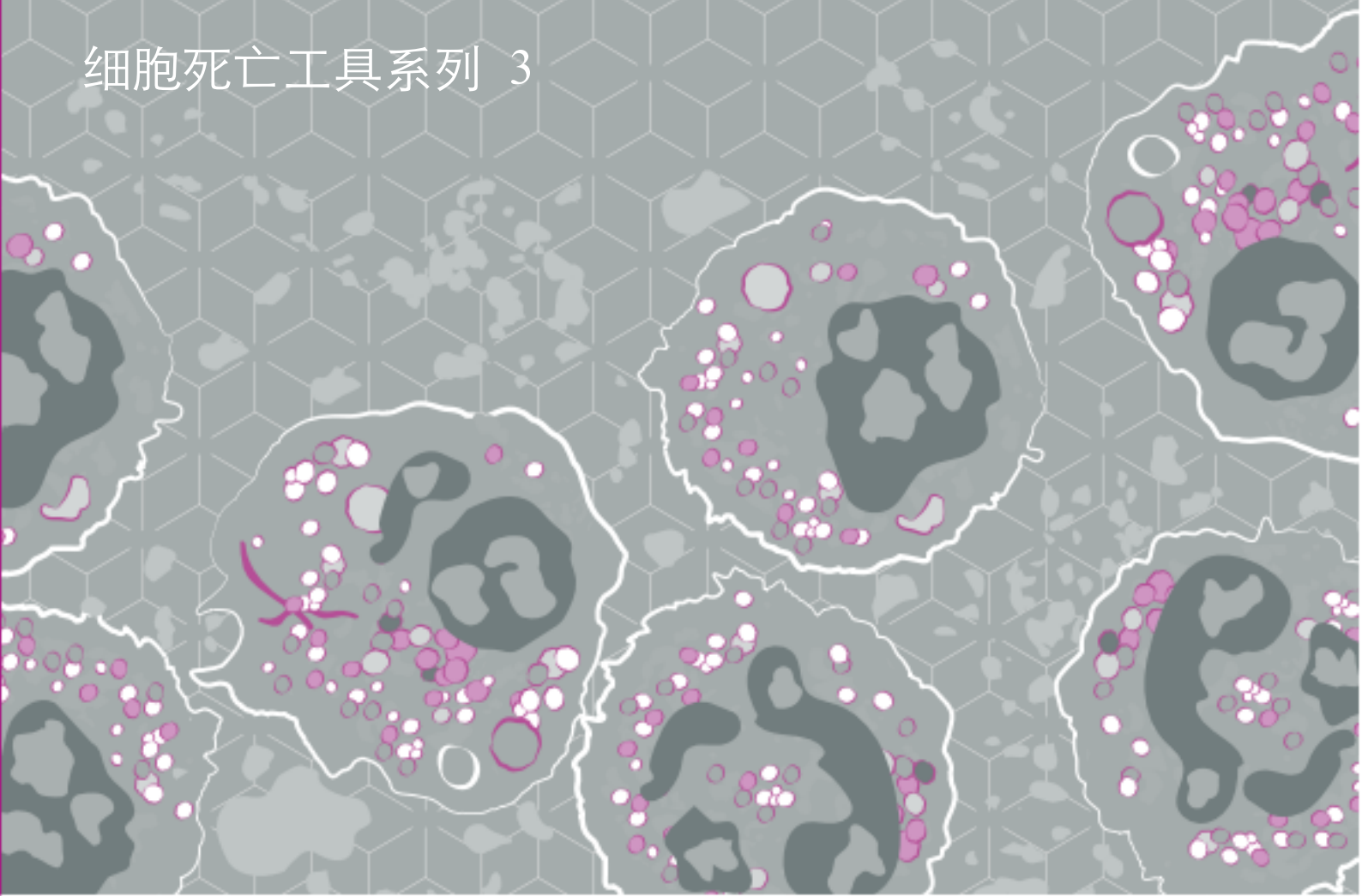


细胞死亡新热点

- 程序性坏死
- 焦亡
- 铁坏死

细胞死亡工具系列 3



目录

细胞死亡.....	4
细胞程序性坏死.....	5
- 死亡受体依赖型通路.....	5
- 非死亡受体依赖型通路.....	6
细胞焦亡.....	8
- 分子通路.....	8
细胞铁坏死.....	10
- 分子机制.....	10
其他形式的细胞死亡.....	12
- Parthanatos.....	12
- NETosis.....	12
- 失巢凋亡.....	12
- 细胞侵入性死亡.....	12
研究细胞死亡.....	13
- 细胞活性.....	13
- 排除细胞凋亡.....	14
- 检测细胞程序性坏死.....	16
- 检测细胞焦亡.....	18
- 检测细胞铁坏死.....	19
常规注意事项.....	21
参考文献.....	22

细胞死亡

当细胞无法维持基本的生命功能时，就会发生细胞死亡。在细胞受损或损伤情况下，细胞死亡可能是非程序性死亡，也可能是细胞凋亡等程序性死亡。

细胞死亡可以根据形态学外观（例如凋亡或坏死）、酶学标准（是否涉及不同的蛋白酶）、功能（程序性或非程序性）或免疫学特征（免疫原性或非免疫原性）进行分类¹。

研究细胞死亡机制之前，研究人员应确保细胞死亡已发生。细胞死亡命名委员会（NCCD）提出，研究人员应在观察到以下特征时将细胞定义为死亡¹：

1. 细胞已丧失细胞膜完整性
2. 细胞已完全裂解
3. 细胞的任何残余物都被体内邻近的细胞吞噬

传统上，细胞死亡分为程序性凋亡和非调控性坏死。而最近越来越多的研究进一步定义了一种非凋亡的细胞死亡，这种细胞死亡是由特殊的信号通路控制的。

在本指南中，我们将探索非凋亡形式的程序性细胞死亡通路，包括细胞程序性坏死、细胞焦亡和细胞铁坏死，并概述研究它们的不同方法。

细胞程序性坏死

细胞程序性坏死是一种程序性细胞死亡，依赖于受体相互作用蛋白激酶 3 (RIPK3)² 和 MLKL 伪激酶³ 的活化。这种形式的细胞死亡在形态上不同于凋亡，它涉及到胞膜破裂和细胞质内容物释放。

细胞程序性坏死一般通过死亡受体的活化触发，但也可通过非死亡受体依赖型通路激活。在大多数情况下，促凋亡 Caspase 8⁴⁻⁶ 可抑制细胞程序性坏死。某些细胞内病原体通过抑制 Caspase 8 来抑制细胞凋亡，而细胞程序性坏死则起到了清除受感染细胞的作用⁷。

细胞程序性坏死与多发性硬化⁸、肌萎缩性侧索硬化 (ALS)、局部缺血-再灌注损伤和克罗恩病等炎症疾病相关，但目前尚不清楚细胞程序性坏死是这些疾病的驱动因素还是继发性后果⁹。

死亡受体依赖型通路

细胞程序性坏死信号传导：促存活通路与凋亡通路的相交

细胞程序性坏死由配体与死亡受体的结合引发，死亡受体包括肿瘤坏死因子受体 1 (TNFR1)、肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体 (TRAIL) 受体和 Fas^{10,11}，目前人们对 TNFR1 介导的细胞程序性坏死研究的最多。这些死亡受体还参与了促存活信号传导和凋亡：细胞的死亡通路取决于配体结合会形成哪种复合物 (图 1)。

配体结合后，TNFR1 通过胞质死亡结构域募集促存活复合物 I，该复合物由 TNF 受体相关死亡结构域 (TRADD)、RIPK1 和几种泛素 E3 连接酶组成。在复合物 I 中，RIPK1 被多泛素化；但是，随后 RIPK1 发生去泛素化，导致 RIPK1 解离并形成复合物 IIa 或复合物 IIb：复合物 IIa 介导 Caspase 8 的活化并启动细胞凋亡，而复合物 IIb (又称坏死体) 在 Caspase 8 被抑制时聚集并触发细胞程序性坏死²。

坏死体和下游信号传导

在复合物 IIb 中，RIPK1 通过 RHIM 结构域募集 RIPK3，导致两者相互磷酸化。RIPK3 的磷酸化继而促使其寡聚化，这也是其活化的必要步骤。活化的 RIPK3 将磷酸化 MLKL 上的第 357 位苏氨酸和第 358 位丝氨酸³。

磷酸化的 MLKL 多聚化并定位在细胞膜上，这对坏死性细胞死亡至关重要。但是目前尚不清楚 MLKL 如何触发细胞死亡¹³；有报告称，它会与磷脂酰肌醇脂类和心磷脂结合，然后直接渗透细胞膜^{14,15}。

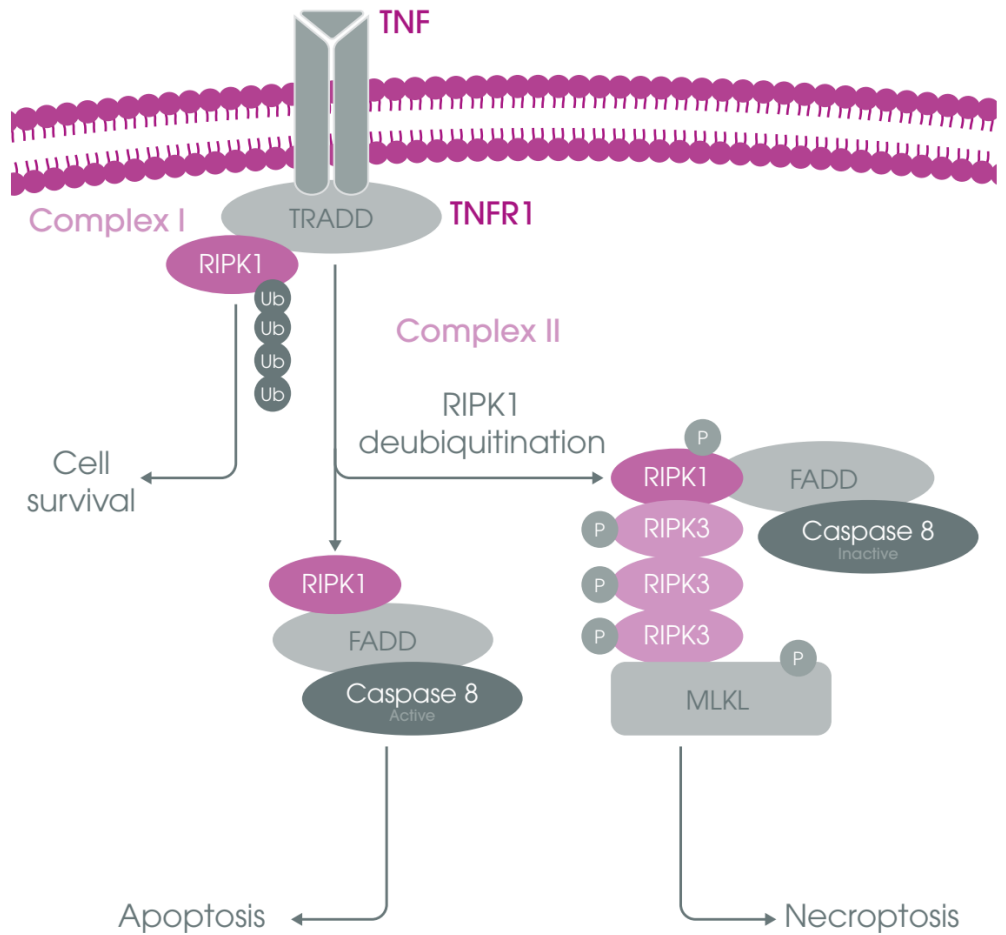


图 1. TNFR1 触发的细胞程序性坏死。

非死亡受体依赖型通路

非死亡受体依赖型通路也可诱发细胞程序性坏死，例如通过 Toll 样受体 TLR3 和 TLR4 的参与¹⁶、病毒感染、1 型和 2 型干扰素以及含 RHIM 蛋白的病毒表达（图 2）等诱发。

Toll 样受体

这些蛋白是先天免疫系统的一部分，可感知细胞应激、损伤和感染。活化后，含 TIR 域的衔接子诱导干扰素-β (TRIF) 衔接蛋白与 RIPK3 形成复合物¹⁶。TLR 活化依赖型细胞程序性坏死依赖于 RIPK3 和 MLKL，但不依赖 RIPK1。

病毒 DNA

DAI (IFN 调控因子的 DNA 依赖型活化剂) 的活化也可以促进 RIPK3 依赖型细胞程序性坏死。DAI 可识别双链病毒 DNA，并且包含 RHIM 域，可募集 RIPK3，并形成坏死体。

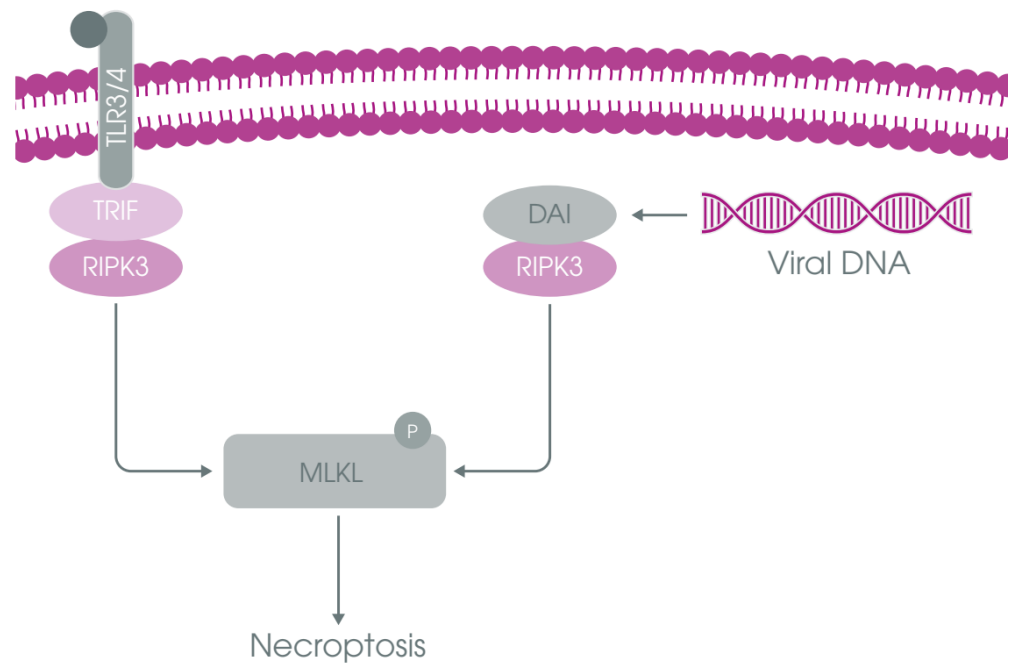


图 2. 细胞程序性坏死的非死亡受体依赖型通路

细胞焦亡

细胞焦亡是一种因微生物感染引起的炎性 Caspase 依赖型程序性细胞坏死。从形态上看，焦亡细胞会出现肿胀和细胞膜快速溶解等特征。这种形式的细胞死亡由炎性 Caspase（Caspase 1、4、5 和 11）引起。

分子通路

典型和非典型炎性小体的活化可引发细胞焦亡（图 3）。

非典型炎性小体通路

在非典型炎性小体通路中，来自革兰氏阴性细菌的脂多糖直接通过 Caspase 的活化和募集域（CARD）与小鼠体内的 Caspase 11 或人体内的 Caspase 4 和 5 结合，从而诱导 Caspase 的寡聚化和活化。

典型炎性小体通路

传感蛋白（包括 Nod 样受体（NLR））可检测病原体和炎性因子。虽然 NLRC4 和 NLRP1 炎性小体也会引发细胞焦亡，但对 NLRP3 活化引发的细胞焦亡研究最广泛。

活化的 NLRP3 募集含 CARD（ASC）衔接蛋白的凋亡相关斑点样蛋白，而后促使 Caspase 1 发生二聚化并活化。

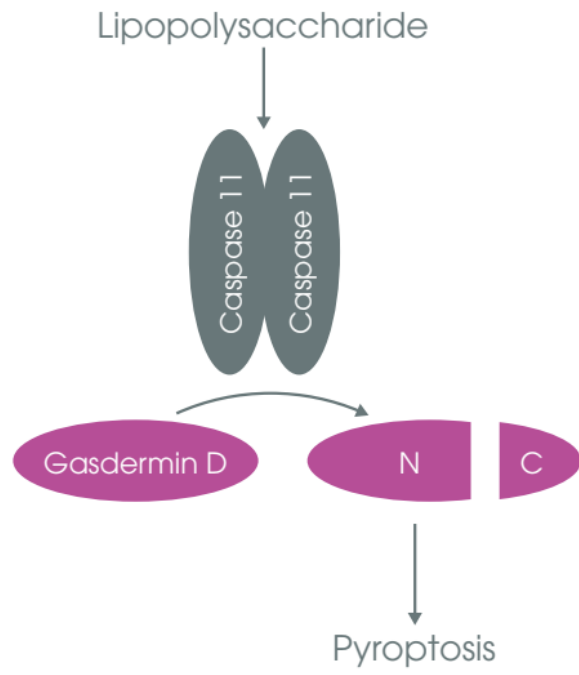
Gasdermin 切割

Caspase 1、11、4 或 5 被典型或非典型炎性小体通路活化后，通过切割 Asp276 和 Gly277 之间的 gasdermin D 来触发细胞焦亡¹⁷⁻¹⁹。由此产生的 N 末端片段能够诱导细胞焦亡，而 C 末端片段则能自动抑制 Gasdermin D。

下游事件

最终，细胞焦亡导致膜孔形成、细胞肿胀，然后破裂。虽然有证据表明 Gasdermin D 的 N 末端片段会在膜中寡聚形成膜孔，但目前尚不清楚 Gasdermin D 导致的下游事件¹⁹。

Non-canonical



Canonical

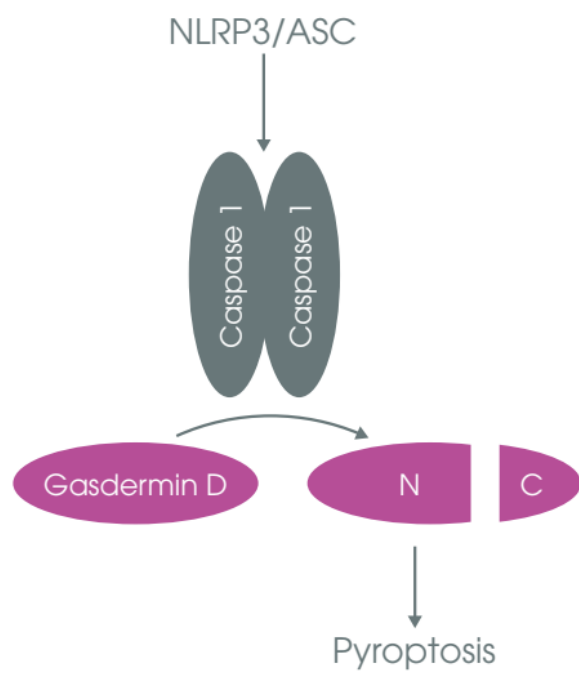


图 3. 典型和非典型炎症小体通路引发的细胞焦亡。

细胞铁坏死

细胞铁坏死是另一种程序性非凋亡性细胞死亡²⁰，首次于 2012 年提出。“细胞铁坏死”的命名源于这种细胞死亡形式对细胞内铁的依赖性。

从形态上看，经历细胞铁坏死的细胞没有表现出与凋亡或坏死性细胞死亡相关的任何特征，例如染色质固缩、细胞质肿胀和膜破裂。坏死性细胞的形态特征变化很微妙，包括线粒体小于正常大小、膜密度增加²⁰。

分子机制

铁依赖型脂质活性氧(ROS)的生成导致细胞铁坏死。在不存在铁诱导的条件下，谷胱甘肽(GSH，谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 活化的重要底物)可以抑制脂质过氧化物的积累。GPX4 是唯一能够还原生物膜内脂质氢过氧化物的酶²¹。

GPX4 的活性降低时，它的抗氧化能力就会受到限制，从而导致脂质 ROS 积累，继而发生细胞铁坏死²²。GPX4 的活性降低后，可以通过两种不同的机制触发细胞铁坏死(图 4)：

1. 抑制谷氨酸/胱氨酸逆转运蛋白 x_c^-

抑制谷氨酸/胱氨酸转运蛋白可减少半胱氨酸(半胱氨酸和谷胱甘肽合成的前体)的摄取，导致谷胱甘肽水平降低，并且 GPX4 的活性受到抑制。在实验中，小分子 erasatin 可抑制 x_c^- ²⁰。

2. 直接抑制 GPX4 活性

直接抑制 GPX4 的活性也会触发细胞铁坏死。小分子 RSL3 可以抑制 GPX4²³。

尚未解决的问题

触发细胞程序性坏死的机制已经通过小分子文库筛选确定。但触发 *in vivo* 细胞铁坏死的原因尚未确定，仍然有待研究。另一个未知方面是，脂质过氧化如何最终导致细胞死亡。

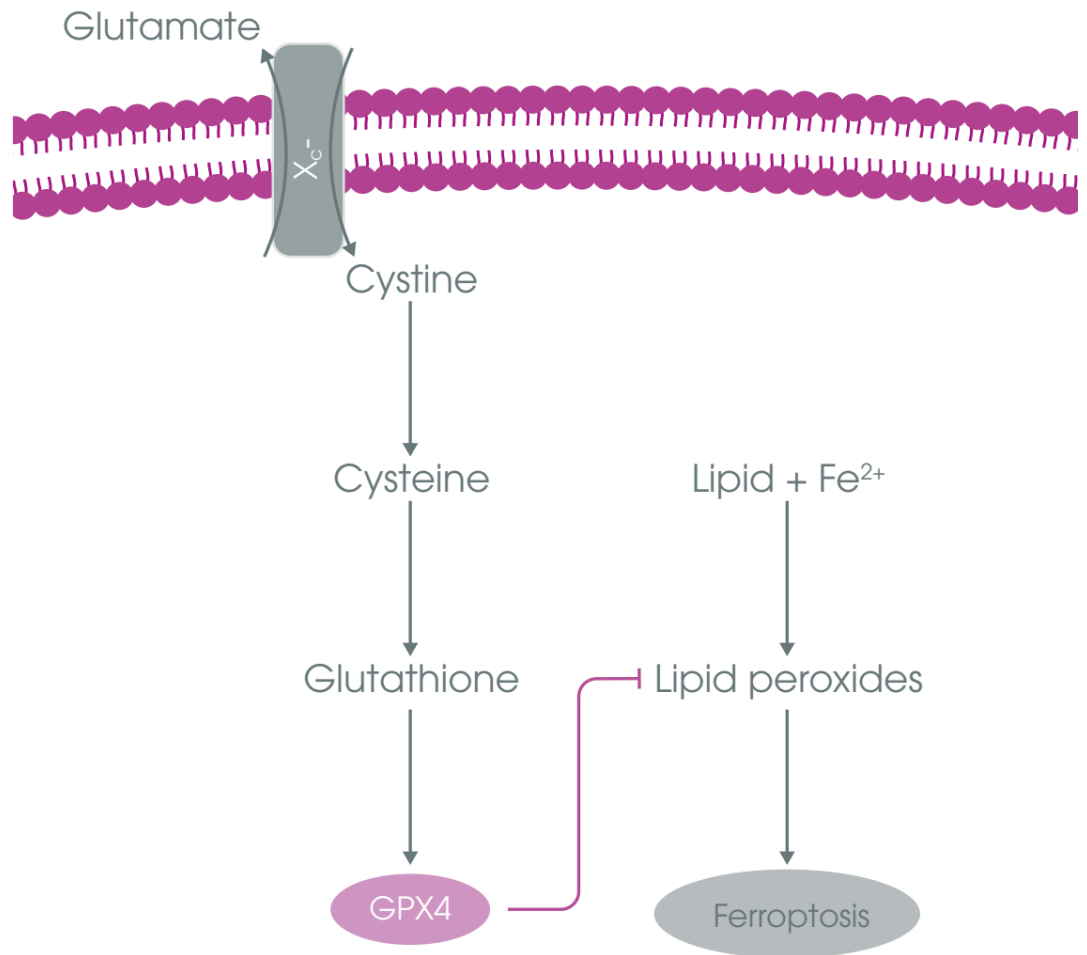


图 4. 细胞铁坏死活化通路。

其他形式的细胞死亡

Parthanatos

Parthanatos 是一种非凋亡形式的细胞死亡，与帕金森氏病、糖尿病和中风等多种疾病有关。Parthanatos 的启动与核蛋白 PARP1（聚[ADP-核糖]聚合酶 1）的过度活化有关²⁴，后者在生理条件下参与各种细胞过程，包括 DNA 修复和转录²⁵。Parthanatos 最终会导致细胞膜丧失完整性。

DNA 损伤和 ROS 刺激 PARP1 的过度活化。过度活化时，PARP1 利用 NAD⁺ 生成 PAR 聚合物，从而导致凋亡诱导因子（AIF）从线粒体转移到细胞核²⁴。目前，人们对 parthanatos 通路的了解尚不全面；parthanatos 可能通过耗减细胞 NAD⁺ 或释放 AIF 导致细胞死亡，但目前尚未确定相关效应机制。

NETosis

NETosis 是嗜中性粒细胞中病原体诱导的细胞死亡机制，其特征在于嗜中性粒细胞胞外陷阱（NET）被释放。NET 是一种染色质结构，包含能够捕获外源性细菌和其他病原体的蛋白质。

PMA 活化蛋白激酶 C 和 raf-丝裂原活化的蛋白激酶（MEK）-细胞外信号调节的激酶（ERK）通路后，将发生 NETosis。

失巢凋亡

失巢凋亡是一种与凋亡相关的程序性细胞死亡形式，由细胞从细胞外基质脱离引起。在细胞附着于细胞外基质的情况下，整联蛋白（细胞-ECM 相互作用的介质）可启动促存活信号传导，防止失巢凋亡。

细胞脱离后，促凋亡蛋白 Bid 和 Bim 累积并通过内源性凝血通路促进凋亡²⁶。或者，ECM 脱离将线粒体 Bcl-2 蛋白释放到细胞质中，通过 Caspase 依赖型机制触发细胞凋亡²⁷。

丧失失巢凋亡能力是癌症发展的关键步骤。目前，人们正在开展相关研究，以期了解癌细胞如何逃脱失巢凋亡。

有关细胞凋亡的更多信息，请查看我们的[电子版细胞凋亡手册](#)。

细胞侵入性死亡

细胞侵入性死亡由一个细胞侵入另一个细胞引起。与失巢凋亡一样，这种形式的细胞死亡原因在于细胞从 ECM 脱离。在没有整联蛋白-ECM 附着的情况下，黏附连接的形成会触发细胞侵入性死亡。细胞侵入性死亡期间，细胞的入侵需要 Rho GTPase 及其下游效应因子 ROCK 的参与²⁸。

研究细胞死亡

区分不同形式的非凋亡性细胞死亡充满挑战，原因在于不同细胞死亡形式的形态特征类似（表 1）。但是，每种细胞死亡形式涉及的调控通路不同，因此可以使用不同的蛋白质标志物 (markers) 进行检测。

表 1. 主要细胞死亡通路汇总

	细胞凋亡	细胞程序性坏死	细胞焦亡	细胞铁坏死
触发信号	死亡受体活化	Caspase 8 被抑制时，死亡受体活化	病原体活化炎性小体	实验性小分子，例如 erastin
炎症反应	否	是	是	是
关键蛋白	Caspase 家族	- RIPK1 - RIPK3 - MLKL	- Caspase 1、4、5 和 11 - Gasdermin D	- GPX4
形态	- 细胞变圆 - 胞膜空泡化 - 凋亡小体形成	- 器官肿胀 - 膜破裂 - 细胞内容物释放	- 细胞膜破裂 - 细胞内容物释放 - 线粒体保持完整	- 线粒体变小，膜密度增加

无论您正在研究哪种细胞死亡，都可以搭配使用不同的方法。研究非凋亡性细胞死亡应同时使用目标细胞死亡模式的特异性阳性指标、细胞活性检测试剂盒和细胞凋亡排除技术²⁸。

细胞活性

细胞活性可使用细胞溶解、代谢活性或衰老等参数评估。选择哪种检测方法取决于您要检测的内容、可用的仪器以及样本的类型。表 2 概述了研究细胞活性的最常用方法以及预期结果。

表 2. 细胞活性研究方法

	细胞溶解或质膜透性检测	代谢活性检测	细胞周期检测	衰老检测	
作用机制	细胞膜破裂后，染料进入细胞	膜破裂后，酶被释放到培养基中	正常线粒体代谢导致特定染料氧化	荧光染料进入完整细胞的 DNA 中	染料特异性染色细胞衰老标志物 (cellular senescence markers)
标志物 (markers) 或染料	- PI - 7-AAD - DRAQ7™ - 台盼蓝	- LDH	- LDH 细胞裂解液 - MTT/XTT (resazurin) - WST-1 - 荧光染料	- PI - DRAQ5™ - 核绿 CCS1 - 核红 CCS1	衰老相关 β-gal
预期结果	信号增强：濒死细胞 无信号：活细胞	信号增强：濒死细胞 无信号：活细胞	信号增强：活细胞 信号减弱：死细胞	可以观察细胞周期阶段	蓝色：衰老细胞 无染色：休眠或永生细胞
检测方法	- 流式细胞术 - 显微镜观察法 - 高通量筛选	- 酶标仪	- 酶标仪	- 流式细胞术	- IHC
明星产品	Live and Dead Cell Assay (ab115347) DRAQ7™ (ab109202)	LDH cytotoxicity assay kit II (ab65393) LDH Cytotoxicity Assay Kit (Fluorometric) (ab197004)	Mitochondrial Viability Stain (ab129732) WST-1 Cell Proliferation Reagent (ab155902)	Propidium Iodide Flow Cytometry Kit (ab139418) Cell Cycle Assay Kit (Fluorometric - Green) (ab112116)	Senescence Detection Kit (ab65351)

缩略语：LDH=乳酸脱氢酶，PI=碘化丙啶，7-AAD=7-氨基放线菌素 D，WST1=水溶性四唑盐，Flow Cyt=流式细胞术，IHC=免疫组织化学，β-gal=β-半乳糖苷酶。

排除细胞凋亡

细胞凋亡可以通过不同的方法排除。下文简要描述了这些方法。有关细胞凋亡检测的更多详细信息，请查看我们的[电子版细胞凋亡手册](#)。

Caspase 3 活性

Caspase 3 是细胞凋亡的主要效应 Caspase，参与大规模蛋白水解，导致凋亡。Caspase 是无活性的 Caspase 前体，在特定位点被切割后活化。检测 Caspase 3 的方法取决于可用的仪器以及样本的制备方式（表 3）。

表 3. Caspase 3 活性检测

样本类型	检测方法	最佳使用情况	明星产品
固定细胞（悬浮或 粘附）	荧光显微镜法	观察哪些细胞含有活性 Caspase。通常在需要同时观察其他蛋白时使用	ab65613
	流式细胞术	使用特异性抗体快速检测和定量含有活性 Caspase 的细胞	ab65613
细胞或组织裂解液	Western blot	使用特异性抗体检测切割后的 Caspase 及其前体	ab32042 ab136812
	吸光度测定/荧光检测法	使用特定的底物快速检测细胞群中 Caspase 的活化情况。非常适合 HTP 分析	ab39401 ab39383
	吸光度测定/荧光检测法	使用靶向活化形式的特异性抗体快速检测细胞群中 Caspase 的活化情况	ab181418 ab220655
组织切片（冰冻或 石蜡切片）	IHC	使用异质组织（患者样本、小鼠或大鼠组织）中离散细胞内的特异性抗体观察 Caspase 的活化情况	ab32042

形态变化

观察濒死细胞的形态,可以确定发生的细胞死亡类型。细胞形态通过成像技术进行评估(表 4)。

表 4. 凋亡性和坏死性细胞死亡之间的形态学差异。

细胞凋亡	细胞坏死
- 细胞变圆	- 细胞肿胀
- 胞膜空泡化	- 膜破裂
- 凋亡小体形成	- 细胞内容物释放

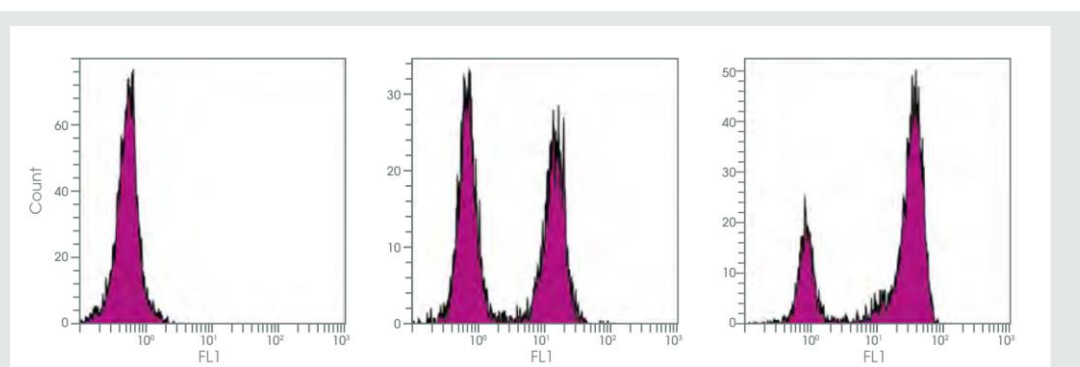
继发性坏死（与凋亡相关）可通过碘化丙啶（PI）染色与原发性坏死进行区分。均质 PI 染色显示染色质片段化，表明细胞凋亡，而坏死细胞的染色主要集中在核仁。

染色质固缩和 DNA 片段化

细胞凋亡过程中，染色质高度固缩。用 DNA 结合染料染色时，压实染色质的染色会比非凋亡细胞的染色质明亮。通过荧光显微镜法（定性检测）和/或流式细胞术（定量检测）可轻松识别固缩的细胞核。

随后，固缩的染色质会被特定的核酸酶-Caspase 活化的 DNase (CAD) 片段化，生成约 200 个碱基对的片段。这些片段可以通过在琼脂糖凝胶上检查 DNA 的方式进行检测。虽然该半定量方法已被淘汰，但它确实可以提供可靠的答案，并且非常简便。

明星产品



原位直接 DNA 片段化 (TUNEL) 检测试剂盒

TUNEL 流式检测分析。使用 [In situ direct DNA fragmentation \(TUNEL\) assay kit \(ab66108\)](#) 染色前 24 小时，分别对 RAW 264.7 细胞不做处理 (A) 或用浓度递增的喜树碱 (B, 2 μ M; C, 10 μ M) 进行处理。该检测试剂盒使用了 FITC (可在 FL1 通道中检测) 标记的脱氧尿苷核苷酸。

⊕ 凋亡 DNA 片段化分析方案

检测细胞程序性坏死

虽然参与细胞程序性坏死通路 (表 5) 的蛋白有很多，但检测细胞程序性坏死的最可靠方法是测定 MLKL 的磷酸化状态并特异性地抑制该通路。

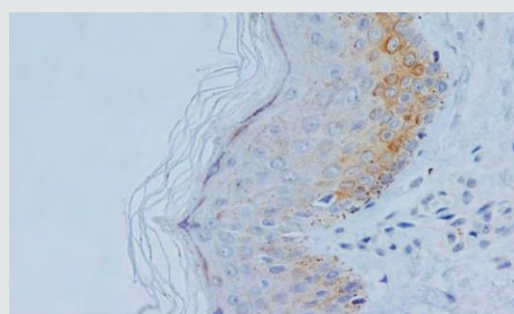
表 5. 参与细胞程序性坏死的关键蛋白

蛋白质	功能	在细胞程序性坏死中的作用
RIPK1	参与炎症反应和细胞死亡通路的蛋白激酶	将 RIPK3 募集至坏死体
RIPK3	细胞程序性坏死所需的蛋白激酶	寡聚化 MLKL 并将 MLKL 募集至坏死体
MLKL	RIPK3 磷酸化的激酶结构域样蛋白	转运至膜，以介导细胞死亡
CYLD	去泛素化酶	去泛素化 RIPK1，以形成坏死体。
cIAP1/2	泛素 E3 连接酶	泛素化 RIPK1，防止形成坏死体
Caspase-8	促凋亡 Caspase	抑制细胞程序性坏死

MLKL 磷酸化

MLKL 被 RIPK3 介导的磷酸化活化。MLKL 的活化状态可以通过评估 Thr357 和 Ser358 的磷酸化状态来确定。磷酸化-MLKL 可采用基于抗体的方法（包括 western blot、IHC 和流式细胞术）进行检测。

明星产品



MLKL (磷酸化 S358) 抗体 (EPR9514)

通过免疫组织化学检测磷酸化的 MLKL (pS358)。用兔单克隆 **MLKL (磷酸化 S358) 抗体 (EPR9514) (ab187091)** 按 1:250 的稀释比例对人体皮肤组织的福尔马林/PFA 固定的石蜡包埋切片 (FFPE) 进行染色。

细胞程序性坏死的抑制

通过化学抑制或转基因模型靶向细胞程序性坏死通路的组分，可判断细胞死亡是否取决于这些组分。

表 6. 细胞程序性坏死的化学抑制剂

化合物	靶标
Necrostatin-1 (Nec1)	RIPK1
7-Cl-O-Nec-1 (Nec1s)	RIPK1
GSK'872	RIPK3
Necrosulfonamide	MLKL

使用抑制剂的注意事项：

- Nec1 具有一定的脱靶活性：Nec1s 的特异性更高²⁹。
- RIPK1 可以促进细胞凋亡³⁰。请注意，在某些情况下，RIPK1 抑制剂可能阻断细胞凋亡。
- 使用转基因模型是确认细胞程序性坏死的最佳方法。

检测细胞焦亡

细胞焦亡可通过观察 Caspase 的活化、gasdermin D 的裂解，抑制或去除细胞焦亡通路的关键组分等方式进行研究（表 7）。

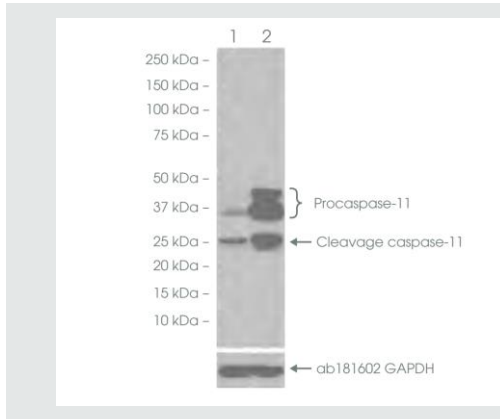
表 7. 参与细胞焦亡的关键蛋白

蛋白质	功能	在细胞焦亡中的作用
Caspase 1	被传感蛋白和炎症因子活化的炎性 Caspase	切割 gasdermin D
Caspase 11 (小鼠)、Caspase 4 和 5 (人)	被细菌多糖活化的炎性 Caspase	切割 gasdermin D
Gasdermin-D	被 Caspase 切割	执行细胞焦亡

Caspase 活性

细胞焦亡过程中，活性 Caspase 从其惰性 Caspase 前体中被切割出来。Caspase 的切割可以通过 western blot 和特异性 Caspase 抗体进行评估。

明星产品

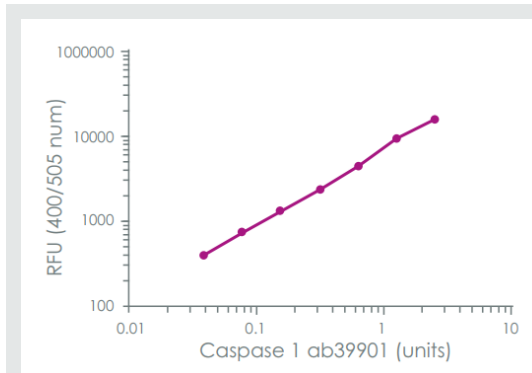


Caspase 11 抗体 [EPR18628]

使用兔单克隆 **Caspase 11 抗体 (EPR18628) (ab180673)** (1:1000 稀释度) 检测 RAW 164.7 (小鼠巨噬细胞) 细胞裂解液中的 Caspase 11。泳道 1: 未经处理, 泳道 2: 用 10 mg/mL 脂多糖对细胞进行 8 小时的处理。GAPDH 用作内参对照。

虽然活性 Caspase 已被切割，但仅观察到切割的 Caspase 并不能证明 Caspase 被活化，因此还应使用其他方法来确定细胞焦亡。可以直接使用 Caspase 活化检测试剂盒来检测 Caspase 的活化情况。

明星产品



Caspase 1 检测试剂盒 (荧光法)

使用 **Caspase 1 检测试剂盒 (荧光法) (ab39412)** 可在 2 小时内检测出已知浓度的活性 Caspase 1 的活性 (去除背景)。

Gasdermin D

细胞焦亡与 gasdermin D (53 kDa) 的切割有关, 切割后可产生 30 kDa 的 N 末端片段。通过 western blot 检测是否存在 30 kDa 的条带, 可确定是否存在被切割的 gasdermin D。

建议使用我们的 [gasdermin D 兔单克隆抗体 \(\[EPR19828\]\) \(ab209845\)](#) 检测 gasdermin D 的 N 末端片段。

细胞焦亡的抑制

是否依赖 Caspase 1、11、4 或 5 是区分细胞焦亡与其他形式的细胞程序性坏死和细胞凋亡的关键。通过化学抑制或转基因模型, 可确定相关 Caspase 失去活性后是否仍会发生细胞死亡。

Caspase 1 的活性可通过 [z-YVAD-fmk \(ab141388\)](#) 进行化学抑制的方式来消除。

检测细胞铁坏死

观察抑制剂是否阻止了细胞死亡并对脂质过氧化物进行测定可识别细胞铁坏死。

表 8. 参与细胞铁坏死的关键蛋白

蛋白质	功能	在细胞铁坏死中的作用
GPX4	减少脂膜内的脂质氢过氧化物	在细胞铁坏死中的活性降低
谷胱甘肽	GPX4 底物	如果是 X _c -抑制导致的细胞铁坏死, 谷胱甘肽将被耗尽

抑制细胞铁坏死

使用已知可防止细胞铁坏死的化学抑制剂可确认是否存在细胞铁坏死。细胞铁坏死是由 GPX4 活性降低引起的, 因此敲低并非有效方法。

表 9. 细胞铁坏死抑制剂及其作用方式

抑制剂	作用方式
Ferrostatin-1	脂质 ROS 清除剂 ²⁰
Liproxstatin-1	未知, 可能减少自由基 ²¹

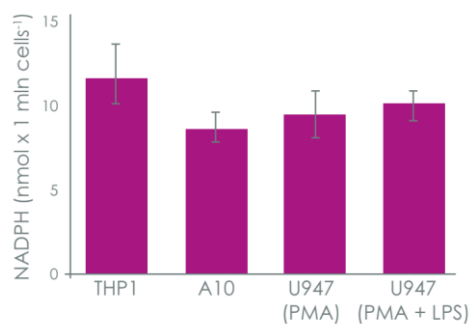
脂质过氧化物的积累

细胞铁坏死依赖于脂质 ROS 的积累。检测脂质 ROS 是否存在的方法有很多种。

表 10. 脂质 ROS 检测方法

检测方法	机制	如何测定
C11 - BODIPY	检测自由基诱导的氧化	流式细胞术定量
丙二醛定量法	脂质过氧化的副产物	脂质过氧化 (MDA) 检测试剂盒
4-HNE 定量	脂质过氧化的副产物	基于抗体的定量

明星产品



谷胱甘肽过氧化物酶检测试剂盒

使用谷胱甘肽过氧化物酶检测试剂盒 (ab102530) 测定细胞裂解物中的谷胱甘肽过氧化物酶 (GPX) 活性。采用 THP1 (人单核细胞白血病)、A10 (大鼠胸主动脉) 和 U947 (人单核细胞) 制备裂解液。

常规注意事项

正如我们在本指南中所提到的，确定所研究细胞群中的细胞死亡类型时，建议分析多个参数。这是因为在诸如细胞坏死或细胞程序性坏死等不同类型的细胞死亡中可以观察到多个参数。

注意事项：

- 选择要研究的参数时，请确保该参数与您的实验条件相关
- 使用初始剂量反应曲线，确定在目标细胞中获得最佳结果的化合物浓度和处理时间
- 尽量减少处理步骤，防止濒死细胞的损失
- 已发表的文献和方案可以提供宝贵的指导，但不要仅仅依靠它们来设置您的实验条件 — 实验室之间的细微差别都可能影响您的结果

参考文献

1. Kroemer, G. *et al.* Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* **16**, 3-11 (2009).
2. Moriwaki, K. & Chan, F. K. M. RIP3: A molecular switch for necrosis and inflammation. *Genes Dev* **27**, 1640-1649 (2013).
3. Sun, L. *et al.* Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell* **148**, 213-227 (2012).
4. Donnell, M. A. O. *et al.* NIH Public Access. **13**, 1437-1442 (2012).
5. Lin, Y., Devin, A., Rodriguez, Y. & Liu, Z. G. Cleavage of the death domain kinase RIP by Caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. *Genes Dev* **13**, 2514-2526 (1999).
6. Feng, S. *et al.* Cleavage of RIP3 inactivates its caspase-independent apoptosis pathway by removal of kinase domain. *Cell Signal* **19**, 2056-2067 (2007).
7. Mocarski, E. S., Guo, H. & Kaiser, W. J. Necroptosis: The Trojan horse in cell autonomous antiviral host defense. *Virology* **479-480**, 160-166 (2015).
8. Ofengeim, D. *et al.* Activation of necroptosis in multiple sclerosis. *Cell Rep* **10**, 1836-49 (2015).
9. Conrad, M., Angeli, J. P. F., Vandenabeele, P. & Stockwell, B. R. Regulated necrosis: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov* **15**, 348-366 (2016).
10. Degtarev, A. *et al.* Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol* **1**, 112-119 (2005).
11. Holler, N. *et al.* Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat. Immunol.* **1**, 489-495 (2000).
12. Cai, Z. *et al.* Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis. *Nat Cell Biol* **16**, 55-65 (2014).
13. Galluzzi, L., Kepp, O. & Kroemer, G. MLKL regulates necrotic plasma membrane permeabilization. *Cell Res* **24**, 139-40 (2014).
14. Dondelinger, Y. *et al.* MLKL compromises plasma membrane integrity by binding to phosphatidylinositol phosphates. *Cell Rep* **7**, 971-81 (2014).
15. Wang, H. *et al.* Mixed Lineage Kinase Domain-like Protein MLKL Causes Necrotic Membrane Disruption upon Phosphorylation by RIP3. *Mol. Cell* **54**, 133-146 (2014).
16. He, S., Liang, Y., Shao, F. & Wang, X. Toll-like receptors activate programmed necrosis in macrophages through a receptor-interacting kinase-3-mediated pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 20054-20059 (2011).
17. He, W. *et al.* Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1[beta] secretion. *Cell Res* **25**, 1285-1298 (2015).

18. Shi, J. *et al.* Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* **526**, 660-665 (2015).
19. Kayagaki, N. *et al.* Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signaling. (2015). doi:10.1038/nature15541
20. Dixon, S. J. *et al.* NIH Public Access. **149**, 1060-1072 (2013).
21. Conrad, M. & Friedmann Angeli, J. P. Glutathione peroxidase 4 (Gpx4) and ferroptosis: what's so special about it? *Mol. Cell. Oncol.* **2**, e995047 (2015).
22. Yang, W. S. & Stockwell, B. R. Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation. *Trends Cell Biol.* **xx**, 1-12 (2015).
23. Yang, W. S. & Stockwell, B. R. Synthetic Lethal Screening Identifies Compounds Activating Iron-Dependent, Nonapoptotic Cell Death in Oncogenic-RAS-Harboring Cancer Cells. *Chem. Biol.* **15**, 234-245 (2008).
24. Fatokun, A. A., Dawson, V. L. & Dawson, T. M. Parthanatos: Mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities. *Br. J. Pharmacol.* **171**, 2000-2016 (2014).
25. Krietsch, J. *et al.* Reprogramming cellular events by poly(ADP-ribose)-binding proteins. *Mol. Aspects Med.* **34**, 1066-1087 (2013).
26. Paoli, P., Giannoni, E. & Chiarugi, P. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochim. Biophys. Acta* **1833**, 3481-98 (2013).
27. Jan, Y. *et al.* A Mitochondrial Protein, Bit1, Mediates Apoptosis Regulated by Integrins and Groucho/TLE Corepressors. *Cell* **116**, 751-762 (2004).
28. Vanden Berghe, T. *et al.* Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo. *Methods* **61**, 117-129 (2013).
29. Takahashi, N. *et al.* Necrostatin-1 analogues: critical issues on the specificity, activity and in vivo use in experimental disease models. *Cell Death Dis.* **3**, e437-10 (2012).
30. Kaiser, W. J. *et al.* RIP1 suppresses innate immune necrotic as well as apoptotic cell death during mammalian parturition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 7753-7758 (2014).

