

引文格式:孔蕾,胡敏,华启云,张红. 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,2016,36(12):1109-1112. doi:10.13389/j.cnki.rao.2016.0296

【实验研究】

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[△]

孔蕾 胡敏 华启云 张红

作者简介:孔蕾,女,1979年12月出生,云南曲靖人,主治医师。研究方向:玻璃体视网膜疾病。联系电话:0871-65156650-2880(办);E-mail:konglei6789@163.com;ORCID:0000-0001-5725-400X

About KONG Lei: Female, born in December, 1979. Attending doctor. Tel: +86-871-65156650-2880(O); E-mail: konglei6789@163.com; ORCID: 0000-0001-5725-400X

收稿日期:2016-08-17
修回日期:2016-09-09
本文编辑:盛丽娜

△基金项目:国家自然科学基金资助(编号:81560168)

作者单位:650031 云南省昆明市,云南省第二人民医院眼科

通讯作者:张红, E-mail: zhanghong5156@163.com; ORCID: 0000-0002-6051-5941

Received date: Aug 17, 2016
Accepted date: Sep 9, 2016
Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No: 81560168)

From the Department of Ophthalmology, the Second People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650031, Yunnan Province, China

Responsible author: ZHANG Hong, E-mail: zhanghong5156@163.com; ORCID: 0000-0002-6051-5941

肿瘤坏死因子- α 、Caspase8的表达变化。结果 荧光定量PCR检测 RIP3、RIP1、白细胞介素-1 β 、白细胞介素-6、肿瘤坏死因子- α 、Caspase8的mRNA表达,与对照组比较,实验组在不同时间点均有显著升高,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.001$)。RIP3及RIP1表达以早期升高为主,后期逐渐下降。Western blotting检测发现RIP3在RIRI后1d及2d显著升高,随后呈下降趋势。组织切片免疫荧光染色也发现RIP3在RIRI后1d及2d显著升高,随后呈下降趋势。结论 实验性RIRI模型中,坏死性凋亡参与了其病理过程。坏死性凋亡特异性蛋白RIP3表达以早期升高为主,后期逐渐下降。

Expression changes of necroptosis related factors in experimental retinal ischemia reperfusion injury

KONG Lei, HU Min, HUA Qi-Yun, ZHANG Hong

【Key words】 necroptosis; retinal ischemia reperfusion injury; receptor interacting protein; rat

【Abstract】 **Objective** To observe whether necroptosis involved in the pathological process of retinal ischemia reperfusion injury (RIRI) or not by establishing an retinal ischemia reperfusion injury model. **Methods** Wild type C57 mice were divided into control group and experimental group randomly. The mice in control group were treated with nothing. RIRI models in experimental group were induced with anterior chamber perfusion. The retina or eyeballs were harvested, Q-PCR, Western blot and immunofluorescence staining were performed to test receptor interacting protein 3 (RIP3), RIP1, IL-1 β , TNF- α , Caspase-8, and IL-6 changes at 1 day, 2 days, 4 days, 7 days. **Results** The mRNA expression change of RIP3, RIP1, IL-1 β , TNF- α , Caspase-8, and IL-6 were detected by Q-PCR. Compared with control group, all genes mRNA expression were increased significantly at different time points (all $P < 0.001$). RIP3, RIP1 mRNA expressions were increased at the early phase of RIRI, and decreased in the late phase slowly. Western blot found RIP3 expression increased dramatically at 1 day and 2 days, then decreased gradually. Retinal immunofluorescence staining also found RIP3 expression increased dramatically at 1 day and 2 days, then decreased slowly. **Conclusion** Necroptosis participates in the pathological process of experimental RIRI. As a specified marker of necroptosis, RIP3 expression increase at the early phase of RIRI, and decrease at the later phase gradually.

【中图分类号】 R774.1

【关键词】 坏死性凋亡;视网膜缺血-再灌注损伤;受体相互作用蛋白;鼠

【摘要】 **目的** 建立视网膜缺血-再灌注损伤(retinal ischemia reperfusion injury, RIRI)模型,观察坏死性凋亡是否参与其病理过程。**方法** 野生型C57小鼠随机分为对照组及实验组。对照组不做任何处理,实验组采用前房灌注法建立RIRI模型,并于RIRI后1d、2d、4d、7d分别收集视网膜或眼球,行荧光定量PCR、Western blot、免疫荧光染色检测受体相互作用蛋白(receptor interacting protein, RIP)3及RIP1、白细胞介素-1 β 、白细胞介素-6、肿瘤坏死因子- α 、Caspase8的表达变化。**结果** 荧光定量PCR检测 RIP3、RIP1、白细胞介素-1 β 、白细胞介素-6、肿瘤坏死因子- α 、Caspase8的mRNA表达,与对照组比较,实验组在不同时间点均有显著升高,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.001$)。RIP3及RIP1表达以早期升高为主,后期逐渐下降。Western blotting检测发现RIP3在RIRI后1d及2d显著升高,随后呈下降趋势。组织切片免疫荧光染色也发现RIP3在RIRI后1d及2d显著升高,随后呈下降趋势。**结论** 实验性RIRI模型中,坏死性凋亡参与了其病理过程。坏死性凋亡特异性蛋白RIP3表达以早期升高为主,后期逐渐下降。

[12] 卫洁. 糖尿病白内障术后并发症[J]. 眼外伤职业眼病杂志, 2009, 31(12): 929-931.

[13] LEE YJ, LEE SH. Sulforaphane induces antioxidative and antiproliferative responses by generating reactive oxygen species in human bronchial epithelial BEAS-2 B cells[J]. *J Korean Med Sci*, 2011, 26(11): 1474-1482.

[14] HASHIM Z, ZARINA S. Antioxidant markers in human senile and diabetic cataractous lenses[J]. *J Coll Physicians Surg Pat*, 2006, 16(1): 637-640.

[15] HEGDE KR, HENEIN MG, VARNLA SD. Establishment of mouse as an animal model for study of diabetic cataracts: biochemical studies[J]. *Diabetes Obes Metab*, 2003, 5(1): 113-119.

[16] SWAMMY-MROTHINTI S, SHAW SM, ZHAO HR, GREEN K, ABRAHAM EC. Evidence of a glycemic threshold for the development of cataracts in diabetic rats[J]. *Curr Eye Res*, 1999, 18(2): 423-429.

[17] SNOW A, SHIEH B, CHANG KC, PAL A, LENHART P, AMMAR D, et al. Aldose reductase expression as a risk factor for cataract[J]. *Chem Biol Interact*, 2015, 234(2): 247-253.

[18] REDDY AB, TAMMALI R, MISHRA R, SRIVASTAVA S, SRIVASTAVA SK, RAMANA KV. Aldose reductase deficiency protects sugar-induced lens opacification in rats[J]. *Chem Biol Interact*, 2011, 191(1-3): 346-350.

视网膜缺血-再灌注损伤 (retinal ischemia reperfusion injury, RIRI) 在临床上十分常见, 主要发生于急性闭角型青光眼、视网膜中央动脉或静脉栓塞、糖尿病性视网膜病变、缺血性视神经病变等视网膜血管痉挛或阻塞所引起的一大类眼部疾病之中^[1-3]。目前, 有研究认为 RIRI 中视网膜神经细胞死亡的主要方式是凋亡^[4], 但也有研究发现单纯调控凋亡并不能很好地保护神经细胞^[5]。因此, 我们推测 RIRI 中神经细胞的死亡可能还有其他机制。近年来, 坏死性凋亡在脑部等组织缺血-再灌注损伤中已经被证实发挥了重要的作用^[6]。但是, RIRI 中坏死性凋亡是否参与尚不清楚。炎症在 RIRI 中的作用已被越来越多的研究证实^[7], 结合坏死性凋亡既有炎症又有凋亡的特征^[8], 我们推测坏死性凋亡也参与了 RIRI 过程。为此, 我们建立了小鼠 RIRI 模型, 并从 RNA、蛋白及组织等几个层次检测受体相互作用蛋白 (receptor interacting protein, RIP) 3 及相关炎症因子在不同时间点的表达变化, 探讨坏死性凋亡在小鼠 RIRI 模型中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 选择 4~6 周龄的 C57 野生型雌性小鼠 75 只, 体质量 16~18 g, 实验前检查双眼眼前节和眼底均正常。实验动物由昆明医科大学动物科提供, 实验动物及实验使用条件均符合《实验动物管理条例》。小鼠随机分为两组: 实验组 60 只, 通过前房灌注法建立 RIRI 模型, 按再灌注后不同损伤时间纳入 1 d、2 d、4 d、7 d 组, 每组 15 只小鼠, 按 1 d、2 d、4 d、7 d 时间点取材后行荧光定量 PCR (quantitative PCR, Q-PCR)、Western blot、免疫荧光染色检测, 每种检测方法 5 只小鼠。对照组 15 只, 不做任何处理, 分别行 Q-PCR、Western blot、免疫荧光染色检测, 每种检测方法 5 只小鼠。

1.2 动物模型的建立 小鼠腹腔内注射 43 g·L⁻¹ 水合氯醛全身麻醉, 使用复方托吡卡胺眼液散大瞳孔。小鼠固定于自制固定器, 参照文献报道的动物模型建立方法^[9-11], 将 30 G 针头插入术眼前房, 注意维持穿刺口密闭, 注射器另一端连接于生理盐水瓶。常规采用右眼作为术眼, 若右眼前房密闭差则改术眼为左眼。缓慢将生理盐水瓶调节高度至 150 cm, 眼压约 110 mmHg (1 kPa = 7.5 mmHg)。检查可见角巩膜缘血管苍白, 视网膜血管苍白, 表示视网膜缺血成功。缺血持续 60 min 后, 逐渐降低输液瓶高度至与小鼠眼球水平, 拔出前房灌注针头, 恢复视网膜血供。检查可见角巩膜缘血管恢复血供, 视网膜血管恢复血供, 表示再灌注成功。对侧眼不做任何处理。

1.3 Western blot 检测 小鼠过量麻醉处死, 收取 RIRI 不同时间点组及对照组各 5 只小鼠 5 只眼, 置于冰上迅速分离出视网膜。蛋白裂解液抽提蛋白, 等量蛋白常规上样、跑胶、转膜后, 加入 1:1000 兔

抗小鼠 RIP3 抗体 (CST, 美国) 4℃ 冰箱内过夜孵育。洗膜后, 1:5000 山羊抗兔二抗 (Life, 美国) 室温下孵育 1 h。化学发光法显色, 以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 作为内参, 比较各组间 RIP3 表达差异。

1.4 Q-PCR 检测 小鼠过量麻醉处死, 收取 RIRI 后不同时间点组及对照组各 5 只小鼠 5 只眼, 置于冰上迅速分离出视网膜。采用文献报道的方法^[12], 使用 TRNzol 试剂抽提总 RNA, 分离纯化后使用紫外分光光度计法定量。行逆转录反应合成 cDNA, 以其为模板进行 Q-PCR。反应条件为: 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 15 s, 60℃ 退火 30 s, 95℃ 变性 1 min, 55℃ 退火 1 min, 共 50 个循环。反应结束后, 记录荧光强度达阈值时的循环数, 采用相对定量 2^{-ΔΔCt} 法, 计算每个目的基因 mRNA 相对拷贝数, 实验重复 3 次, 取平均值。实验中检测以下因子 mRNA 表达变化: 白细胞介素 (interleukin, IL)-1β、IL-6、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor-α, TNF-α)、RIP1、RIP3 及半胱天冬酶 8 (Caspase8), 引物序列见表 1。

表 1 Q-PCR 引物序列

目的基因	引物序列
IL-1β	正向引物: 5'-TGAAATGCCACCTTTTGACAG-3'
	反向引物: 5'-CCACAGCCACAATGAGTGATAC-3'
IL-6	正向引物: 5'-CAGAGGACCCAGAGACAAGC-3'
	反向引物: 5'-TGCTGAAACATTTCTCTGTGC-3'
TNF-α	正向引物: 5'-CAAAATTCGAGTGACAAGCCTG-3'
	反向引物: 5'-GAGATCCATGCCGTTGGC-3'
RIP3	正向引物: 5'-GCTGCACTGCATCCATATC-3'
	反向引物: 5'-CACTGGCTAAAGGGGAGTGA-3'
RIP1	正向引物: 5'-AGGTCCCTGTCATGCTTCTG-3'
	反向引物: 5'-ATTGTGTTCCGATCCAGGTT-3'
Caspase8	正向引物: 5'-AGCAGCAAGTGCTCCAATCT-3'
	反向引物: 5'-ATTTCTTGGGTTGCTGTGC-3'

1.5 免疫荧光染色检测 小鼠过量麻醉处死, 收取 RIRI 后不同时间点组及对照组各 5 只小鼠 5 只眼。小鼠眼球冰冻包埋, 10 μm 厚切片。切片室温干燥 0.5 h, 40 g·L⁻¹ 多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗 3 次, 每次 10 min; 体积分数 0.3% Triton X-100 室温打孔 15 min, PBS 洗 3 次, 每次 10 min; 50 g·L⁻¹ 牛血清白蛋白封闭 1 h, 1:250 兔抗小鼠 RIP3 抗体 (Cell signaling technology, 美国) 过夜孵育, PBS 洗 3 次, 每次 10 min; 山羊抗兔荧光二抗 1:1000 (Thermo fisher scientific, 美国) 孵育 1 h, PBS 洗 3 次, 每次 10 min; 4',6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 室温孵育 5 min, PBS 洗 3 次, 每次 10 min, 置荧光显微镜下观察。

1.6 统计学处理 数据均以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。结果使用 Graph Pad 软件分析, 采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RIRI 眼中 RIP3 及炎症相关因子 mRNA 表达变化 与对照组相比, 实验组 RIP3、RIP1 在 RIRI 后

1 d 开始升高,2 d 后达到高峰,之后逐渐下降。为证明 RIP3 表达变化与炎症相关因子的关系,本研究检测了 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、Caspase8 的表达变化。结果表明,实验组 RIP3、RIP1 表达升高伴随了炎症相关因子的表达升高,炎症相关因子变化持续时间较 RIP3 及 RIP1 长(图 1)。

2.2 RIRI 眼中 RIP3 蛋白表达变化 与对照组相

比,实验组 RIP3 蛋白表达在 RIRI 后 1 d 开始升高,2 d 后达到高峰,之后逐渐下降,变化趋势与 RIP3 mRNA 的变化基本一致(图 2)。

2.3 RIRI 眼组织切片中 RIP3 表达变化 与对照组相比,实验组 RIP3 在 RIRI 模型中组织水平的变化与 mRNA 及蛋白水平的变化基本一致,在 RIRI 后 1 d 开始升高,2 d 后达到高峰,之后逐渐下降(图 3)。

图 1 Q-PCR 检测 RIP3 及炎症相关因子 mRNA 表达变化。各组数据显示实验组与对照组相比各因子 mRNA 表达变化倍数,结果行 *t* 检验。各组数据在不同时间点与对照组(即 0 d 时)比较差异均有统计学意义(*** *P* < 0.001)

3 讨论

RIRI 是常见致盲性眼病的病因,其导致视网膜神经细胞死亡而最终影响视力。常见的 RIRI 所致的视网膜神经细胞死亡方式是坏死和凋亡。凋亡通常被认为是细胞程序性死亡的方式,而坏死通常被认为是偶然和不可调控性的细胞死亡方式^[13]。然而,近年来越来越多的资料表明,坏死也可以像凋亡一样接受程序性的调控,这种细胞的死亡方式被命名为坏死性凋亡^[14]。它是指由死亡受体和配基启

图 2 Western blot 检测各组小鼠视网膜 RIP3 蛋白表达变化

图 3 RIRI 后各组视网膜 RIP3 免疫荧光染色像

动、通过死亡受体介导,在凋亡通路受到抑制的情况下发生的一类细胞坏死。坏死性凋亡发生于与死亡受体结合及坏死小体形成之后。像凋亡小体一样,坏死小体有其结构特征,它最初是由 RIP1 和 RIP3 结合形成复合物而构成^[15]。其中,RIP3 介导了复合物的形成及转归。因此,检测 RIP3 的变化可以反映坏死性凋亡的发生及发展^[16]。

目前,关于坏死性凋亡的研究越来越多,其在眼部疾病中的作用也越来越被重视^[17]。然而,关于其是否在 RIRI 模型中发挥作用目前还不是很清楚。我们的研究结果发现,在 RIRI 损伤后,RIP3、RIP1 的表达发生了显著变化,其 mRNA 变化在 RIRI 后 1 d 开始升高,在 2 d 后达到高峰,之后逐渐降低。通过 Western blot 检测 RIP3 蛋白水平的变化,我们发现其变化趋势类似于 mRNA 的变化。同时,通过免疫荧光染色,我们也再次验证了 RIP3 在 RIRI 模型中的表达变化。值得注意的是,RIP3 的表达具有明显的时间特点,呈现出损伤早期显著升高,后期逐渐下降的趋势。而结合文献报道,凋亡主要在 RIRI 后期发挥作用^[18]。所以,我们推测在 RIRI 的早期以坏死性凋亡为主要细胞死亡类型,而在 RIRI 的晚期以凋亡为主要的细胞死亡方式。

坏死性凋亡在病理学特征方面具有明显的坏死特性。首先,它具有典型的坏死样形态改变:细胞膜完整性破坏严重,细胞器肿胀乃至崩解,而细胞核内染色质缺乏明显的形态学改变;它与凋亡和自噬有明显的区别,三者可以通过光镜、电镜观察和碘化丙啶染色得到明确的区分。其次,坏死性凋亡引起显著的炎症反应,表现为大量的炎症细胞浸润和激活^[19]。炎症存在是坏死性凋亡的一个重要特征,检测炎症因子的表达可以从一个侧面反映坏死性凋亡的发生^[20]。本研究证实,RIRI 后众多炎症相关因子的表达显著上调,与对照组比较差异均有统计学意义。且炎症相关因子的表达也具有时间特性,即在损伤早期显著上升,且持续时间较 RIP3 长。实验中同时检测了 RIRI 的 mRNA 表达变化,其表达变化趋势与 RIP3 基本相同。值得注意的是,凋亡的相关因子 Caspase8 从 RIRI 早期升高,升高一直持续,且后期更明显,这也从另一个方面证实了我们的推测,即在 RIRI 的早期以坏死性凋亡为细胞死亡的主要方式,而在晚期则以凋亡为主要的细胞死亡方式。

坏死性凋亡作为一种新近提出的细胞死亡方式,在炎症、肿瘤、缺血-再灌注损伤等疾病中的作用越来越受到重视,但在眼部疾病中的研究目前还很少。我们的研究初步证实了坏死性凋亡参与了 RIRI 的病理过程,并发现 RIRI 早期坏死性凋亡相关因子表达较高。由此我们推测,RIRI 早期以坏死性凋亡为主要病理过程,后期以凋亡为主要病理过程。但坏死性凋亡与凋亡两者的关系,坏死性凋亡在 RIRI 中的调控机制等问题还有待于进一步研究。这些问

题的阐明将丰富 RIRI 的理论基础,为治疗提供新的可能靶点。

参考文献

- [1] GONCALVES A, LIN CM, MUTHUSAMY A, FONTES-RIBEIRO C, AMBROSIO AF, ABCOUWER SF, *et al*. Protective effect of a GLP-1 analog on ischemia-reperfusion induced blood-retinal barrier breakdown and inflammation[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57(6): 2584-2592.
- [2] 张海江, 邢怡桥, 梁亮, 金玮, 李岱. 视网膜缺血-再灌注损伤大鼠视网膜中白细胞介素-23 和白细胞介素-17 的表达及意义[J]. *眼科新进展*, 2016, 36(2): 121-125.
- [3] QI Y, ZHAO M, BAI Y, HUANG L, YU W, BIAN Z, *et al*. Retinal ischemia/reperfusion injury is mediated by Toll-like receptor 4 activation of NLRP3 inflammasomes[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014, 55(9): 5466-5475.
- [4] KO ML, CHEN CF, PENG PH, PENG YH. Simvastatin upregulates Bcl-2 expression and protects retinal neurons from early ischemia/reperfusion injury in the rat retina[J]. *Exp Eye Res*, 2011, 93(5): 580-585.
- [5] PRODUIT-ZENGAFFINEN N, POURNARAS CJ, SCHORDERET DF. Autophagy induction does not protect retina against apoptosis in ischemia/reperfusion model[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2014, 801(4): 677-683.
- [6] JOUAN-LANHOUE S, RIQUET F, DUPREZ L, VANDEN BT, TAKAHASHI N, VANDENABEELE P. Necroptosis, *in vivo* detection in experimental disease models[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2014, 35(1): 2-13.
- [7] 李娟娟, 李燕, 汤志伟. 激活的小胶质细胞在大鼠视网膜缺血-再灌注损伤模型中的作用[J]. *眼科新进展*, 2015, 35(1): 9-14.
- [8] ITO Y, OFENGEIM D, NAJAFOV A, DAS S, SABERI S, LI Y, *et al*. RIPK1 mediates axonal degeneration by promoting inflammation and necroptosis in ALS[J]. *Science*, 2016, 353(6299): 603-608.
- [9] 李娟娟, 李燕, 汤志伟. 光学相干断层扫描在视网膜缺血-再灌注动物模型中的应用及评价[J]. *眼科新进展*, 2014, 34(7): 616-619, 623.
- [10] 刘瑞芳, 万新顺, 韩丽英. 硫酸镁对兔视网膜缺血-再灌注损伤的保护作用[J]. *新乡医学院学报*, 2008, 25(5): 465-468.
- [11] 贺玲. 原花青素对大鼠视网膜缺血-再灌注损伤后视神经的保护作用[J]. *新乡医学院学报*, 2012, 29(1): 26-28.
- [12] TROST A, MOTLOCH K, BRUCKNER D, SCHROEDL F, BOGNER B, KASER-EICHBERGER A, *et al*. Time-dependent retinal ganglion cell loss, microglial activation and blood-retina-barrier tightness in an acute model of ocular hypertension[J]. *Exp Eye Res*, 2015, 136: 59-71.
- [13] DAVIDOVICH P, KEARNEY CJ, MARTIN SJ. Inflammatory outcomes of apoptosis, necrosis and necroptosis[J]. *Biol Chem*, 2014, 395(10): 1163-1171.
- [14] VANDEN BT, KAISER WJ, BERTRAND MJ, VANDENABEELE P. Molecular crosstalk between apoptosis, necroptosis, and survival signaling[J]. *Mol Cell Oncol*, 2015, 2(4): e975093.
- [15] SHAHSAVARI Z, KARAMI-TEHRANI F, SALAMI S, GHASEMZA-DEH M, RIFI K and RIP3K provoked by shikonin induce cell cycle arrest in the triple negative breast cancer cell line, MDA-MB-468; necroptosis as a desperate programmed suicide pathway[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(4): 4479-4491.
- [16] MORIWAKI K, CHAN FK. Regulation of RIPK3 and RHIM-dependent necroptosis by the proteasome[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(11): 5948-5959.
- [17] VIRINGIPURAMPEER IA, SHAN X, GREGORY-EVANS K, ZHANG JP, MOHAMMADI Z, GREGORY-EVANS CY. RIP3 knockdown rescues photoreceptor cell death in blind pde6c zebrafish[J]. *Cell Death Differ*, 2014, 21(5): 665-675.
- [18] HAYREH SS. Ischemic optic neuropathies-where are we now[J]? *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2013, 251(8): 1873-1884.
- [19] SU Z, YANG Z, XU Y, CHEN Y, YU Q. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis[J]. *Mol Cancer*, 2015, 14: 48.
- [20] SILKE J, RICKARD JA, GERLIC M. The diverse role of RIP kinases in necroptosis and inflammation[J]. *Nat Immunol*, 2015, 16(7): 689-697.