

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.11.003

## KLF4/BNIP3 介导的线粒体自噬在 FNDC5 抵抗阿霉素心肌毒性中的作用\*

卢林鹤<sup>1</sup> 马继鹏<sup>1</sup> 唐嘉佑<sup>1</sup> 李兰兰<sup>1</sup> 金屏<sup>1</sup> 刘洋<sup>1</sup> 杨丽芳<sup>2</sup> 杨剑<sup>1Δ</sup>

(1 空军军医大学西京医院心血管外科 陕西 西安 710032; 2 西安市儿童医院麻醉科 陕西 西安 710003)

**摘要 目的:**本研究旨在探究 FNDC5(Irisin)是否通过激活 KLF4 而抑制 BNIP3 介导的线粒体过度自噬,保护线粒体功能及降低纤维化蛋白的表达,明确其在 DOX 导致的心肌细胞毒性中的保护作用机制。**方法:**将分离的心肌成纤维细胞随机进行如下分组:对照组 (CON)、FNDC5 处理组 (FNDC5)、DOX 损伤组 (DOX)、FNDC5 保护组 (DOX-FNDC5)、DOX+Scramble siRNA 损伤组 (DOX-Scramble siRNA)、FNDC5+Scramble siRNA 保护组 (DOX-FNDC5-Scramble siRNA)、DOX+KLF4 siRNA 组 (DOX-KLF4 siRNA)、DOX+FNDC5+KLF4 siRNA 组 (DOX-FNDC5-KLF4 siRNA),并检测 ROS 生成量、Western Blot 检测线粒体功能及心肌成纤维细胞纤维化标志蛋白的表达等试验方法,观察 FNDC5 处理对 DOX 诱导的心肌细胞毒性的作用机制。**结果:**体外研究表明,与 CON 组细胞相比,DOX 处理后可显著抑制 ATP 生成,而细胞凋亡率显著增加、同时线粒体自噬过度激活 (BNIP3、Atg5 及 LC3 的蛋白表达量明显增加)、细胞纤维化标志蛋白 (Collagen I、 $\alpha$ -SMA) 的表达量显著增加,而 FNDC5 处理后可显著逆转 DOX 诱导的心肌细胞损伤。进一步的研究证实, FNDC5 通过激活 KLF4 而抑制 BNIP3 介导的线粒体自噬,保护线粒体功能及降低纤维化。然而, FNDC5 对 BNIP3 介导的线粒体自噬的抑制作用可被 KLF4 siRNA 部分抵消,细胞纤维化蛋白表达增加。**结论:** FNDC5 通过激活 KLF4 信号而抑制 BNIP3 介导的线粒体过度自噬,保护线粒体功能及降低纤维化蛋白的表达,进而缓解 DOX 导致的心肌细胞毒性。

**关键词:** FNDC5; Krüppel 样因子 4; 线粒体自噬; 纤维化; 心肌毒性**中图分类号:** R-33; Q244; R54; R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2021)11-2012-06

## Protective Role of FNDC5 Against Doxorubicin-induced Cardiotoxicity via KLF4-BNIP3 Signaling Pathway\*

LU Lin-he<sup>1</sup>, MA Ji-peng<sup>1</sup>, TANG Jia-you<sup>1</sup>, LI Lan-lan<sup>1</sup>, JIN Ping<sup>1</sup>, LIU Yang<sup>1</sup>, YANG Li-fang<sup>2</sup>, YANG Jian<sup>1Δ</sup>

(1 Department of Cardiovascular Surgery, Xijing Hospital, Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Department of Anesthesiology, Xi'an Children's Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710003, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate whether FNDC5 (Irisin) could inhibit BNIP3-mediated mitophagy to protect mitochondrial function and reduce cardiomyocyte fibrotic protein expressions via activating KLF4, and clarify the protective mechanism of irisin against DOX-induced cardiotoxicity. **Methods:** Cardiac fibroblasts (CFs) cells were randomly divided into the following groups: Control group (CON), FNDC5 treatment group (FNDC5), DOX-induced cardiotoxicity group (DOX), FNDC5 protection group (DOX-FNDC5), DOX+Scramble siRNA group (DOX-Scramble siRNA), FNDC5+Scramble siRNA group (DOX-FNDC5-Scramble siRNA), DOX + KLF4 siRNA group (DOX-KLF4 siRNA), DOX + FNDC5 + KLF4 siRNA group (DOX-FNDC5-KLF4 siRNA). Western blot and ROS detection were used to examine the mitochondrial function and cardiomyocyte fibrotic protein levels. TUNEL staining was used to determine the apoptotic rate of CFs cells. **Results:** Compared with the CON group, DOX treatment significantly decreased ATP content and cell apoptosis rate was increased while the mitophagy was significantly activated manifested by the increased of BNIP3, ATG5 and LC3 protein expressions. Furthermore, cardiomyocyte fibrotic protein expressions (collagen I and  $\alpha$ -SMA) was significantly increased, while FNDC5 treatment dramatically reversed DOX-induced cardiotoxicity. Our further study confirmed that FNDC5 inhibits BNIP3 mediated mitophagy to protect mitochondrial function and reduce cardiomyocyte fibrotic protein expressions by activating KLF4 signaling. Nevertheless, the protective role of FNDC5 was abolished by KLF4 siRNA treatment. **Conclusions:** FNDC5 inhibited BNIP3 mediated mitophagy by activating KLF4 signal, and reduced cardiomyocyte fibrotic protein expressions, thus alleviating DOX-induced cardiotoxicity.

**Key words:** FNDC5; Krüppel like factor 4; Mitophagy; Fibrosis; Cardiotoxicity**Chinese Library Classification (CLC):** R-33; Q244; R54; R285.5 **Document Code:** A**Article ID:** 1673-6273(2021)11-2012-06

\* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81774415; 81600295; 81600240; 81870216); 西京医院学科助推计划项目 (XJZT18MJ14)

作者简介: 卢林鹤 (1986-), 男, 硕士研究生, 主要研究方向: 心肌保护, E-mail: linhe.lu@hotmail.com

Δ 通讯作者: 杨剑 (1975-), 男, 博士生导师, 副教授, 主要研究方向: 心衰及心肌保护,

E-mail: yangjian1212@hotmail.com, 电话: 029-84775314

(收稿日期: 2020-11-23 接受日期: 2020-12-18)

## 前言

阿霉素(Doxorubicin, DOX)作为一种高效的抗肿瘤药物,常用于多种癌症的治疗,然而临床应用往往受到其剂量依赖的心脏毒性的限制<sup>[1-4]</sup>。心肌纤维化及左室舒张功能障碍是其重要的病理改变<sup>[5,6]</sup>,终末期可发展为扩张型心肌病甚至心力衰竭。虽然已知 DOX 引起的心脏毒性与线粒体功能失衡、ROS 生成及心肌纤维化等病理进程密切相关<sup>[7-10]</sup>,但其分子机制尚未完全阐明。

最新研究表明,针对缓解心肌细胞线粒体稳态失衡的治疗策略可显著缓解 DOX 引起的心肌细胞凋亡等病理损伤<sup>[11,12]</sup>。大量研究证实, BNIP3 (CL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3) 的磷酸化激活对心肌细胞损伤的病理进程至关重要<sup>[13]</sup>, 然而其过度激活可对心肌细胞产生不可逆的损伤, 抑制 BNIP3 的过度激活可显著保护线粒体功能及抵抗 DOX 引起的心肌细胞毒性<sup>[14]</sup>。

FNDC5/Irisin 是一种过氧化物酶体增殖激活受体 $\gamma$  协同激活因子 1 $\alpha$  依赖性激动蛋白,对 DOX 心肌毒性、心肌缺血再灌注损伤(MI/R)及心肌肥厚等多种心脏疾病具有明确的保护作用<sup>[15-18]</sup>。研究证实, FNDC5 可通过维持线粒体稳态及减少心肌细胞凋亡而缓解 MI/R 损伤<sup>[15,19]</sup>。此外, FNDC5 还可显著降低心肌纤维化以保护心肌细胞抵抗病理性肥厚损伤<sup>[20]</sup>。KLF4 (Krüppel-like factor 4) 作为一种锌指蛋白转录因子,其缺失常伴随线粒体功能异常及心肌纤维化甚至心力衰竭<sup>[21,22]</sup>。然而, FNDC5 是否可通过激活 KLF4 而下调 BNIP3 介导的线粒体自噬,保护线粒体功能及降低心肌细胞纤维化蛋白的表达,并明确其在 DOX 导致的心肌细胞毒性中的保护作用机制,为临床 DOX 应用所致扩张型心肌病提供治疗策略。

本研究拟采用心肌成纤维细胞建立 DOX 心肌细胞毒性模型,深入研究 FNDC5 是否通过激活 KLF4 而抑制 BNIP3 介导的线粒体自噬,保护线粒体功能及降低心肌细胞纤维化蛋白的表达,并明确其在 DOX 导致的心肌细胞毒性中的保护作用机制,为临床 DOX 应用所致扩张型心肌病提供治疗策略。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

DMEM 培养基;胎牛血清;TUNEL 检测试剂盒(Roche, 美国); FNDC5(Cloud Clone 公司, 美国);anti-GAPDH 抗体(CM-C TAG 公司, 美国);anti-KLF4 抗体(ab106629, Abcam, 美国);anti-BNIP3 抗体(ab10433, Abcam, 美国);anti-ATG5 抗体(12994, Cell Signaling 公司, 美国);anti-LC3 抗体(3868, Cell Signaling 公司, 美国);anti-P62 抗体(39749, Cell Signaling 公司, 美国);anti-Beclin-1 抗体(3738, Cell Signaling 公司, 美国);anti-Collagen I 抗体(91144, Cell Signaling 公司, 美国);anti- $\alpha$ -SMA 抗体(ab5831, Abcam, 美国);KLF4 siRNA (Santa Cruz, 美国);CCK-8 细胞毒性检测试剂盒(上海七海复泰生物科技有限公司, 中国);辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠、山羊抗兔二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司, 中国)。

### 1.2 方法

1.2.1 心肌成纤维细胞分离 通过胶原酶消化法从 6-10 只成年雄性 C57BL/6J 小鼠(8 周)的心脏中分离出心脏成纤维细

胞,并在实验处理前进行富集培养<sup>[23]</sup>。随后,细胞在 37 °C 条件下,在含有 95 % 空气和 5 % CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱中培养 2 代,第 2-4 代细胞用于可用于实验研究。

1.2.2 模型建立及分组 FNDC5 溶解于缓冲液(20 mM Tris, 150 mM NaCl (pH 8.0)) 制成 100  $\mu$ M 储备液, DOX 溶解于 PBS 中制成 20 mM 储备液。为了验证 FNDC5 是否对 DOX 导致的心肌毒性具有保护作用, CFs 细胞被随机进行如下分组:

研究一:(I) 对照组 (CON): 以 DMEM 完全培养基培养 CFs 细胞;(II) FNDC5 处理组 (FNDC5): CFs 细胞用 5 nM FNDC5 预处理 2 h;(III) DOX 损伤组 (DOX): CFs 细胞用 1  $\mu$ M DOX 预处理 8 h;(IV) FNDC5 保护组 (DOX-FNDC5): CFs 细胞用 5 nM FNDC5 预处理 2 h 后换液,于 1  $\mu$ M DOX 培养液中处理 8 h。

研究二:(I) DOX 损伤组 (DOX-Scramble siRNA): CFs 细胞以 Scramble siRNA 及 1  $\mu$ M DOX 预处理 8 h;(II) FNDC5 保护组 (DOX-FNDC5-Scramble siRNA): CFs 细胞用 5 nM FNDC5 预处理 2 h 后换液,以 Scramble siRNA 及 1  $\mu$ M DOX 培养液中处理 8 h;(III) DOX+KLF4 siRNA 组 (DOX-KLF4 siRNA): CFs 细胞以 KLF4 siRNA 及 1  $\mu$ M DOX 共同处理 8 h;(IV) DOX+FNDC5+KLF4 siRNA 组 (DOX-FNDC5-KLF4 siRNA): CFs 细胞用 5 nM FNDC5 预处理 2 h 后换液,之后以 KLF4 siRNA 及 1  $\mu$ M DOX 共同处理 8 h。

1.2.3 CCK-8 法检测细胞活力 将 CFs 细胞以 10<sup>4</sup> 个/mL 接种于 96 孔板上,利用 5 nM FNDC5 和 1  $\mu$ M DOX 分别处理各组细胞,最后依次向每孔加入 CCK-8(上海七海复泰生物科技有限公司, 中国)反应液 10  $\mu$ L,恒温培养箱中避光培养 2 h,使用酶标仪(SpectraMax 公司, 美国)在 450 nm 波长处检测 OD 值。细胞活力%=(加药细胞 OD- 空白 OD)/(对照细胞 OD- 空白 OD) $\times$ 100%。

1.2.4 细胞凋亡检测 细胞凋亡检测按照 TUNEL 原位细胞凋亡检测试剂盒的操作说明进行。各组 CFs 细胞用 PBS 清洗 3 次,每次 5 min,然后加入 4%多聚甲醛室温固定 30 min。再加入 0.1%的 Triton X-100 处理 10 min, PBS 清洗 3 次,每次 5 min,随后加入 TUNEL 反应液于 37 °C 避光孵育 90 min, PBS 清洗 3 次,每次 5 min,室温加入 DAPI 染细胞核 15 min, PBS 清洗 3 次,每次 5 min,最后用 50%甘油封片后在共聚焦显微镜下进行观察和拍照。凋亡率以随机选取 10 个视野的图片进行统计,以 TUNEL 染色阳性细胞数/DAPI 染色阳性细胞数 $\times$ 100%表示。

1.2.5 Western Blot 检测 收集处理的各组 CFs 细胞,加入 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白质,利用 BCA 定量试剂盒测定蛋白浓度,然后用 5X 上样缓冲液进行混匀煮沸。取 30-50  $\mu$ g 细胞总蛋白质利用 8-12% SDS-PAGE 凝胶进行分离,然后将其转移到 PVDF 膜。利用 5%脱脂牛奶室温封闭 2 h 后用 TBST 溶液清洗 3 次,每次 5 min。然后将 PVDF 膜放入一抗溶液在 4 °C 过夜孵育, TBST 室温清洗 3 次,每次 5 min。然后将 PVDF 膜与相应 HRP 偶联的二抗溶液在室温条件下孵育 1.5 h,再用 TBST 清洗 3 次,每次 5 min。加入鲁米诺发光液进行检测,并使用 Image Lab 软件对蛋白表达水平进行量化分析。

1.2.6 ROS 检测 用 DCFH-DA 法测定细胞内 ROS 水平。分离的细胞用 5  $\mu$ M DCFH-DA 在 DMEM 完全培养基中孵育

0.5 h, 用 PBS 清洗 3 次, 每次 5 min。最后用 M5 酶标仪在  $500\pm 15\text{nm}$  条件下进行检测。

**1.2.7 乳酸脱氢酶(LDH)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH)及 SOD 检测** 细胞凋亡或坏死会导致酶活性较为稳定的乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase, LDH)的释放。GSH-Px 及 SOD 是清除氧自由基的关键的抗氧化酶类, 对于抑制氧化应激尤为重要。各组细胞处理完后收集培养液, 按照操作说明检测 LDH 的释放(C0016, 碧云天, 中国)。收集各组细胞并裂解提取总蛋白质, 按照试剂盒的说明分别检测 SOD 活性(S0087, 碧云天, 中国)及 GSH-Px 的活性(S0056, 碧云天, 中国)。

**1.2.8 线粒体功能检测** 线粒体功能的检测主要是测定细胞内 ATP 的含量。首先利用线粒体分离试剂盒分离各组细胞线粒体(C3601, 碧云天, 中国), 然后用荧光素酶 ATP 检测试剂盒(S0026, 碧云天, 中国)测量细胞 ATP 含量。最后按照实验手册用酶标仪(SpectraMax 公司, 美国)检测结果。

### 1.3 统计学分析

所有统计分析均使用 GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software 公司, 美国)软件进行。本研究所有数据均以均值 $\pm$ SEM 表示, 通过单因素方差分析并比较差异, 其中  $P<0.05$  被认为具有显著统计学差异。

## 2 结果

### 2.1 FNDC5 处理可显著减轻 DOX 诱导的心肌细胞毒性

我们前期研究证实, 将 CFs 细胞以 5 nM FNDC5 预处理 2 小时, 可显著缓解 DOX( $1\ \mu\text{M}$ )诱导的细胞损伤<sup>[7]</sup>。如图 1 所示, 与 CON 组相比, FNDC5 预处理对 CFs 细胞活力无显著影响,  $1\ \mu\text{M}$  DOX 处理 8 小时后细胞活力显著降低( $P<0.05$ ), 而 5 nM FNDC5 预处理 2 小时可显著缓解 DOX 诱导的心肌细胞毒性, 增加细胞活力( $P<0.05$ )。这些结果说明 5 nM FNDC5 能够减轻 DOX 导致的心肌细胞损伤。

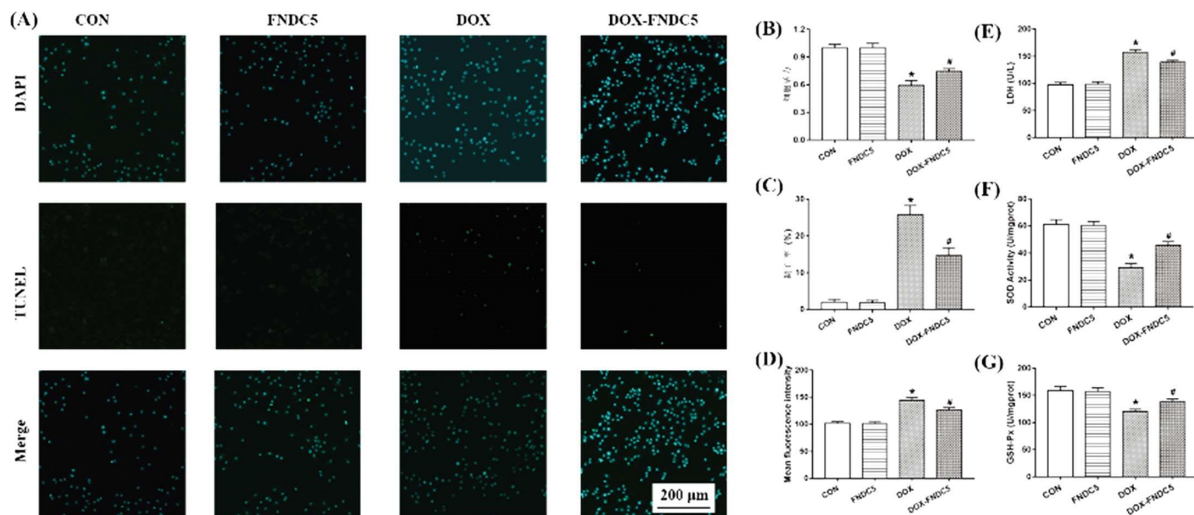


图 1 FNDC5 预处理可显著减轻 DOX 诱导的心肌细胞毒性

Fig. 1 FNDC5 treatment significantly alleviates DOX-induced cardiotoxicity

(A) Representative images of apoptotic cardiomyocytes and ROS levels. TUNEL: green fluorescence represents TUNEL-positive nuclei. DAPI: blue fluorescence represents total cardiomyocyte nuclei. ROS: Intracellular ROS fluorescence were stained by DCFH-DA. (B) Cell activity was examined by CCK-8 kit. (C) Cell apoptosis presented as the apoptotic index ( $\times 100\%$ ). (D) Bar graphs showing quantitative analysis of Mean Fluorescence Intensity (MFI) of DCFH-DA in CFs. (E) LDH level. (F) Cellular SOD activity. (G) GSH-Px activity. The results are presented as mean  $\pm$  S.E.M.,  $n=6-10$  in each group. \* $P<0.05$  vs. CON group, # $P<0.05$  vs. the DOX group.

### 2.2 FNDC5 预处理可显著降低细胞凋亡率及抑制 ROS 生成

如图 2 所示, 与 CON 组比较, 仅加入 FNDC5 后细胞凋亡率及 ROS 生成均无显著改变, 而 DOX 处理可显著增加 CFs 细胞凋亡率及促进 ROS 生成( $P<0.05$ )。FNDC5 预处理能够抑制 ROS 生成及降低细胞凋亡率, 缓解 DOX 诱导的心肌细胞毒性( $P<0.05$ )。

### 2.3 FNDC5 预处理可显著降低 LDH 水平并促进 SOD 及 GSH-Px 表达, 其保护作用可被 KLF4 siRNA 部分抵消

如图 3 所示, 与 CON 组相比, DOX 诱导可显著增加 LDH 含量并抑制 SOD 及 GSH-Px 表达( $P<0.05$ ), FNDC5 的加入部分逆转 DOX 引起的心肌细胞损伤, 而给予 KLF4 siRNA 处理部分抵消了 FNDC5 的保护作用( $P<0.05$ )。

### 2.4 FNDC5 预处理可抑制线粒体自噬的过度激活及降低心肌

### 细胞纤维化

我们进一步检测线粒体自噬及成纤维细胞纤维化蛋白的表达, 结果如图 4 所示, 与 CON 组相比, DOX 处理后 KLF4 表达显著减少, 线粒体自噬标志蛋白 BNIP3、ATG5 及 LC3 的表达显著上调, 同时心肌细胞纤维化标志蛋白 Collagen I 及  $\alpha$ -SMA 的表达也显著激活( $P<0.05$ )。而 FNDC5 预处理可上调 KLF4 的蛋白表达量, 并显著抑制 BNIP3 介导的线粒体自噬的过度激活和下调 ATG5、LC3 的表达, 此外心肌纤维化标志蛋白 Collagen I 及  $\alpha$ -SMA 的表达也显著降低( $P<0.05$ )。

### 2.5 FNDC5 通过上调 KLF4 信号抑制 BNIP3 介导的线粒体自噬并降低心肌纤维化

如图 3-4 所示, 与 DOX 组相比, KLF4 siRNA 处理后单位视野细胞数量相对减少, 细胞凋亡率显著增加并促进 ROS 生

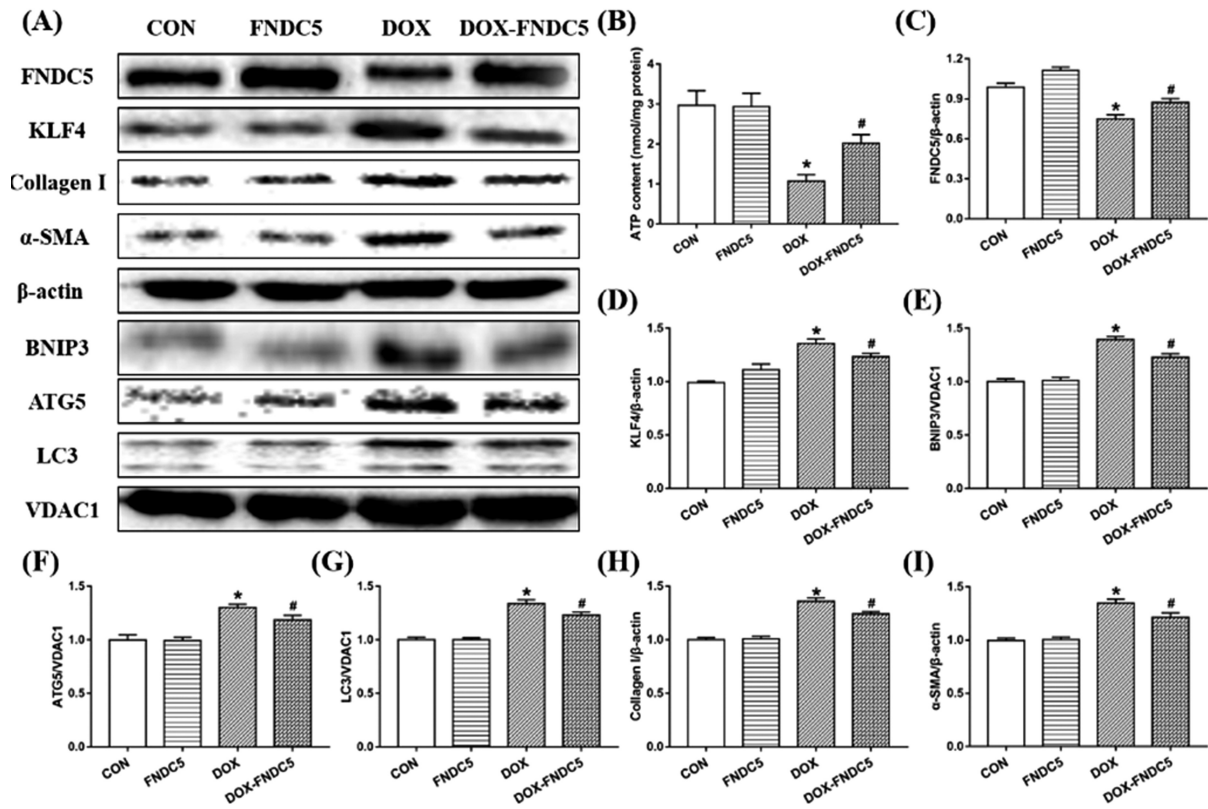


图2 FNDC5对CFs细胞中线粒体自噬及纤维化标志蛋白表达的影响

Fig. 2 FNDC5 alleviates mitophagy and inhibits myocardial fibrosis marker protein expression in CFs cells (A) Representative protein images by western blot from different groups. (B) represent ATP content in CFs cells. (C-I) Expression of FNDC5, KLF4, BNIP3, ATG5, LC3, Collagen I and  $\alpha$ -SMA protein. The results are presented as mean  $\pm$  S.E.M., n=6-10 in each group. \* $P$ <0.05 vs. CON group, # $P$ <0.05 vs. the DOX group.

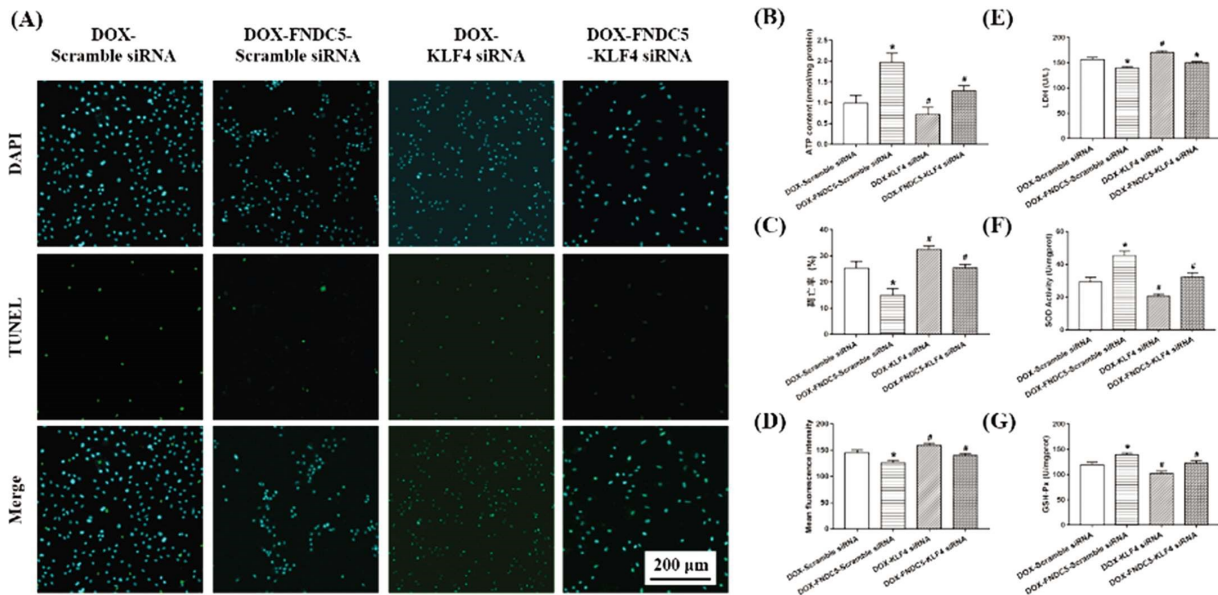


图3 FNDC5通过KLF4信号通路缓解DOX诱导的心肌细胞毒性

Fig. 3 FNDC5 protectd CFs cells against DOX-induced cardiotoxicity by reducing apoptosis and ROS production via the KLF4 signaling pathway (A) Representative images of apoptotic cardiomyocytes and ROS levels. TUNEL: green fluorescence represents TUNEL-positive nuclei. DAPI: blue fluorescence represents total cardiomyocyte nuclei. ROS: Intracellular ROS fluorescence were stained by DCFH-DA. (B) ATP content. (C) Cell apoptosis presented as the apoptotic index ( $\times 100\%$ ). (D) Bar graphs showing quantitative analysis of Mean Fluorescence Intensity (MFI) of DCFH-DA in CFs. (E) LDH level. (F) Cellular SOD activity. (G) GSH-Px activity. The results are presented as mean  $\pm$  S.E.M., n=3-6 in each group.

\* $P$ <0.05 vs. the DOX-Scramble siRNA group, # $P$ <0.05 vs. the DOX-FNDC5-Scramble siRNA group.

成,而加入 FNDC5 后可部分缓解 KLF siRNA 导致的心肌细胞凋亡及减少 ROS 生成( $P$ <0.05)。我们对线粒体自噬及心肌纤

维化标志蛋白的检测发现,KLF4 siRNA 处理进一步促进 BNIP3 介导的线粒体自噬的过度激活,增加 ATG5 及 LC3 蛋

白的表达, 心肌纤维化标志蛋白 Collagen I 及  $\alpha$ -SMA 的表达也显著上调, FNDC5 预处理可通过抑制线粒体自噬及降低心

肌细胞纤维化, 缓解 DOX 导致的心肌细胞损伤。而 FNDC5 的保护作用可被 KLF4 siRNA 部分抵消 ( $P < 0.05$ )。

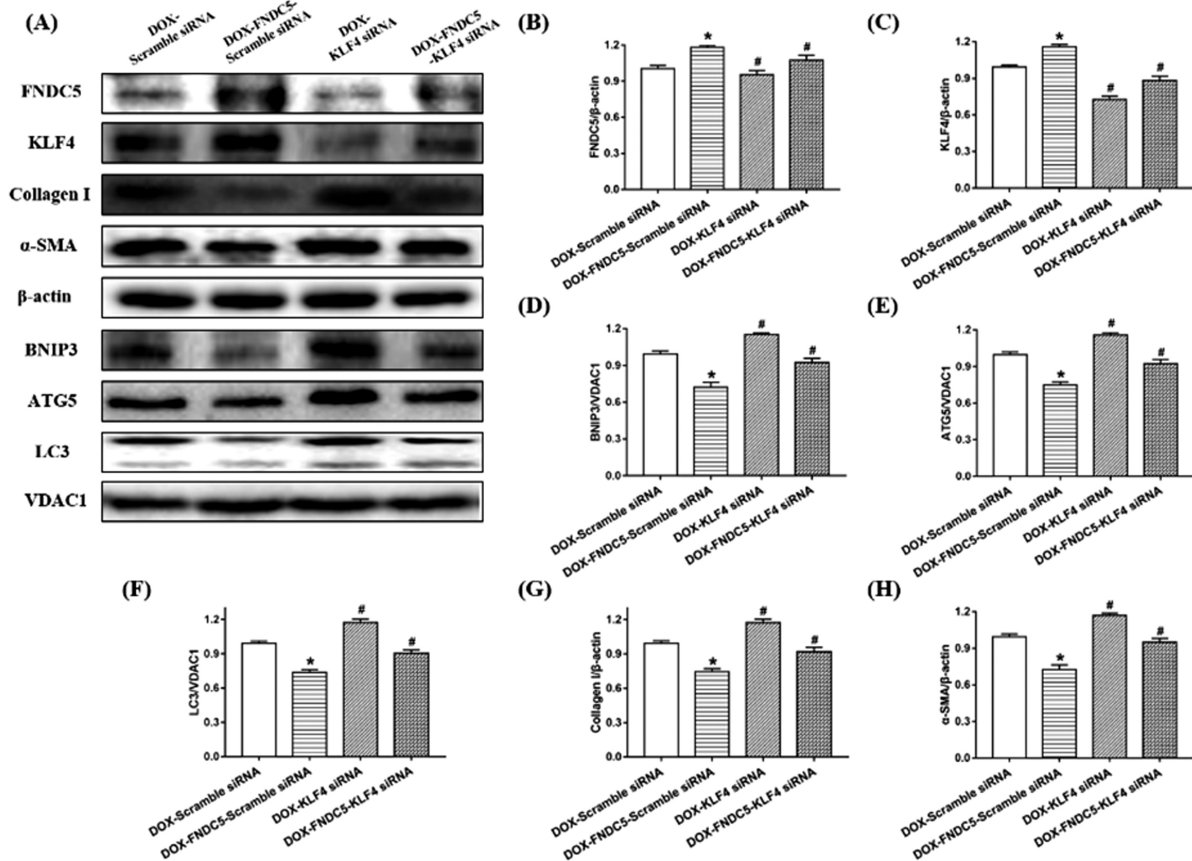


图 4 FNDC5 通过激活 KLF4 信号抑制 BNIP3 介导的线粒体自噬的异常激活及降低心肌纤维化, 缓解 DOX 诱导的心肌细胞毒性  
Fig. 4 FNDC5 attenuates BNIP3-mediated mitophagy and reducing myocardial fibrosis by activating of KLF4 signaling pathway in DOX-induced cardiotoxicity

(A) Representative protein images by western blot from different groups. (B-H) Expression of FNDC5, KLF4, BNIP3, ATG5, LC3, Collagen I and  $\alpha$ -SMA protein. The results are presented as mean  $\pm$  S.E.M., n=3-6 in each group.  
\* $P < 0.05$  vs. the DOX-Scramble siRNA group, # $P < 0.05$  vs. the DOX-FNDC5-Scramble siRNA group.

### 3 讨论

本研究通过建立 DOX 诱导的离体 CFs 心肌细胞毒性模型, 研究了 FNDC5 在其中的保护作用。结果发现, FNDC5 可通过上调 KLF4 信号抑制 BNIP3 介导的线粒体自噬的过度激活和降低心肌细胞纤维化相关蛋白的表达, 从而减轻 DOX 诱导的心肌细胞损伤。

前人的研究发现, FNDC5 是由一种含有纤连蛋白结构域蛋白质 5 水解产生的分泌蛋白<sup>[24]</sup>, 在骨骼肌、心包、心脏及大脑中高度表达<sup>[25]</sup>。研究发现, DOX 损伤的小鼠心脏和心肌细胞中 FNDC5 的表达下调。离体实验进一步证实, FNDC5 缺失导致细胞氧化应激损伤和凋亡显著增加, 反之, FNDC5 过表达则可通过 AKT/GSK3 $\beta$ /FYN/Nrf2 信号轴显著减轻 DOX 诱导的氧化应激损伤及细胞凋亡<sup>[26]</sup>。FNDC5 还可通过激活 OPA1 诱导的线粒体自噬保护线粒体功能及维持心肌细胞活力, 抵抗 MI/R 损伤<sup>[19]</sup>。此外, 在血管紧张素 II 诱导的左室肥厚病理模型的研究中发现, FNDC5 可通过抑制促纤维化信号 TGF- $\beta$ 1-Smad2/3 和成纤维细胞 - 肌成纤维细胞转换, 降低心肌纤维化<sup>[20]</sup>。而 FNDC5 是否通过维持线粒体稳态及减少纤维

化蛋白的表达, 进而缓解 DOX 诱导的心肌毒性尚未报道。我们的离体研究证实, 与对照组比较, DOX 处理显著上调 CFs 细胞中线粒体自噬标志蛋白 BNIP3、ATG5 及 LC3 蛋白的表达和纤维化标志蛋白 Collagen I 及  $\alpha$ -SMA 的表达, 而 FNDC5 预处理可通过下调 BNIP3、ATG5、LC3、Collagen I 及  $\alpha$ -SMA 的蛋白表达量, 抑制线粒体自噬的过度激活及降低心肌细胞纤维化蛋白的表达, 减轻 DOX 诱导的心肌细胞损伤。

KLF4 在多种心血管疾病中具有明确的保护作用<sup>[21,27]</sup>, 其分子机制与线粒体的稳态密切相关。既往研究发现, KLF4 缺失的小鼠在建立主动脉弓缩窄 (TAC) 模型后, 心肌组织的 ROS 产生显著增加, 线粒体形态异常及线粒体功能受损, 而 KLF4 通过抑制 ROS 生成调控线粒体自噬, 维持线粒体结构及功能稳态, 进而改善心脏功能<sup>[28]</sup>。然而, KLF4 调控的线粒体自噬在 FNDC5 对抗 DOX 导致的心肌细胞损伤中的作用仍未阐明。我们的研究发现, DOX 诱导的 CFs 细胞中 KLF4 的蛋白表达量显著降低, 抑制 KLF4 活性进一步促进 BNIP3 介导的线粒体自噬的过度激活, 导致线粒体功能紊乱, 而 FNDC5 预处理可缓解 KLF4 缺失导致的线粒体功能紊乱。此外, KLF4 的缺失与心肌肥厚导致的心肌纤维化密切相关<sup>[29,30]</sup>, 而我们研究证实, 抑制

KLF4 活性可显著增加心肌细胞纤维化相关蛋白的表达, FNDC5 可通过降低心肌细胞纤维化相关蛋白的表达, 减缓 DOX 导致的心肌细胞毒性。

综上所述, 本研究证实 FNDC5 可缓解 DOX 诱导的心肌细胞毒性。其具体的保护机制是通过激活 KLF4 信号, 抑制 BNIP3 介导的线粒体自噬的过度激活, 维持线粒体功能稳态并降低心肌细胞纤维化蛋白的表达和细胞凋亡。因此, 上调 FNDC5 的表达, 激活 KLF4 信号并抑制线粒体自噬的过度激活, 维持线粒体功能及降低心肌细胞纤维化相关蛋白的表达是降低 DOX 心肌毒性的潜在治疗策略, 是临床缓解 DOX 应用所致扩张型心肌病的潜在治疗靶点。

#### 参考文献(References)

- [1] Gupta S K, Garg A, Bar C, et al. Quaking Inhibits Doxorubicin-Mediated Cardiotoxicity Through Regulation of Cardiac Circular RNA Expression[J]. *Circ Res*, 2018, 122(2): 246-254
- [2] Prathumsap N, Shinlapawittayatorn K, Chattipakorn S C, et al. Effects of doxorubicin on the heart: From molecular mechanisms to intervention strategies[J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 866: 172818
- [3] Lodi M, Priksz D, Fulop G A, et al. Advantages of prophylactic versus conventionally scheduled heart failure therapy in an experimental model of doxorubicin-induced cardiomyopathy [J]. *J Transl Med*, 2019, 17(1): 229
- [4] Gorini S, De Angelis A, Berrino L, et al. Chemotherapeutic Drugs and Mitochondrial Dysfunction: Focus on Doxorubicin, Trastuzumab, and Sunitinib[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 7582730
- [5] Lee P J, Rudenko D, Kuliszewski M A, et al. Survivin gene therapy attenuates left ventricular systolic dysfunction in doxorubicin cardiomyopathy by reducing apoptosis and fibrosis [J]. *Cardiovasc Res*, 2014, 101(3): 423-33
- [6] Xia Y, Chen Z, Chen A, et al. LCZ696 improves cardiac function via alleviating Drp1-mediated mitochondrial dysfunction in mice with doxorubicin-induced dilated cardiomyopathy [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2017, 108: 138-148
- [7] Sciarretta S, Maejima Y, Zablocki D, et al. The Role of Autophagy in the Heart[J]. *Annu Rev Physiol*, 2018, 80: 1-26
- [8] Burridge P W, Li Y F, Matsa E, et al. Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes recapitulate the predilection of breast cancer patients to doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. *Nat Med*, 2016, 22(5): 547-56
- [9] Chen X, Feng J Y, Ma J P, et al. Experimental study on the effect of tetrahydrocurcumin on cardiotoxicity induced by doxorubicin [J]. *Chinese Journal of Extracorporeal Circulation*, 2019, 17(06): 369-374
- [10] Fang X, Wang H, Han D, et al. Ferroptosis as a target for protection against cardiomyopathy [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116(7): 2672-2680
- [11] Catanzaro M P, Weiner A, Kaminaris A, et al. Doxorubicin-induced cardiomyocyte death is mediated by unchecked mitochondrial fission and mitophagy[J]. *FASEB J*, 2019, 33(10): 11096-11108
- [12] Wu S s, Jiang W. Roles of Sirt1 and Sirt3 in doxorubicin-induced heart injury[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2019, 31(07): 665-670
- [13] Jin Q, Li R, Hu N, et al. DUSP1 alleviates cardiac ischemia/reperfusion injury by suppressing the Mff-required mitochondrial fission and Bnip3-related mitophagy via the JNK pathways [J]. *Redox Biol*, 2018, 14: 576-587
- [14] Dhingra R, Margulets V, Chowdhury S R, et al. Bnip3 mediates doxorubicin-induced cardiac myocyte necrosis and mortality through changes in mitochondrial signaling [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(51): E5537-44
- [15] Wang H, Zhao Y T, Zhang S, et al. Irisin plays a pivotal role to protect the heart against ischemia and reperfusion injury [J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232(12): 3775-3785
- [16] Li R L, Wu S S, Wu Y, et al. Irisin alleviates pressure overload-induced cardiac hypertrophy by inducing protective autophagy via mTOR-independent activation of the AMPK-ULK1 pathway [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018, 121: 242-255
- [17] Lu L, Ma J, Li L et al. Protective role of irisin against doxorubicin cardiotoxicity injury via PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Chinese Heart Journal*, 2019, 31(6):648-653
- [18] Gao F, Shu z. Heart failure and irisin [J]. *Journal of Clinical Cardiology*, 2019, 35(11): 1050-1053
- [19] Xin T, Lu C. Irisin activates Opal-induced mitophagy to protect cardiomyocytes against apoptosis following myocardial infarction [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(5): 4474-4488
- [20] Chen R R, Fan X H, Chen G, et al. Irisin attenuates angiotensin II-induced cardiac fibrosis via Nrf2 mediated inhibition of ROS/TGFbeta1/Smad2/3 signaling axis[J]. *Chem Biol Interact*, 2019, 302: 11-21
- [21] Jang C, Arany Z. Mitochondria Cripple without Kruppel [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2015, 26(11): 587-589
- [22] Zhao X, Xia S, Sun P, et al. miR-26 inhibit atrial fibrillation susceptibility and atrial fibrosis via targeting the angII/KLF4/TGF-β pathway[J]. *Journal of Clinical Cardiology*, 2019, 35(06): 549-554
- [23] Piccoli M T, Gupta S K, Viereck J, et al. Inhibition of the Cardiac Fibroblast-Enriched lncRNA Meg3 Prevents Cardiac Fibrosis and Diastolic Dysfunction[J]. *Circ Res*, 2017, 121(5): 575-583
- [24] Polyzos S A, Kountouras J, Shields K, et al. Irisin: a renaissance in metabolism?[J]. *Metabolism*, 2013, 62(8): 1037-44
- [25] Wrann C D, White J P, Salogiannis J, et al. Exercise induces hippocampal BDNF through a PGC-1alpha/FNDC5 pathway [J]. *Cell Metab*, 2013, 18(5): 649-59
- [26] Zhang X, Hu C, Kong C Y, et al. FNDC5 alleviates oxidative stress and cardiomyocyte apoptosis in doxorubicin-induced cardiotoxicity via activating AKT[J]. *Cell Death Differ*, 2020, 27(2): 540-555
- [27] Xu Y, Luo Y, Liang C, et al. LncRNA-Mhrt regulates cardiac hypertrophy by modulating the miR-145a-5p/KLF4/myocardin axis [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2020, 139: 47-61
- [28] Liao X, Zhang R, Lu Y, et al. Kruppel-like factor 4 is critical for transcriptional control of cardiac mitochondrial homeostasis[J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(9): 3461-76
- [29] Zhang Y, Wang Y, Liu Y, et al. Kruppel-like factor 4 transcriptionally regulates TGF-beta1 and contributes to cardiac myofibroblast differentiation[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e63424
- [30] Liao X, Haldar S M, Lu Y, et al. Kruppel-like factor 4 regulates pressure-induced cardiac hypertrophy[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2010, 49(2): 334-8