定量聚合酶链反应和蛋白质印迹法检测4EBP1和eIF4E的mRNA和蛋白质表达水平。**结果:** 野生型L929细胞用TSZ处理后, 坏死细胞增加, 4EBP1的mRNA和蛋白质表达水平明显下调且磷酸化的4EBP1(phosphorylated 4EBP1, p-4EBP1)/4EBP1值增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), eIF4E的mRNA表达水平明显上调且磷酸化的eIF4E(phosphorylated eIF4E, p-eIF4E)/eIF4E值增加(均 $P < 0.01$); 在敲除L929细胞中的RIP3和MLKL基因后, PI阳性坏死细胞明显减少, 4EBP1的mRNA和蛋白质表达水平明显上调且p-4EBP1/4EBP1值下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), eIF4E的mRNA表达水平明显下调且p-eIF4E/eIF4E值下降(均 $P < 0.01$)。**结论:** 4EBP1-eIF4E通路在RIP3/MLKL介导的程序性坏死中发生活化。

[关键词] 程序性坏死; 受体相互作用蛋白3; 混合谱系激酶域样蛋白; 真核细胞翻译起始因子4E结合蛋白1; 真核起始因子4E

RIP3/MLKL regulates necroptosis via activating 4EBP1-eIF4E pathway

WANG Shuchao¹, XU Meili²

(1. Center for Medical Research, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011;
2. Department of Gerontology, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

ABSTRACT **Objective:** Necroptosis is a cell death type mediated by receptor interacting protein 3

收稿日期(Date of reception): 2023-04-17

第一作者(First author): 王树超, Email: wangshuchao@csu.edu.cn, ORCID: 0000-0002-0336-178X

通信作者(Corresponding author): 徐玫丽, Email: doctormeili@csu.edu.cn, ORCID: 0000-0002-3685-998X

基金项目(Foundation item): 长沙市自然科学基金(kq2202388)。This work was supported by the Natural Science Foundation of Changsha, China (kq2202388).

(RIP3)/mixed lineage kinase domain-like protein (MLKL). It has been reported that mammalian target of rapamycin plays a regulatory role in necroptosis. Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (4EBP1)-eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) pathway is a key downstream of mammalian target of rapamycin. However, whether 4EBP1-eIF4E pathway is involved in necroptosis is still unknown. This study aims to investigate the changes of 4EBP1-eIF4E pathway in necroptosis.

Methods: TNF- α /SM-164/Z-VAD-FMK (TSZ), a necroptosis inducer, was used to induce necroptosis in murine fibroblastoid cell line L929. Cell necrosis was observed under an optical microscope. Then, TSZ was added to L929 cells with *RIP3* and *MLKL* gene knockout. Propidium iodide (PI) staining was used to observe cell necrosis. Real-time fluorescence quantitative PCR and Western blotting were used to determine the mRNA and protein expression of *4EBP1* and *eIF4E*, respectively.

Results: After treating L929 cells with TSZ, the number of necrotic cells was increased, the mRNA and protein expression levels of *4EBP1* were significantly downregulated, and the ratio of phosphorylated 4EBP1 (p-4EBP1) to 4EBP1 was increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the mRNA expression level of *eIF4E* was significantly upregulated, and the ratio of phosphorylated eIF4E (p-eIF4E) to eIF4E was increased (both $P < 0.01$). After knocking out *RIP3* and *MLKL* in L929 cells, PI positive necrotic cells were significantly reduced, the mRNA and protein expression levels of *4EBP1* were significantly upregulated, and the ratio of p-4EBP1 to 4EBP1 was decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the mRNA expression level of *eIF4E* was significantly downregulated, and the ratio of p-eIF4E to eIF4E was decreased (both $P < 0.01$).

Conclusion: 4EBP1-eIF4E pathway is activated in the RIP3/MLKL mediated-necroptosis.

KEY WORDS

necroptosis; receptor interacting protein 3; mixed lineage kinase domain-like protein; eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1; eukaryotic initiation factor 4E

程序性坏死是一种由受体相互作用蛋白3 (receptor interacting protein 3, RIP3)和混合谱系激酶样蛋白(mixed lineage kinase domain-like protein, MLKL)介导的可控性细胞坏死方式^[1-3]。当发生程序性坏死时,配体与受体结合后向胞内传递坏死信号,RIP3被激活并与MLKL结合形成程序性坏死复合体,激活的MLKL聚合在细胞膜上“打孔”,引起细胞膜破裂,最终导致细胞程序性坏死的发生^[4-6]。已经有大量研究^[7-10]表明程序性坏死参与系统性红斑狼疮、阿尔茨海默病等多种疾病的发生和发展。因此,探讨程序性坏死发生的调控机制,对相关系统疾病的预防、诊断和治疗有重要意义。然而RIP3/MLKL程序性坏死复合体的上下游分子及通路尚未完全阐明。

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)是整合细胞内外营养和生长信号的核心调节分子,与细胞的生长、增殖、代谢等密切相关^[11]。近年有研究^[12-13]发现mTOR通路可能参与调控细胞程序性坏死。真核细胞翻译起始因子4E结

合蛋白1(eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1, 4EBP1)是mTOR的重要底物,并受到mTOR的活性调节,4EBP1通过与真核起始因子4G(eukaryotic initiation factor 4G, eIF4G)竞争结合真核起始因子4E(eukaryotic initiation factor 4E, eIF4E)来负调控eIF4E的生物学功能,进而调节蛋白质的翻译起始^[14-15]。然而4EBP1-eIF4E通路是否在程序性坏死中发生改变,目前尚无相关研究。本研究旨在探讨4EBP1-eIF4E通路在RIP3/MLKL介导的程序性坏死中是否发生活化,以期对程序性坏死的调控机制研究和相关疾病的治疗提供思路和靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞培养与分组

野生型(wild type, WT)、*RIP3*基因敲除(knockout, KO)和*MLKL*-KO小鼠上皮样成纤维细胞系L929(WT-L929、*RIP3*-KO-L929和*MLKL*-KO-L929)为厦门大

学韩家淮院士赠送。细胞用含10%胎牛血清的DMEM培养,并放置于含5%CO₂的37℃恒温箱中。实验分组如下:1)WT-L929-Control、WT-L929-TSZ 2 h、WT-L929-TSZ 3 h、WT-L929-TSZ 4 h组,将程序性坏死诱导剂TSZ(TNF- α /SM-164/Z-VAD-FMK, $\times 1\ 000$)加入WT-L929细胞中,并分别培养2、3、4 h。WT-L929-Control组不加TSZ。2)WT-L929-Control 3 h、WT-L929-TSZ 3 h、RIP3-KO-L929-TSZ 3 h、MLKL-KO-L929-TSZ 3 h组将TSZ($\times 1\ 000$)分别加入WT-L929、RIP3-KO-L929、MLKL-KO-L929细胞中并培养3 h,WT-L929-Control 3 h组不加TSZ。

1.2 试剂

DMEM和胎牛血清购自美国Gibco公司;TSZ、GAPDH抗体、RIPA蛋白质裂解液、蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂均购自上海碧云天生物技术有限公司;碘化丙啶(propidium iodide, PI)染料和防淬灭封片剂均购于美国Sigma公司;TRIzol试剂购自美国Invitrogen公司;SYBR Green PCR Master Mix试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;4EBP1、磷酸化的4EBP1(phosphorylated 4EBP1, p-4EBP1)、eIF4E和磷酸化的eIF4E(phosphorylated eIF4E, p-eIF4E)抗体均购自英国Abcam公司。

1.3 PI染色

L929细胞用PBS清洗3次后,加入PI染液染色,在4℃下避光孵育30 min,再次用PBS清洗3次后,使用含DAPI的防淬灭封片剂封片,并在荧光显微镜下采集图像。PI阳性染色细胞为坏死细胞,坏死细胞百分比为PI阳性染色细胞数目与DAPI阳性细胞核染色细胞数目的比值。

1.4 RNA提取及实时荧光定量聚合酶链反应

使用TRIzol提取L929细胞的总RNA, NanoDrop测量RNA的纯度和含量。使用SYBR Green PCR Master Mix试剂盒配置PCR反应体系。在Bio-rad实时荧光定量PCR仪上行扩增反应,反应条件:95℃预变性5 min后95℃变性30 s, 55℃退火20 s, 72℃延伸30 s,共40个循环。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成(表1)。收集扩增的荧光信号并进行融解曲线分析,记录4EBP1、eIF4E和GAPDH的Ct值,以GAPDH为内参进行荧光定量分析。

1.5 蛋白质提取及蛋白质印迹法

L929细胞用PBS清洗3次后,加入100 μ L RIPA蛋白质裂解液、蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂混合液,收集细胞裂解液并冰浴20 min,随后于4℃以

130 000 r/min离心20 min,吸取上清即为细胞总蛋白质,最后使用NanoDrop进行蛋白质浓度测量。

将20 μ g蛋白质样品加样至4%~10%的SDS-聚丙烯酰胺凝胶中,在80~100 V电压下电泳90 min,随后在80 V恒压条件下进行湿转,将蛋白质转移到PVDF膜上,加入4EBP1、p-4EBP1、eIF4E、p-eIF4E和GAPDH一抗,置于4℃下孵育过夜,次日使用TBST清洗3次,加入二抗(1:5 000)置于室温下孵育2 h,用TBST洗膜后,加入ECL发光液孵育2 min并显影。

表1 PCR引物序列表

Table 1 Sequence of PCR primers

基因名	引物序列
4EBP1	F: 5'-GAAGTTGCTCTACCCAGTGTCC-3' R: 5'-GATAGCCGTTCCCTTTCATTTGG-3'
eIF4E	F: 5'-GATAGCCGTTCCCTTTCATTTGG-3' R: 5'-TTCCACATAGGCTCAATA-3'
GAPDH	F: 5'-TGGCACATATACACCATGGAA-3' R: 5'-TGAGAATGATGGTTTCCAATTTC-3'

4EBP1:真核细胞翻译起始因子4E结合蛋白1; eIF4E:真核起始因子4E。

1.6 统计学处理

数据以均数 \pm 标准误($\bar{x}\pm$ SEM)表示,采用统计软件Graph Prism 6进行统计学分析,组间比较采用 t 检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 TSZ诱导WT-L929细胞坏死

光学显微镜下可见:WT-L929-Control组细胞基本无死亡;随着处理时间(2、3、4 h)的延长,TSZ处理组发生程序性坏死的WT-L929细胞逐渐增多(图1)。

2.2 RIP3和MLKL对L929细胞程序性坏死的影响

WT-L929细胞在TSZ处理后3 h即发生大量死亡(图1),因此在后续实验中均采用3 h作为主要干预时间点。PI染色结果显示:与WT-L929-Control 3 h组相比,WT-L929-TSZ 3 h组发生程序性坏死细胞明显增加($P<0.01$,图2);与WT-L929-TSZ 3 h组相比,RIP3-KO-L929-TSZ 3 h组、MLKL-KO-L929-TSZ 3 h组程序性坏死细胞明显减少(均 $P<0.01$,图2)。这提示RIP3和MLKL促进L929细胞程序性坏死。

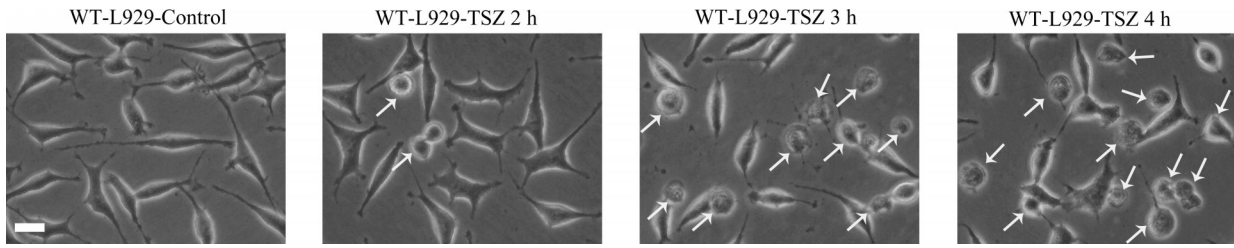


图1 光学显微镜下显示TSZ诱导WT-L929细胞坏死

Figure 1 TSZ induces WT-L929 cell necroptosis observed under the optical microscope

Scale bar: 20 μm . Necroptotic L929 cells were labeled by arrows. With the increase of TSZ treatment time (2, 3, and 4 h), the number of necroptotic L929 cells was increased. TSZ: TNF- α /SM-164/Z-VAD-FMK; WT: Wild type.

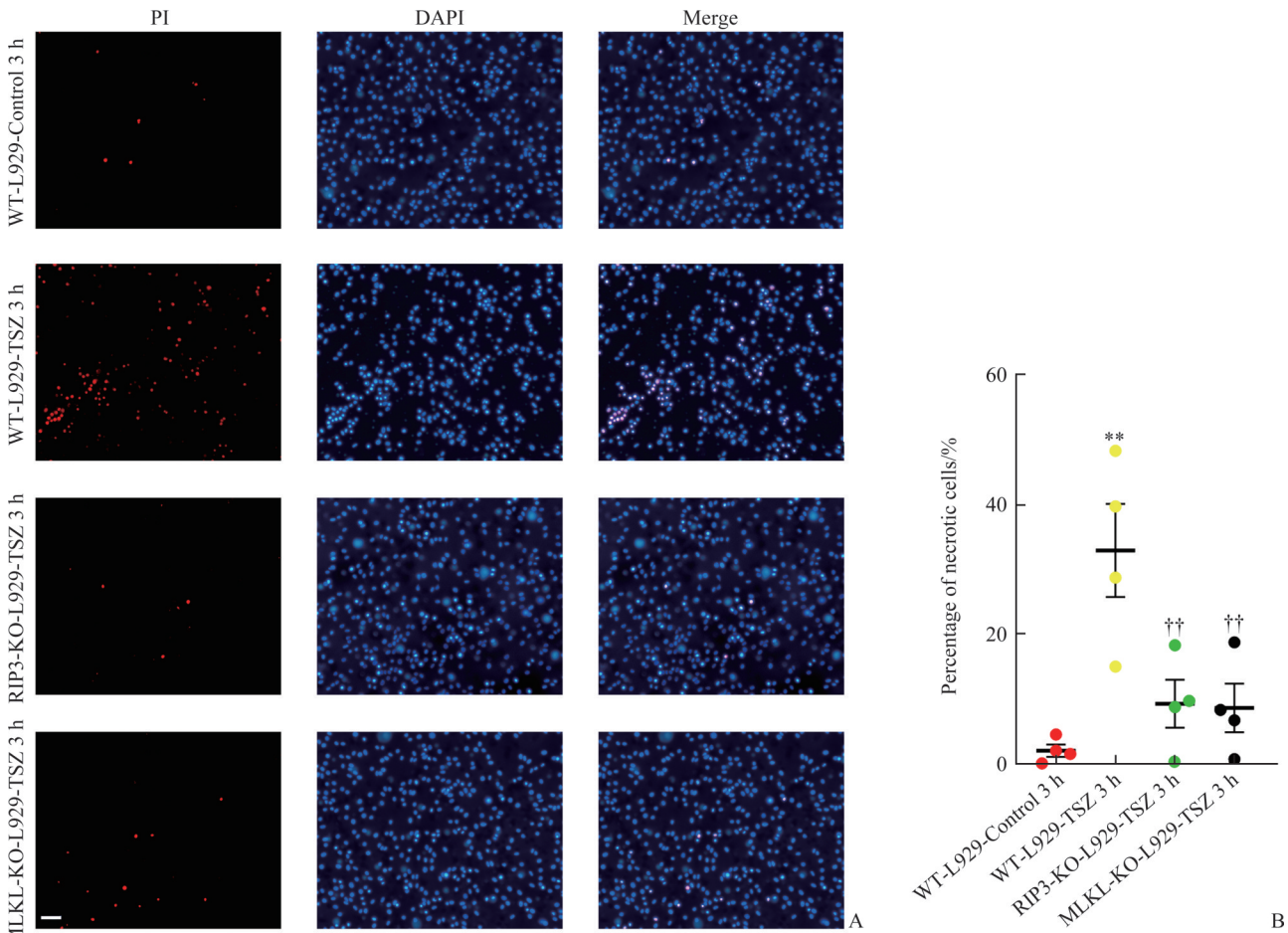


图2 PI染色显示TSZ诱导WT-、RIP3 KO-和MLKL KO-L929细胞程序性坏死

Figure 2 TSZ induces WT-, RIP3 KO-, and MLKL KO-L929 cell necroptosis indicated by PI staining

A: PI staining diagram; B: Comparison of percentage of necrotic cells in each group ($n=4$, $\bar{x}\pm\text{SEM}$). Scale bar: 100 μm . ** $P<0.01$ vs the WT-L929-Control 3 h group; †† $P<0.01$ vs the WT-L929-TSZ 3 h group. TSZ: TNF- α /SM-164/Z-VAD-FMK; WT: Wild type; PI: Propidium iodide; RIP3: Receptor interacting protein 3; MLKL: Mixed lineage kinase domain-like protein.

2.3 4EBP1和eIF4E的mRNA表达水平

实时荧光定量聚合酶链反应结果显示：与WT-L929-Control 3 h组相比，WT-L929-TSZ 3 h组细胞中4EBP1的mRNA表达水平明显下调，eIF4E的mRNA表达水平明显上调($P<0.05$ 或 $P<0.01$ ，图3)；与WT-

L929-TSZ 3 h组相比，RIP3-KO-L929-TSZ 3 h组、MLKL-KO-L929-TSZ 3 h组细胞中4EBP1的mRNA表达水平明显上调，eIF4E的mRNA表达水平明显下调(均 $P<0.01$ ，图3)。4EBP1和eIF4E的mRNA表达水平在RIP3/MLKL介导的程序性坏死中发生了改变。

2.4 4EBP1和eIF4E的蛋白质表达水平

蛋白质印迹法结果显示：与WT-L929-Control 3 h组相比，WT-L929-TSZ 3 h组细胞中4EBP1和p-4EBP1蛋白质表达水平均明显下调，且p-4EBP1/4EBP1的比值升高($P<0.05$ ，图4)，而eIF4E蛋白质表达水平无明显变化，p-eIF4E蛋白质表达水平明显上调，p-eIF4E/eIF4E的比值升高($P<0.01$ ，图4)；与WT-L929-TSZ 3 h组相比，RIP3-KO-L929-TSZ 3 h

组、MLKL-KO-L929-TSZ 3 h组细胞中4EBP1和p-4EBP1蛋白质水平均明显上调，且p-4EBP1/4EBP1的值下降($P<0.05$ ，图4)，而eIF4E蛋白质表达水平无明显变化，p-eIF4E蛋白质表达水平明显下调，p-eIF4E/eIF4E的比值下降($P<0.01$ ，图4)。4EBP1和eIF4E的蛋白质表达和活性水平在RIP3/MLKL介导的程序性坏死中发生了改变。

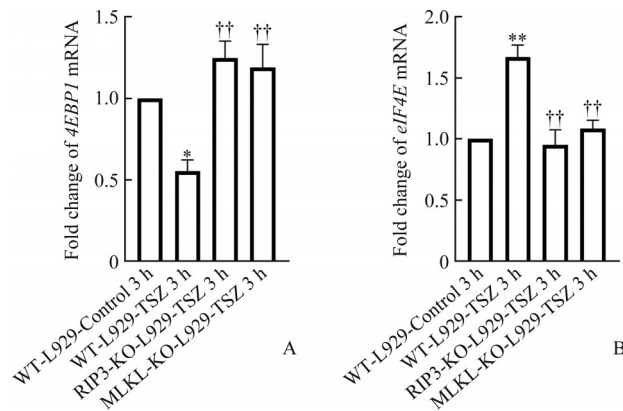


图3 实时荧光定量聚合酶链反应显示TSZ处理的WT-、RIP3 KO-、MLKL KO-L929细胞4EBP1(A)和eIF4E(B) mRNA水平($n=4$, $\bar{x}\pm\text{SEM}$)

Figure 3 mRNA levels of 4EBP1 (A) and eIF4E (B) in WT-, RIP3 KO-, and MLKL KO-L929 cells detected by real time fluorescent quantitative PCR ($n=4$, $\bar{x}\pm\text{SEM}$)

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs the WT-L929-Control 3 h group; †† $P<0.01$ vs the WT-L929-TSZ 3 h group. TSZ: TNF- α /SM-164/Z-VAD-FMK; WT: Wild type; RIP3: Receptor interacting protein 3; MLKL: Mixed lineage kinase domain-like protein; 4EBP1: Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1; eIF4E: Eukaryotic initiation factor 4E.

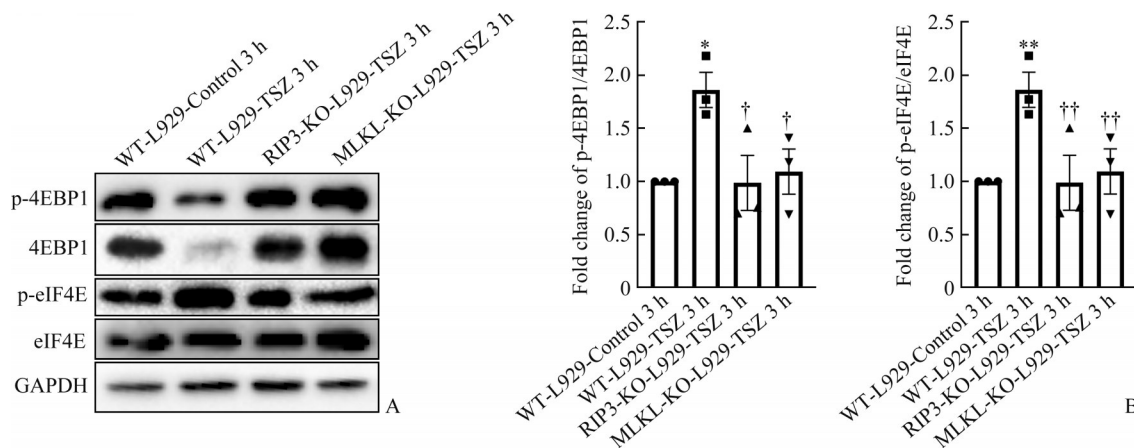


图4 蛋白质印迹法显示TSZ处理的WT-、RIP3 KO-、MLKL KO-L929细胞4EBP1和eIF4E蛋白质表达水平

Figure 4 Protein expression levels of 4EBP1 and eIF4E in WT-, RIP3 KO-, and MLKL KO-L929 cells detected by Western blotting

A: Electropherogram of Western blotting; B: Comparison of the ratio of 4EBP1 to p-4EBP1 and the ratio of p-eIF4E to eIF4E ($n=3$, $\bar{x}\pm\text{SEM}$). * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs the WT-L929-Control 3 h group; † $P<0.05$, †† $P<0.01$ vs the WT-L929-TSZ 3 h group. TSZ: TNF- α /SM-164/Z-VAD-FMK; WT: Wild type; RIP3: Receptor interacting protein 3; MLKL: Mixed lineage kinase domain-like protein; 4EBP1: Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1; p-4EBP1: Phosphorylated 4EBP1; eIF4E: Eukaryotic initiation factor 4E; p-eIF4E: Phosphorylated eIF4E.

3 讨论

RIP3 和 MLKL 组成程序性坏死复合体, 在细胞程序性坏死中起核心调控作用, 通过探讨其关键上下游通路和分子调控机制, 可为相关疾病的防治提供靶点和指导思路。本研究首先通过程序性坏死诱导剂 TSZ 处理 L929 细胞诱导程序性坏死, 进一步通过分别敲除细胞中的 *RIP3* 和 *MLKL* 基因抑制程序性坏死的发生, 从而验证 RIP3 和 MLKL 在程序性坏死中的调控作用。

传统的观点认为 mTOR 通过整合营养和能量等细胞内、外信号, 参与蛋白质翻译和核糖体合成等多种生化过程, 并在细胞代谢、生长和凋亡等生命活动中发挥重要作用^[16-17]。近年来有研究^[18]发现 mTOR 通路还参与调控程序性坏死, 高脂、高蛋白饮食可促进肠上皮细胞发生坏死, 并加剧小鼠肠炎的恶化, 而特异性敲除小鼠 mTOR 的上游抑制分子结节性硬化复合体 1 (tuberous sclerosis complex 1, TSC1) 会进一步促进肠上皮细胞坏死的发生; 此外, 在肠炎患者中, mTOR 的活化和肠上皮细胞坏死呈正相关, 而在敲除 *TSC1* 基因的小鼠中进一步敲除 *RIP3/MLKL* 后, 肠上皮细胞的坏死和小鼠肠炎症状均得以明显改善, 表明 mTOR 在 RIP3/MLKL 介导的细胞程序性坏死中起关键作用^[19]。

实际上, mTOR 主要通过磷酸化其下游 2 个关键效应分子 p70 核糖体 S6 激酶 (p70 ribosomal protein S6 kinase, p70S6K) 和 4EBP1 调控蛋白质合成的生命活动进程, 二者通过下游效应分子调控蛋白质的翻译过程^[20-21]。在葡萄糖饥饿、紫外线辐射等损伤信号刺激下, 4EBP1 通过降低其磷酸化程度并加强与 eIF4E 的结合抑制蛋白质的翻译起始, 同时 4EBP1 可降低 eIF4E 的磷酸化以抑制 eIF4E 的活性, 进一步抑制蛋白质的翻译起始^[22-23]。值得一提的是, 有研究^[24-25]发现: 在肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 或缺血再灌注诱导的程序性坏死过程中, p70S6K 的同源分子 p90 核糖体 S6 激酶 (p90 ribosomal S6 protein kinase, RSK) 发生活化并可促进程序性坏死的发生, 然而 RSK 的同源分子 p70S6K 及其参与的 mTOR 下游分子通路 (4EBP1-eIF4E 通路) 是否在程序性坏死中发生改变, 目前尚无相关研究。本研究结果显示: WT-L929 细胞发生程序性坏死后, 4EBP1 的蛋白质水平明显下调且 p-4EBP1/4EBP1 的比值升高, 提示其对 eIF4E 的抑制作用减弱。本研究同时检测了 eIF4E 的蛋白质水平和活性, 结果显示 eIF4E 的蛋白质水平和活性均明显上调。在敲除 *RIP3* 和 *MLKL* 基因的 L929 细胞中, 4EBP1 的蛋白质水平明显上调, p-4EBP1/

4EBP1 的比值下降, 这提示其对 eIF4E 的抑制作用增强。进一步的研究结果也证明了 eIF4E 的蛋白质活性明显受到抑制。

小鼠成纤维细胞 L929 被广泛用于溃疡性结肠炎、皮肤创伤和乳腺癌等疾病损伤机制和治疗的研究, L929 细胞程序性坏死是成熟的程序性坏死机制研究模型。本研究结果提示 RIP3/MLKL 可能通过激活 4EBP1-eIF4E 通路诱导成纤维细胞发生程序性坏死, 这将为治疗程序性坏死参与的溃疡性结肠炎、皮肤创伤和乳腺癌等相关疾病提供新的靶点和思路。

作者贡献声明: 王树超 实验操作, 数据统计和分析, 论文撰写; 徐玫丽 研究构想, 论文指导和审阅。所有作者阅读并同意最终的文本。

利益冲突声明: 作者声称无任何利益冲突。

参考文献

- [1] Liu SM, Liao LS, Huang JF, et al. Role of CAST-Drp1 pathway in retinal neuron-regulated necrosis in experimental glaucoma[J]. *Curr Med Sci*, 2023, 43(1): 166-172. <https://doi.org/10.1007/s11596-022-2639-8>.
- [2] Wang S, Liao L, Huang Y, et al. Pin1 is regulated by CaMKII activation in glutamate-induced retinal neuronal regulated necrosis[J]. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13: 276. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00276>.
- [3] Degtrev A, Huang Z, Boyce M, et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury[J]. *Nat Chem Biol*, 2005, 1(2): 112-119. <https://doi.org/10.1038/nchembio711>.
- [4] Wang SC, Hu XM, Xiong K. The regulatory role of Pin1 in neuronal death[J]. *Neural Regen Res*, 2023, 18(1): 74-80. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.341043>.
- [5] Cheng SY, Wang SC, Lei M, et al. Regulatory role of calpain in neuronal death[J]. *Neural Regen Res*, 2018, 13(3): 556-562. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.228762>.
- [6] Chen X, Zhu R, Zhong J, et al. Mosaic composition of RIP1-RIP3 signalling hub and its role in regulating cell death[J]. *Nat Cell Biol*, 2022, 24 (4): 471-482. <https://doi.org/10.1038/s41556-022-00854-7>.
- [7] Wang S, Huang Y, Yan Y, et al. Calpain2 but not calpain1 mediated by calpastatin following glutamate-induced regulated necrosis in rat retinal neurons[J]. *Ann Anat*, 2019, 221: 57-67. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2018.08.005>.
- [8] Wang S, Liao L, Wang M, et al. Pin1 promotes regulated necrosis induced by glutamate in rat retinal neurons via CAST/Calpain2 pathway[J]. *Front Cell Neurosci*, 2018, 11: 425. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00425>.
- [9] Yan WT, Yang YD, Hu XM, et al. Do pyroptosis, apoptosis, and necroptosis (PANoptosis) exist in cerebral ischemia?

- Evidence from cell and rodent studies[J]. *Neural Regen Res*, 2022, 17(8): 1761-1768. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.331539>.
- [10] Yan WT, Zhao WJ, Hu XM, et al. PANoptosis-like cell death in ischemia/reperfusion injury of retinal neurons[J]. *Neural Regen Res*, 2023, 18(2): 357-363. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.346545>.
- [11] Schmitt M, Ceteci F, Gupta J, et al. Colon tumour cell death causes mTOR dependence by paracrine P2X4 stimulation[J]. *Nature*, 2022, 612(7939): 347-353. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05426-1>.
- [12] Lin CP, Traets JH, Vredevoogd DW, et al. TSC2 regulates tumor susceptibility to TRAIL-mediated T-cell killing by orchestrating mTOR signaling[J/OL]. *EMBO J*, 2023, 42(5): e111614[2023-06-28]. <https://doi.org/10.15252/embj.2022111614>.
- [13] Araujo A, Safronova A, Burger E, et al. IFN- γ mediates Paneth cell death via suppression of mTOR[J/OL]. *Elife*, 2021, 10: e60478[2023-06-28]. <https://doi.org/10.7554/eLife.60478>.
- [14] Spevak CC, Elias HK, Kannan L, et al. Hematopoietic stem and progenitor cells exhibit stage-specific translational programs via mTOR- and CDK1-dependent mechanisms[J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 26 (5): 755-765. e7. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.12.006>.
- [15] Aguilar-Valles A, De Gregorio D, Matta-Camacho E, et al. Antidepressant actions of ketamine engage cell-specific translation via eIF4E[J]. *Nature*, 2021, 590(7845): 315-319. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-03047-0>.
- [16] Aronica E, Specchio N, Luinburg MJ, et al. Epileptogenesis in tuberous sclerosis complex-related developmental and epileptic encephalopathy[J]. *Brain*, 2023, 146(7): 2694-2710. <https://doi.org/10.1093/brain/awad048>.
- [17] Frias MA, Hatipoglu A, Foster DA. Regulation of mTOR by phosphatidic acid[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2023, 34(3): 170-180. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2023.01.004>.
- [18] Wu W, Wang X, Sun Y, et al. TNF-induced necroptosis initiates early autophagy events via RIPK3-dependent AMPK activation, but inhibits late autophagy[J]. *Autophagy*, 2021, 17(12): 3992-4009. <https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1899667>.
- [19] Xie Y, Zhao Y, Shi L, et al. Gut epithelial TSC1/mTOR controls RIPK3-dependent necroptosis in intestinal inflammation and cancer[J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(4): 2111-2128. <https://doi.org/10.1172/JCI133264>.
- [20] Serra V, Eichhorn PJ, Garcia-Garcia C, et al. RSK3/4 mediate resistance to PI3K pathway inhibitors in breast cancer[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(6): 2551-2563. <https://doi.org/10.1172/JCI66343>.
- [21] Faller WJ, Jackson TJ, Knight JR, et al. mTORC1-mediated translational elongation limits intestinal tumour initiation and growth[J]. *Nature*, 2015, 517(7535): 497-500. <https://doi.org/10.1038/nature13896>.
- [22] Vagner S, Touriol C, Galy B, et al. Translation of CUG- but not AUG-initiated forms of human fibroblast growth factor 2 is activated in transformed and stressed cells[J]. *J Cell Biol*, 1996, 135(5): 1391-402. <https://doi.org/10.1083/jcb.135.5.1391>.
- [23] Fan SJ, Snell C, Turley H, et al. PAT4 levels control amino-acid sensitivity of rapamycin-resistant mTORC1 from the Golgi and affect clinical outcome in colorectal cancer[J]. *Oncogene*, 2016, 35(23): 3004-3015. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.363>.
- [24] Yang ZH, Wu XN, He P, et al. A non-canonical PDK1-RSK signal diminishes pro-caspase-8-mediated necroptosis blockade [J]. *Mol Cell*, 2020, 80(2): 296-310. e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.09.004>.
- [25] Wang M, Wan H, Wang S, et al. RSK3 mediates necroptosis by regulating phosphorylation of RIP3 in rat retinal ganglion cells [J]. *J Anat*, 2020, 237(1): 29-47. <https://doi.org/10.1111/joa.13185>.

(本文编辑 郭征)

本文引用: 王树超, 徐玫丽. RIP3/MLKL通过激活4EBP1-eIF4E通路诱导程序性坏死[J]. 中南大学学报(医学版), 2023, 48(7): 979-985. DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2023.230153

Cite this article as: WANG Shuchao, XU Meili. RIP3/MLKL regulates necroptosis via activating 4EBP1-eIF4E pathway[J]. *Journal of Central South University. Medical Science*, 2023, 48(7): 979-985. DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2023.230153