DOI: 10.14188/j.1671-8852.2024.0219　　**文章编号** 1671-8852(2025)07-0829-07

LAPTM5通过抑制铁死亡改善阿霉素诱导的心肌细胞损伤

张亚丹[1,2]　肖　杨[1,2]　姚　琪[1,2]　余嘉彬[1,2]　唐其柱[1,2]
[1]武汉大学人民医院心血管内科　湖北　武汉　430060；
[2]代谢与相关慢病湖北省重点实验室　湖北　武汉　430060

摘要　**目的**：研究溶酶体相关跨膜蛋白5(LAPTM5)对阿霉素(DOX)诱导的心脏毒性的作用及机制。**方法**：体外构建DOX损伤模型，将H9C2心肌细胞随机分为SiRNA-NC组，Si-LAPTM5组，SiRNA-NC+DOX组，Si-LAPTM5+DOX组4组。使用LiPo6000™转染试剂将SiRNA-NC(50 nmol•L^{-1})、Si-LAPTM5(50 nmol•L^{-1})病毒分别转染至H9C2心肌细胞，转染4 h后，使用1 μmol•L^{-1} DOX或等体积PBS刺激24 h构建心肌细胞损伤模型。采用Western Blot检测LAPTM5蛋白表达量，确认LAPTM5成功敲低，然后使用LDH及CK-MB试剂盒检测心肌细胞损伤情况，使用CCK-8试剂盒检测细胞存活率，TUNEL法检测心肌细胞凋亡水平；用DCFH-DA探针法和MDA、NADPH、SOD试剂盒检测氧化应激水平。采用Western Blot检测SLC7A11、GPX4、Ferritin等铁死亡相关蛋白的表达水平。**结果**：Si-LAPTM5转染后，细胞中LAPTM5表达量下降约75%($P<0.05$)。DOX刺激可诱导心肌细胞损伤，使细胞LDH及CK-MB水平升高、存活率降低($P<0.05$)，细胞凋亡增加。抑制LAPTM5表达可进一步加重DOX诱导的心肌细胞损伤($P<0.05$)。LAPTM5主要通过调节铁死亡发挥上述作用，DOX刺激明显上调细胞内Fe^{2+}含量和细胞膜上转铁蛋白TFR1水平，抑制LAPTM5会加剧细胞内Fe^{2+}蓄积，并进一步上调TFR1水平。DOX处理明显增加细胞氧化应激标志物的水平(ROS、脂质过氧化、MDA、NADPH酶活力)并降低SOD活性($P<0.05$)，而抑制LAPTM5表达进一步恶化了DOX诱导的氧化应激($P<0.05$)。DOX刺激后铁死亡相关蛋白SLC7A11、GPX4表达水平下降，Ferritin表达水平升高($P<0.05$)，抑制LAPTM5表达导致SLC7A11、GPX4蛋白表达水平进一步下降，Ferritin蛋白水平进一步升高。**结论**：LAPTM5通过抑制铁死亡改善DOX诱导的心肌细胞毒性。

关键词　溶酶体相关跨膜蛋白5；阿霉素；氧化应激；凋亡；铁死亡
中图分类号　R54
文献标识码　A　　**开放科学(资源服务)标识码(OSID)：**

LAPTM5 protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity by inhibiting ferroptosis

ZHANG Yadan[1,2], XIAO Yang[1,2], YAO Qi[1,2], YU Jiabin[1,2], TANG Qizhu[1,2]
[1]Dept. of Cardiovascular Medicine, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei, China;
[2]Hubei Provincial Key Laboratory of Metabolism and Related Chronic Diseases, Wuhan 430060, Hubei, China

Abstract

Objective: To investigate the effects and mechanism of lysosomal-associated protein transmembrane 5 (LAPTM5) in doxorubicin (DOX)-induced cardiotoxicity. **Methods:** H9C2 cardiomyocytes were cultured *in vitro* and randomly divided into the SiRNA-NC group, Si-LAPTM5 group, SiRNA-

课题来源：国家自然科学基金区域创新发展联合基金项目(编号：U22A20269)
作者简介：张亚丹，女，1999—，医学硕士生，主要从事心血管疾病的研究，E-mail：zhangyadan@whu.edu.cn
通信作者：唐其柱，男，1963—，医学博士，教授，主任医师，博士生导师，主要从事心血管及慢性疾病的研究，E-mail：qztang@whu.edu.cn

NC+DOX group, and Si-LAPTM5+DOX group. SiRNA-NC (50 nmol•L^{-1}) and Si-LAPTM5 (50 nmol•L^{-1}) were transfected into H9C2 cardiomyocytes using LiPo6000^{TM} transfection reagent for 4 h and then stimulated with 1 μmol•L^{-1} DOX or the same volume of PBS for 24 h. The successful knockdown of LAPTM5 was confirmed by Western Blot. Then, myocardial cell injury was detected by lactate dehydrogenase (LDH) and creatine kinase isoenzyme MB (CK-MB) assay kit. Cell viability was detected by the cell counting kit-8 (CCK-8) assay kit. The Fe^{2+} levels were measured with a FerroOrange assay kit. The level of TFR1 was detected by immunofluorescence. The level of oxidative stress was evaluated by 2′, 7′dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA), malondialdehyde (MDA) assay kit, NADPH oxidase assay kit, and SOD assay kit. The protein expression levels of SLC7A11, GPX4, and Ferritin were detected by Western Blot. **Results:** After transfection with Si-LAPTM5, the expression of LAPTM5 in H9C2 cells decreased by about 75% ($P<0.05$). LAPTM5 knockdown in H9C2 cells deteriorated DOX-induced cell injury and cell apoptosis, which was represented by further increased LDH level and CK-MB level, decreased cell viability, and increased TUNEL-positive cells ($P<0.05$). Compared with the SiRNA-NC group, DOX increased the level of TFR1 and Fe^{2+}. Inhibition of LAPTM5 further increased the level of TFR1 and Fe^{2+}. Compared with the SiRNA-NC group, DOX increased reactive oxygen species (ROS) level, lipid peroxidation level, MDA content, and NADPH oxidase activity in H9C2 cardiomyocytes ($P<0.05$), which were aggravated by LAPTM5 knockdown($P<0.05$). Compared with the SiRNA-NC group, DOX decreased SOD activity, which was aggravated by LAPTM5 knockdown ($P<0.05$). Compared with the SiRNA-NC group, DOX decreased the expression levels of SLC7A11 and glutathione peroxidase 4 (GPX4) and increased the level of ferritin protein ($P<0.05$). Inhibition of LAPTM5 expression further decreased the expression levels of SLC7A11 and GPX4 and increased the level of ferritin protein. **Conclusion:** LAPTM5 has a protective effect on doxorubicin-induced cardiotoxicity, and the mechanism may be related to the inhibition of ferroptosis.

Key Words Lysosomal-Associated Protein Transmembrane 5; Doxorubicin; Oxidative Stress; Apoptosis; Ferroptosis

阿霉素(Doxorubicin,DOX)是一种来源于链霉菌属的高效抗肿瘤蒽环类抗生素,主要用于治疗血液系统恶性肿瘤、乳腺癌、卡波西肉瘤、骨肉瘤、儿童恶性肿瘤等[1]。然而,DOX对心肌细胞的剂量依赖性毒性作用也是一个值得关注的问题。当DOX的成人累积剂量超过400~700 mg•m^{-2},儿童累积剂量超过300 mg•m^{-2},可诱发充血性心力衰竭,这限制了DOX的广泛和长期应用[2]。尽管自噬、sirtuins蛋白家族的抑制、细胞凋亡、细胞坏死、细胞焦亡等多种机制被报道与DOX诱导的心脏毒性有关[3],但其确切机制及有效治疗措施仍有待进一步揭示。

溶酶体相关跨膜蛋白5(lysosomal-associated protein transmembrane 5,LAPTM5)是一种存在于造血组织中的溶酶体相关蛋白,主要表达于淋巴样和骨髓来源的细胞[4],在巨噬细胞的促炎通路和促炎细胞因子生成中发挥正调节作用[5]。研究[6]表明,抑制LAPTM5在心脏中表达可以通过抑制NF-κB通路的激活而抑制心肌梗死小鼠模型中的炎症反应。但是,LAPTM5是否在DOX诱导的心脏毒性中发挥作用,国内外尚未见报道,本研究旨在探讨LAPTM5在DOX诱导的心脏毒性的作用及机制,以期为临床防治DOX心脏毒性提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂材料 H9C2细胞购自中国科学院细胞库(中国上海);Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)培养基及胎牛血清(Fetal Bovine Serum,FBS)购自美国GIBCO公司;DOX购自北京索莱宝科技有限公司;CCK8检测试剂盒、ROS检测试剂盒、Tunel检测试剂盒、LDH检测试剂盒购自上海碧云天生物技术公司;NADPH氧化酶检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;NADPH氧化酶检测

试剂盒购自南京建成生物工程研究所；FerroOrange亚铁离子荧光探针购自上海集麒生物科技有限公司；PVDF膜购自美国Millipore公司，LAPTM5购自Abclonal公司，SLC7A11、GPX4、Ferritin、TFR1、GAPDH购自Abcam公司。

1.2　细胞模型建造与分组　H9C2心肌细胞使用含10%FBS的DMEM培养基于37 ℃、5%CO_2培养箱中培养，待细胞密度达70%～90%时按照1∶2的比例传代。H9C2的细胞损伤模型制造如下：使用锐博生物有限公司（广东，中国）的Si-LAPTM5病毒来敲低H9C2心肌细胞 *LAPTM5* 基因[5′-UAAUUCAUGUGGUUCAUGGAC-3′]，按照制造商的说明书，使用LiPo6000™转染试剂对不同组别细胞分别进行转染。1）SiRNA-NC组：按照50 nmol•L^{-1}的浓度转染SiRNA对照序列5′-TTCTCCGAACGTGTCACGTdTdT-3′，4 h后更换成完全培养基继续培养24 h，加入PBS继续培养24 h；2）Si-LAPTM5组：按照50 nmol•L^{-1}的浓度转染LAPTM5的SiRNA序列5′-UAAUUCAUGUGGUUCAUGGAC-3′，4 h后更换成完全培养基继续培养24 h，加入PBS继续培养24 h；3）SiRNA－NC＋DOX组：将SiRNA(50 nmol•L^{-1})转染至H9C2细胞4 h，更换成完全培养基培养24 h，然后加入DOX（1 μmol•L^{-1}）继续培养24 h；4）Si-LAPTM5＋DOX组：将Si-LAPTM5(50 nmol•L^{-1})转染至H9C2细胞4 h，更换成完全培养基培养24 h，然后加入DOX（1 μmol•L^{-1}）继续培养24 h。Western Blot检测细胞中LAPTM5蛋白是否成功敲低。

1.3　CCK-8检测细胞存活率　细胞接种于96孔板后，按照SiRNA-NC组、Si-LAPTM5组、SiRNA-NC＋DOX组、Si-LAPTM5＋DOX组作相应处理后，每孔加入10 μL CCK-8溶液，于37 ℃，5% CO_2培养箱中孵育2 h，使用酶标仪检测在450 nm处的吸光度值，用标准曲线法计算细胞存活率。

1.4　细胞LDH及CK-MB检测　细胞接种于96孔板中，经过上述分组处理后，弃去细胞培养液，加入150 μL用PBS稀释了10倍的试剂盒提供的LDH释放试剂，孵育1 h分别取各孔的上清液120 μL，加入到一新的96孔板中，每孔加入60 μL LDH检测工作液，混匀，室温避光孵育30 min，在490 nm处测定吸光度，根据标准曲线计算出样品中LDH酶活力。根据CK-MB检测试剂盒说明书加入相应工作液后，混匀，37 ℃孵育2 min，连续监测1～3 min吸光度变化，计算CK-MB活力。

1.5　DCFH-DA探针法检测ROS　按照1∶1 000用无血清培养基稀释DCFH-DA，使终浓度为10 μmol•L^{-1}，去除细胞培养液，加入500 μL稀释好的DCFH-DA，37 ℃细胞培养箱内孵育20 min，用PBS洗涤3次，倒置荧光显微镜拍摄图片并保存。

1.6　TUNEL染色　用PBS将处理好的H9C2细胞爬片洗涤1次，加用4%多聚甲醛固定30 min，PBS洗涤3次，每次5 min，加入含0.3%TritonX-100的PBS缓冲液，室温孵育5 min，PBS洗涤3次，加入50 μL TUNEL检测液，37 ℃避光湿盒孵育1 h，PBS洗涤3次，DAPI封片后使用倒置显微镜拍摄图片并保存。

1.7　Western Blot　按照上述方法处理细胞后，弃上清，PBS清洗1遍，使用RIPA裂解液冰上裂解细胞20 min，提取蛋白，进行BCA定量，通过聚丙烯凝胶进行电泳分离，转至PVDF膜上，室温封闭1 h，加入稀释好的LAPTM5、SLC7A11、GPX4、Ferritin、GAPDH一抗（一抗均使用1∶1 000稀释），4 ℃环境下孵育过夜，第2天使用二抗（1∶10 000）孵育1 h，洗膜后用ECL化学发光后成像系统采集图像。

1.8　MDA、NADPH氧化酶活性、SOD活性检测　将处理好的细胞按照MDA、NADPH、SOD检测试剂盒的说明书，将反应液与待测样品混合后，使用酶标仪测定各组样品吸光度值并计算含量或活力值。

1.9　脂质活性氧测定　将处理好的细胞，加入C11 BODIPY荧光探针孵育20 min之后，使用酶标仪测定各组样品荧光值。

1.10　细胞免疫荧光染色　将细胞接种于24孔板，对各组细胞进行相应处理，弃培养基，用PBS洗涤3次，使用4%多聚甲醛固定15 min，加入含0.2% Triton-100的PBS后放置摇床上，通透10 min，PBS洗涤3次，10%山羊血清封闭1 h，而后加入转铁蛋白TFR1抗体（1∶100）4 ℃过夜，次日37 ℃复温30 min后加入羊抗兔二抗（1∶200）室温避光孵育1 h，DAPI封片后使用荧光显微镜拍摄图片。

1.11　FerroOrange染色　将细胞接种于24孔板，按分组进行处理，加入浓度1 μmol•L^{-1}的FerroOrange工作液，孵育30 min后使用荧光显微镜拍摄图片。

1.12　统计学方法　采用GraphPad Prism 9.0软件分析，数据用均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，每组样本使用S-W检验，两组间样本比较采用t检验，多组间样本比较采用单因素方差分析，进一步比较采用Tukey检验。以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LAPTM5对DOX诱导的心肌细胞损伤影响

Western Blot结果表明，使用Si-LAPTM5转染H9C2心肌细胞使LAPTM5蛋白表达水平降低约75%($P<0.05$)(图1A)。与SiRNA-NC组相比，DOX处理的H9C2细胞心肌损伤标志物LDH、CK-MB水平明显升高($P<0.05$)，敲低LAPTM5明显加重DOX诱导的心肌损伤($P<0.05$)(图1B、图1D)。DOX刺激24 h后，H9C2心肌细胞活力明显降低，敲低LAPTM5可进一步降低细胞存活率($P<0.05$)(图1C)。

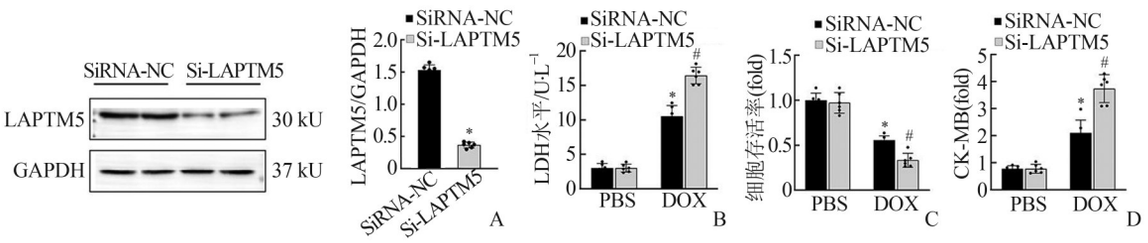


图1 各组心肌细胞损伤与凋亡情况

A. Si-LAPTM5及SiRNA-NC转染H9C2细胞，LAPTM5蛋白表达水平($n=6$)；B. 各组心肌细胞LDH水平($n=6$)；C. 各组心肌细胞存活率($n=6$)；D. 各组心肌细胞CK-MB水平($n=6$)。与SiRNA-NC+PBS组相比，$^{*}P<0.05$，与SiRNA-NC+DOX组相比，$^{\#}P<0.05$

2.2 LAPTM5对DOX诱导的心肌细胞凋亡的影响

TUNEL染色结果显示与SiRNA-NC组相比，SiRNA-NC+DOX组的心肌细胞凋亡水平显著升高($P<0.05$)；与SiRNA-NC+DOX组相比，Si-LAPTM5+DOX组心肌细胞凋亡水平明显增加($P<0.05$)(图2)。

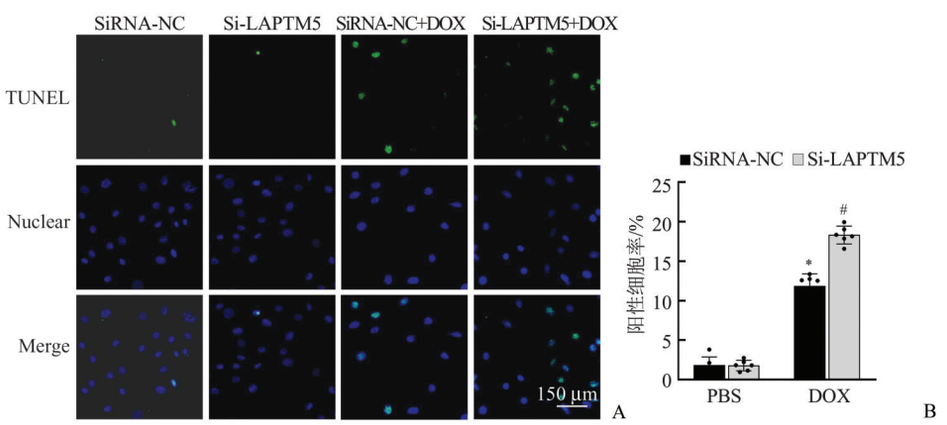


图2 各组心肌细胞凋亡情况

A. 各组心肌细胞TUNEL染色结果(放大倍数×200)；B. TUNEL染色法检测各组心肌细胞凋亡情况。与SiRNA-NC+PBS组相比，$^{*}P<0.05$；与SiRNA-NC+DOX组相比，$^{\#}P<0.05$，$n=6$

2.3 LAPTM5对DOX诱导心肌病中Fe^{2+}及转铁蛋白的影响

使用亚铁离子探针检测细胞中的Fe^{2+}水平，与SiRNA-NC组相比，SiRNA-NC+DOX组的心肌细胞铁蓄积显著升高($P<0.05$)；与SiRNA-NC+DOX组相比，Si-LAPTM5+DOX组心肌细胞的铁蓄积明显增加($P<0.05$)(图3A)。进一步探索LAPTM5对阿霉素诱导心肌病中TFR1表达水平的影响，细胞免疫荧光结果显示，与SiRNA-NC组相比，SiRNA-NC+DOX组的心肌细胞TFR1显著升高($P<0.05$)；与SiRNA-NC+DOX组相比，Si-LAPTM5+DOX组心肌细胞TFR1明显增加($P<0.05$)(图3B)。

2.4 LAPTM5对DOX诱导的心肌细胞氧化应激的影响

铁蓄积会增加细胞氧化应激水平，因此本研究进一步检测了细胞氧化应激水平。与SiRNA-NC组相比，SiRNA-NC+DOX组ROS水平、Lipid ROS水平、MDA含量、NADPH氧化酶活性显著升高($P<0.05$)，SOD活性显著降低($P<0.05$)；与SiRNA-NC+DOX组相比，Si-LAPTM5+DOX组ROS水平、Lipid ROS水平、MDA含量、NADPH氧化酶活性显著升高($P<0.05$)，而SOD活性进一步下降($P<0.05$)(图4)。这提示使用DOX刺激后细胞内氧化应激水平明显升高，敲低LAPTM5会加重H9C2心肌细胞氧化应激。

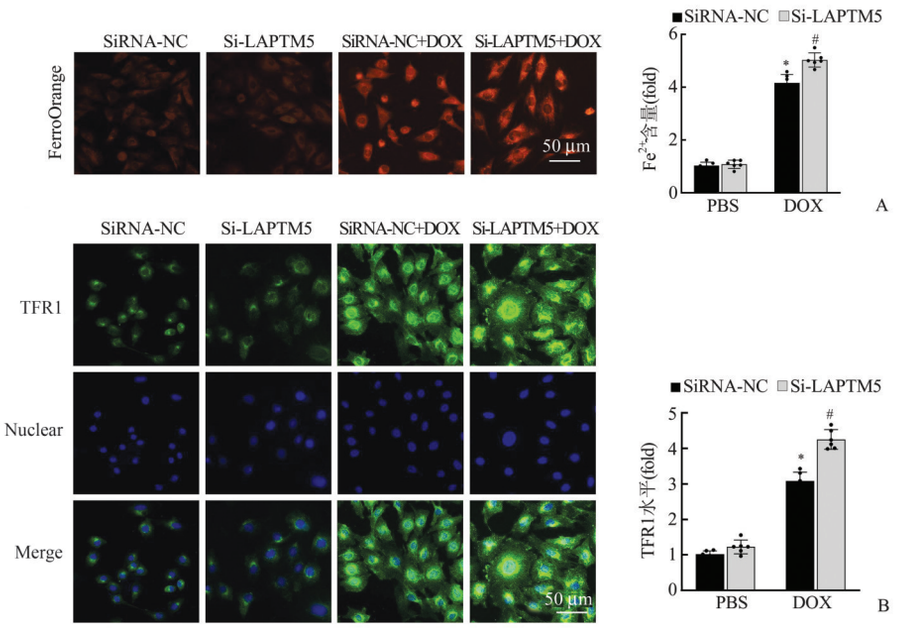


图 3　各组心肌细胞铁蓄积及转铁蛋白 TFR1 水平

A. 各组心肌细胞 FerroOrange 染色图像及细胞内 Fe^{2+} 的定量水平(n=6)(×200)；B. 各组心肌细胞免疫荧光染色图像及 TFR1 表达水平(n=6)(×200)。与 SiRNA-NC＋PBS 组相比，$^{*}P$<0.05；与 SiRNA-NC＋DOX 组相比，$^{\#}P$<0.05

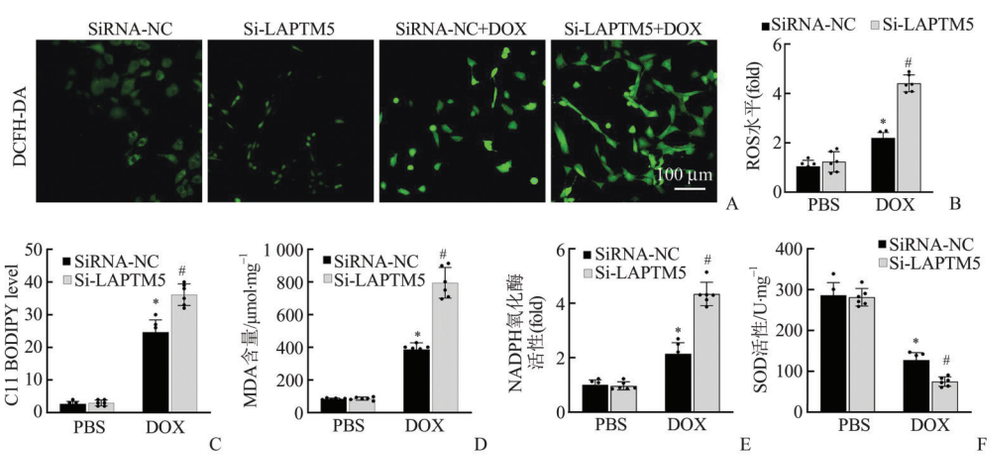


图 4　各组心肌细胞氧化应激水平

A. 各组心肌细胞 ROS 染色结果(×200)；B 各组心肌细胞 ROS 水平(n=6)；C. 各组心肌细胞脂质过氧化水平(n=6)；D. 各组心肌细胞 MDA 含量(n=6)；E. 各组心肌细胞 NADPH 氧化酶活性比较(n=6)；F. 各组心肌细胞 SOD 活性比较(n=6)。与 SiRNA-NC＋PBS 组相比，$^{*}P$<0.05；与 SiRNA-NC＋DOX 组相比，$^{\#}P$<0.05

2.5　LAPTM5 对 DOX 诱导的心肌病蛋白表达的影响

免疫印迹结果显示，与 SiRNA-NC 组相比，Si-LAPTM5 组 SLC7A11 蛋白表达水平降低(P<0.05)；与 SiRNA-NC 组相比，SiRNA-NC＋DOX 组的铁死亡相关蛋白 SLC7A11、GPX4 水平均发生显著下降，而 Ferritin 蛋白表达水平上升(P<0.05)；与 SiRNA-NC＋DOX 组相比，Si-LAPTM5＋DOX 组的 SLC7A11、GPX4 的蛋白表达水平下降，而 Ferritin 蛋白表达水平上升(P<0.05)(图 5)。

3　讨论

DOX 严重的剂量依赖性心脏毒性限制了其临床广泛应用，目前尚缺乏改善 DOX 所致心功能不全的有效治疗方法。因此，深入研究 DOX 心脏毒性的机制并探索新的治疗方案尤为重要。DOX 心脏毒性的潜在机制复杂且由多因素共同调节，包括多种信号分子和代谢途径调控，其中细胞凋亡和氧化应激被认为是 DOX 触发心肌细胞死亡的主要机制[8]。此外，线粒体功能受损、铁死亡、钙离子稳态失调、自

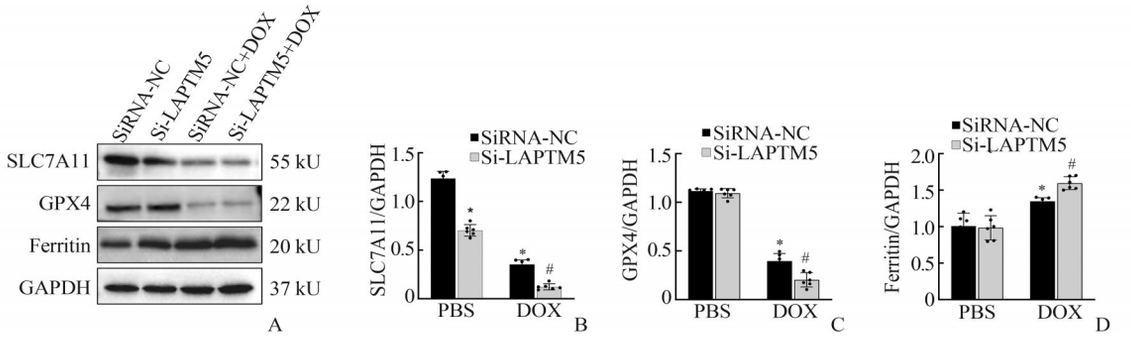


图5 各组心肌细胞SLC7A11、GPX4、Ferritin蛋白表达水平

A. Western Blot检测各组心肌细胞SLC7A11、GPX4、Ferritin蛋白表达情况(n=6);B. 各组心肌细胞SLC7A11的蛋白表达水平(n=6);C. 各组心肌细胞GPX4蛋白表达水平(n=6);D. 各组心肌细胞Ferritin蛋白表达水平(n=6)。与SiRNA-NC+PBS组相比,$^{*}P<0.05$;与SiRNA-NC+DOX组相比,$^{\#}P<0.05$

噬等也与DOX诱导的心脏毒性密切相关[9]。

LAPTM5是一种溶酶体蛋白,在淋巴和髓系来源的细胞中高度表达,在免疫细胞和炎症反应中发挥作用[10]。研究[11]发现,LAPTM5可促进溶酶体膜通透和溶酶体细胞死亡,从而诱导细胞凋亡。研究[12-13]表明LAPTM5在心脏中表达并参与心脑血管疾病多个信号通路的调节,包括核因子κB(NF-κB)、转化生长因子β(TGFβ)-Smads、磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)-AKT和MAPKs等。LAPTM5或可作为高血压左心室肥厚的潜在诊断标志物,与健康成人相比,左室肥厚的高血压患者血液中LAPTM5的表达量显著升高,且LAPTM5含量与左心室室壁厚度、QRS复合波和QTc间期呈正相关[14]。此外,LAPTM5可与Rac1直接结合,通过抑制MEK-ERK1/2通路改善压力负荷诱导的心肌肥厚和心力衰竭[15]。然而也有研究[6]表明,通过腺病毒注射敲低LAPTM5心脏表达可以通过抑制NF-κB通路的激活,显著抑制巨噬细胞活化和炎症反应,从而抑制心肌梗死导致的心肌纤维化和心功能损伤。但是LAPTM5在DOX诱导的心脏毒性中的具体作用尚不清楚,因此本研究使用Si-LAPTM5病毒敲低LAPTM5,进一步研究LAPTM5在DOX诱导的心脏毒性中的作用及机制。

DOX诱导的心脏毒性可以通过增加心肌组织内ROS的产生和脂质过氧化来表现[16]。过量的ROS可诱导脂质、蛋白质和DNA等生物大分子的氧化损伤,破坏细胞膜完整性和功能。此外,DOX诱导的氧化应激可通过内源性和外源性途径直接引起大量心肌细胞凋亡。本研究发现,DOX处理H9C2心肌细胞后,细胞损伤标志物LDH、CK-MB水平升高,细胞存活率明显下降,细胞凋亡增加。敲低LAPTM5会进一步升高LDH、CK-MB水平,降低细胞存活率,增加细胞凋亡。

铁死亡是一种新型的细胞程序性死亡方式,铁蛋白和ROS水平在调控铁死亡过程中起到至关重要的作用[17]。目前铁相关蛋白在铁死亡过程中的水平变化仍不明确。既往有研究[18]表明,铁死亡过程中,铁蛋白水平下降,TFR1表达增多。然而也有研究[19]表明,铁死亡中铁相关蛋白基因水平上调。还有研究[20]表明,铁死亡过程中,细胞中铁蛋白水平表达不变。本研究提示,DOX处理H9C2心肌细胞后,细胞内Fe^{2+}蓄积增加,转铁蛋白TFR1表达增加。敲低LAPTM5会进一步加剧细胞内Fe^{2+}蓄积及转铁蛋白TFR1的表达。进一步检测细胞氧化应激水平提示,DOX处理H9C2心肌细胞后,ROS水平、脂质过氧化水平、NADPH酶活性、MDA含量显著提升,SOD活性下降。敲低LAPTM5会进一步增加ROS水平、脂质过氧化水平、NADPH酶活性和MDA含量,并进一步降低SOD活性,上述数据提示LAPTM5可减少细胞损伤,降低DOX诱导的氧化应激水平。

GPX4是铁死亡的关键标志物,其含量降低会导致膜脂质过氧化物积累、氧化性脂质损伤以及铁死亡发生[21]。研究[22]表明,氧化应激可以通过GPX4和Bach1/HO-1依赖机制触发心肌细胞的铁死亡。为了进一步探索LAPTM5是否可以通过抑制铁死亡改善DOX诱导的心脏毒性,本研究通过Western Blot检测了阿霉素处理的H9C2心肌细胞中铁死亡相关蛋白的表达水平。结果发现,DOX处理后心肌细胞发生Ferritin蛋白水平升高,SLC7A11、GPX4表达水平显著下降,敲低LAPTM5会加重Ferritin蛋白水平升高,并使SLC7A11、GPX4蛋白水平进一步下降,这些数据说明DOX可诱导心肌细胞发生铁死亡,LAPTM5可

抑制 DOX 诱导心肌细胞发生铁死亡，从而对心肌细胞损伤起到保护作用。

综上所述，LAPTM5 可通过抑制铁死亡、抗氧化应激、抑制细胞凋亡从而抑制 DOX 诱导的心肌细胞损伤。然而本研究仅进行体外实验，尚未通过动物实验进一步验证，此外 LAPTM5 调控铁死亡的机制仍需进一步深入研究。LAPTM5 可能成为治疗 DOX 心脏毒性的新靶点。

参考文献

[1] DAMIANI R M, MOURA D J, VIAU C M, et al. Pathways of cardiac toxicity: Comparison between chemotherapeutic drugs doxorubicin and mitoxantrone[J]. Arch Toxicol, 2016, 90(9): 2063-2076.

[2] LI D L, HILL J A. Cardiomyocyte autophagy and cancer chemotherapy[J]. J Mol Cell Cardiol, 2014, 71: 54-61.

[3] DHINGRA R, RABINOVICH-NIKITIN I, ROTHMAN S, et al. Proteasomal degradation of TRAF2 mediates mitochondrial dysfunction in doxorubicin-cardiomyopathy[J]. Circulation, 2022, 146(12): 934-954.

[4] PAK Y, GLOWACKA W K, BRUCE M C, et al. Transport of LAPTM5 to lysosomes requires association with the ubiquitin ligase Nedd4, but not LAPTM5 ubiquitination[J]. J Cell Biol, 2006, 175(4): 631-645.

[5] WANG Y, LIU J, AKATSU C, et al. LAPTM5 mediates immature B cell apoptosis and B cell tolerance by regulating the WWP2-PTEN-AKT pathway[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2022, 119(36): e2205629119.

[6] SONG Z C, WANG X Z, HE L Q, et al. Suppression of lysosomal-associated protein transmembrane 5 ameliorates cardiac function and inflammatory response by inhibiting the nuclear factor-kappa B (NF-κB) pathway after myocardial infarction in mice[J]. Exp Anim, 2022, 71(4): 415-425.

[7] 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.

[8] KONG C Y, GUO Z, SONG P, et al. Underlying the mechanisms of doxorubicin-induced acute cardiotoxicity: Oxidative stress and cell death[J]. Int J Biol Sci, 2022, 18(2): 760-770.

[9] ABE K, IKEDA M, IDE T, et al. Doxorubicin causes ferroptosis and cardiotoxicity by intercalating into mitochondrial DNA and disrupting Alas1-dependent heme synthesis[J]. Sci Signal, 2022, 15(758): eabn8017.

[10] GLOWACKA W K, ALBERTS P, OUCHIDA R, et al. LAPTM5 protein is a positive regulator of proinflammatory signaling pathways in macrophages[J]. J Biol Chem, 2012, 287(33): 27691-27702.

[11] YANG X W, WEN Y, LIU S M, et al. *LCDR* regulates the integrity of lysosomal membrane by hnRNP K-stabilized *LAPTM5* transcript and promotes cell survival[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2022, 119(5): e2110428119.

[12] CHEN L, WANG G, LUO Y, et al. Downregulation of LAPTM5 suppresses cell proliferation and viability inducing cell cycle arrest at G_0/G_1 phase of bladder cancer cells[J]. Int J Oncol, 2017, 50(1): 263-271.

[13] HUA W, MA S N, PANG Y X, et al. Intracerebral hemorrhage-induced brain injury: The role of lysosomal-associated transmembrane protein 5[J]. Mol Neurobiol, 2023, 60(12): 7060-7079.

[14] LI T G, WANG W Q, GAN W Q, et al. Comprehensive bioinformatics analysis identifies LAPTM5 as a potential blood biomarker for hypertensive patients with left ventricular hypertrophy[J]. Aging, 2022, 14(3): 1508-1528.

[15] GAO L, GUO S, LONG R, et al. Lysosomal-associated protein transmembrane 5 functions as a novel negative regulator of pathological cardiac hypertrophy[J]. Front Cardiovasc Med, 2021, 8: 740526.

[16] XU M F, TANG P L, QIAN Z M, et al. Effects by doxorubicin on the myocardium are mediated by oxygen free radicals[J]. Life Sci, 2001, 68(8): 889-901.

[17] ZHANG Y, XIN L Y, XIANG M, et al. The molecular mechanisms of ferroptosis and its role in cardiovascular disease[J]. Biomed Pharmacother, 2022, 145: 112423.

[18] PARK E, CHUNG S W. ROS-mediated autophagy increases intracellular iron levels and ferroptosis by ferritin and transferrin receptor regulation[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(11): 822.

[19] LIAO H H, DING W, ZHANG N, et al. Activation of AMPKα2 attenuated doxorubicin-induced cardiotoxicity via inhibiting lipid peroxidation associated ferroptosis [J]. Free Radic Biol Med, 2023, 205: 275-290.

[20] YANG X, CHEN Y, GUO J D, et al. Polydopamine nanoparticles targeting ferroptosis mitigate intervertebral disc degeneration via reactive oxygen species depletion, iron ions chelation, and GPX4 ubiquitination suppression[J]. Adv Sci, 2023, 10(13): e2207216.

[21] TA N, QU C R, WU H, et al. Mitochondrial outer membrane protein FUNDC2 promotes ferroptosis and contributes to doxorubicin-induced cardiomyopathy[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2022, 119(36): e2117396119.

[22] CHEN Y, GUO X Y, ZENG Y C, et al. Oxidative stress induces mitochondrial iron overload and ferroptotic cell death[J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 15515.

（2024-03-28 收稿）
编辑　袁　靓