

抑制泛素羧基末端水解酶 L1 对小鼠心肌纤维化的影响

龚 峥, 马礼坤, 叶 青, 周俊岭, 孔祥勇

摘要 目的 探讨泛素羧基末端水解酶 L1 在小鼠心肌纤维化发生发展中可能的分子机制。方法 雄性小鼠(每组 6 只)皮下植入缓释泵持续灌注血管紧张素 II (Ang II), 并给小鼠腹腔注射 UCHL1 特异性抑制剂 LDN57444。14 d 后检测小鼠心脏功能变化, 天狼猩红染色方法检测小鼠心肌纤维化程度。分离纯化小鼠心肌成纤维细胞, 随机分为 3 组: 对照组(细胞 + 培养基)、P 组(细胞 + 培养基 + PDGF-DD)、PL 组(细胞 + 培养基 + PDGF-DD + LDN57444), 荧光定量 PCR 检测 mRNA 表达水平, 蛋白印迹法检测蛋白表达水平。结果 动物实验中与对照组比较, Ang II 灌注 2 周后小鼠收缩压升高, 心脏机构功能发生改变, 应用 UCHL1 特异抑制剂 LDN57444 处理后可抑制 Ang II 诱导的这些作用, 天狼猩红染色心肌纤维化程度降低。qRT-PCR 法显示 PL 组中 I 型胶原蛋白的 mRNA 表达水平低于 P 组, P、PL 组中 UCH-L1 的 mRNA 表达水平高于对照组。Western blot 法显示 P 组中 PDGFR β /p-PDGFR β 、UCH-L1、pRb/Rb、Col I 的蛋白表达水平平均高于对照组, PL 组中 PDGFR β /p-PDGFR β 、Col I、pRb/RB 的蛋白表达量低于 P 组。染色质免疫共沉淀检测显示 NF- κ B 蛋白调控下游 UCH-L1 基因转录。结论 UCH-L1 参与调控小鼠的心脏成纤维细胞增殖, 机制可能是通过 PI3K、AKT 和 NF- κ B 信号轴通路调节 UCH-L1 表达, UCH-L1 调控下游 Rb 蛋白的表达, 通过调控细胞周期, 抑制 UCH-L1 可减轻小鼠心肌纤维化。

关键词 心肌纤维化; 泛素羧基末端水解酶 L1; 核因子 κ B; 视网膜母细胞瘤抑制蛋白

中图分类号 R 542.2 + 3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)04-0520-07
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.04.004

心肌纤维化是心肌因压力超负荷、缺血损伤或代谢应激引起的严重病理表现, 是多种心脏疾病的最终进展结果, 其病理学特点是心肌间质胶原的异常沉积, 心肌索化最终瘢痕形成^[1]。抑制心肌纤维化对改善心血管系统疾病的预后降低病死率具有

重大意义。心肌纤维化的原因复杂, 心肌纤维化发生、发展的机制不清楚。心肌纤维化是一个急需解决的临床问题。

泛素-蛋白酶体系统是生物细胞内蛋白质降解的主要途径, 对维持细胞内蛋白质稳态, 控制生命活动有重大意义^[2]。其中泛素羧基末端水解酶 L1 (UCH-L1) 是去泛素化酶家族的一个成员, UCH-L1 在某些心脏疾病发生后的心肌细胞和成纤维细胞内都上调, 所以 UCH-L1 上调可能在适应不良心脏重塑和功能障碍中有重要的病理学意义^[3]。但是 UCH-L1 在心肌纤维化进展中发挥什么样的作用和具体的分子机制目前尚无研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物 C57BL/6 雄性小鼠 40 只, 体质量为 (27 ± 3) g, 由中国科学技术大学动物实验中心提供, 标准环境饲养, SPF 级别。

1.2 主要试剂 UCH-L1 特异性阻滞剂 LDN57444 购自美国 APEX BIO 生物公司, 外源性 PDGF-DD 购自美国 PeproTech 公司, p-PDGFR β 、PI3K、蛋白激酶 B、p65 兔单克隆抗体购自美国 Bioworld 公司。

1.3 方法

1.3.1 实验分组及干预 随机将 24 只小鼠分为 4 组, 消毒皮肤, 水合氯醛腹腔麻醉, 皮下植入微量缓释泵 (Alzet 胶囊缓释泵) 持续给药, 分别为 sham 组 [0.9% 氯化钠溶液 1 000 ng/(kg · min)]; Ang II 组 [血管紧张素 II 1 000 ng/(kg · min)]; LDN 组 (sham + LDN 组) 腹腔注射 LDN57444, 40 μ g/(kg · d); Ang II + LDN 组 [血管紧张素 II 1 000 ng/(kg · min), 腹腔注射 LDN57444, 40 μ g/(kg · d)]。小鼠均清洁饲养 14 d, 每天称重。

1.3.2 小鼠血压及心功能检测 Visitech BP-2000 尾袖系统隔天同一时间测定小鼠尾动脉血压并记录。应用 M-mode 超声心动仪测定小鼠心脏结构和心功能变化, Vevo 2100 系统行经胸骨旁短轴超声检查, 连续分析至少 5 ~ 8 个心动周期并计算射血分数, 左室内径, 左室后壁厚度, 室间隔厚度等指标。14 d 后处死小鼠并取出心脏称重, 计算心脏质

2020-09-08 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81870192); 国家重点研发计划项目(编号: 2017YFC0909400)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院心血管内科, 合肥市 230001
作者简介: 龚 峥, 男, 硕士研究生;

马礼坤, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: lkma119@163.com

量/体质量比值。

1.3.3 天狼猩红染色 第14天收集各组心脏组织用2%多聚甲醛在41℃下固定24h,固定组织脱水,石蜡包埋,制作4mm厚切片,然后苦味酸天狼猩红胶原染色法染色,心肌间质胶原面积与视野总面积的比值用于胶原沉积的定量测量。

1.3.4 原代心肌成纤维细胞分离培养 将1~2d小鼠心脏差速贴壁法分离纯化CFs传至第3代,分为:对照组(细胞+培养基)、P组(细胞+培养基+20ng/ml PDGF-DD)、PL组(细胞+培养基+20ng/ml PDGF-DD+40μmol/L LDN57444)。培养基为含10%胎牛血清的HG/DMEM,培养条件为5%CO₂、37℃。

1.3.5 实时荧光定量PCR检测 各组PI3K、AKT、IκB、UCHL1、I型胶原蛋白的mRNA表达水平取对数期生长的CFs接种到6孔板内,TRIzol法提取细胞内RNA,对各组样品目的基因进行扩增,引物序列见表1。

表1 qRT-PCR引物序列

基因	上游引物	下游引物
AKT1	CGCTTCTTTGCCAACATCGT	ACACTCCATGCTGTCATCTTGA
PI3KCA	GACCTGCACATGCTCTCCTT	TGACCTCAGCAGAGGGACTTA
UCHL1	CGGCCAGCATGAAACTTC	TTATTGGCCACTGCGTGGAT
Col1a1	CCCAGCGGTGTTATGACTT	TCGATCCAGTACTCTCCGCT
IκB	CTCAAGAAGCAGCGGTGCT	CCAAGTGCAGGAACGAGTCT
GAPDH	TGACTTCAACAGCGACACCCA	CACCCGTGTGCTGTAGCCAAA

1.3.6 Western blot法检测 各组PDGFRβ、p-PDGFRβ、pPI3K、PI3K、pAKT、AKT、UCHL1、pRb、Rb、Col I的蛋白表达水平取对数期细胞分组后条件干预继续孵育24h,PL组加入LDN57444预处理2h。使用含有蛋白酶抑制剂的RIPA裂解缓冲液裂解CFs,使用15%的聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离,然后转移到PVDF膜上。在室温下,5%脱脂牛奶进行封闭1h。加入一抗(1:500)4℃摇床过夜,洗涤3次,每次10min。加入二抗(1:1000)室温摇床孵育2h,洗涤3次,每次10min。所有蛋白用ECL试剂盒进行可视化。

1.3.7 染色质免疫共沉淀 TNF-α处理心肌成纤维细胞1h,用磷酸盐缓冲的生理盐水洗涤2次,在37℃下用1%甲醛交联10min,蛋白-DNA复合物用NF-κB p65抗体和正常兔IgG抗体免疫沉淀。纯化后得到DNA进行qRT-PCR分析。

1.4 统计学处理 所有数据使用SPSS 16.0软件

处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。双向ANOVA应用于超声心动图数据的分析。通过使用未配对的Student's *t*检验或单因素方差分析(ANOVA)分析统计显著性。用GraphPad Prism软件(版本6.1)进行分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物实验中UCHL1抑制剂处理后改善Ang II诱导的小鼠心脏功能障碍 在灌注Ang II前,各组小鼠收缩血压约14.23 kPa。Ang II组小鼠2周后收缩血压增高,Ang II+LDN组小鼠血压相对于Ang II组没有变化。见图1。通过超声心动图测量结果显示Ang II灌注14d后Ang II组小鼠射血分数(EF%)、室间隔厚度、左室后壁厚度和短轴缩短率(FS%)比Sham组增大,左室舒张内径比空白对照组减小,在Ang II+LDN组的小鼠中相对于Ang II组则降低,左室内径增大。见图2。说明抑制UCHL1可逆转Ang II灌注诱导的小鼠心脏重构。

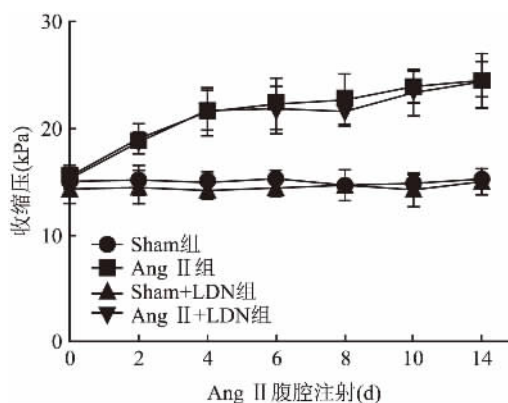
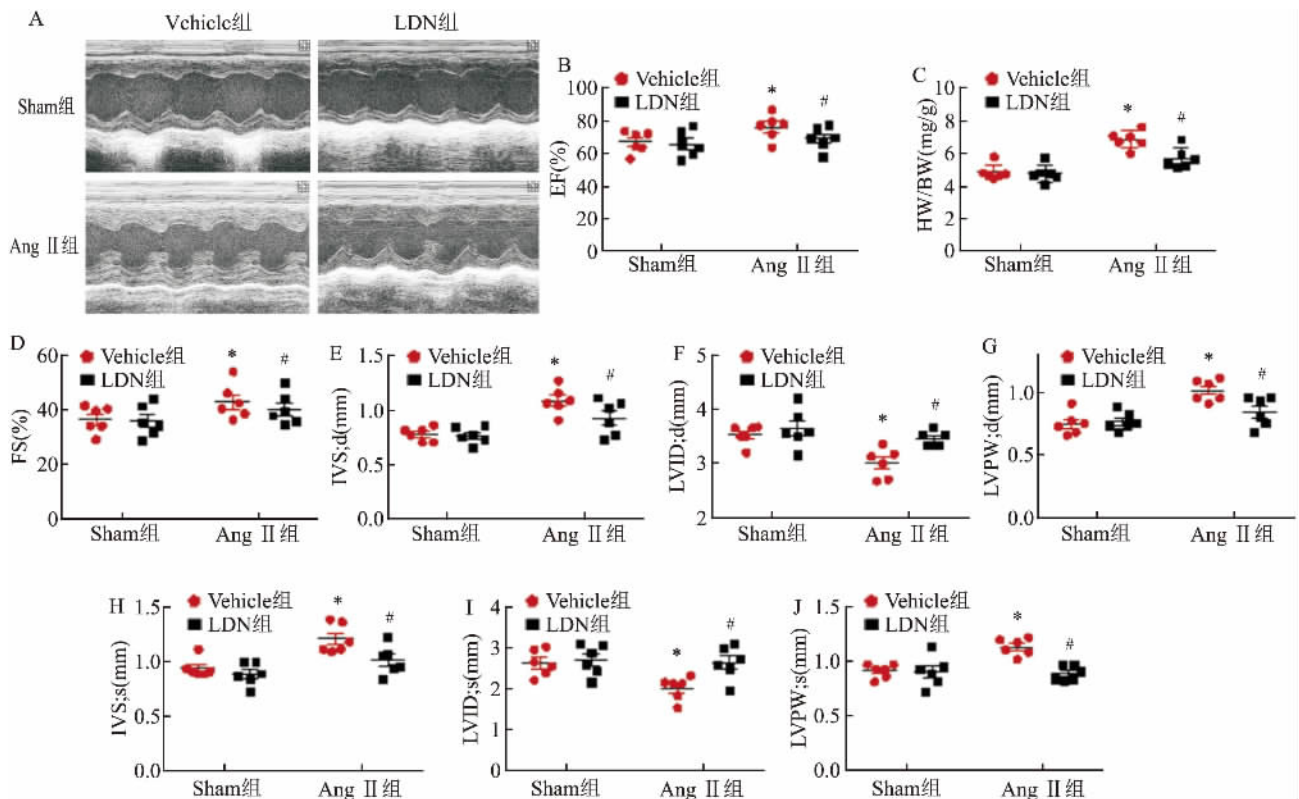


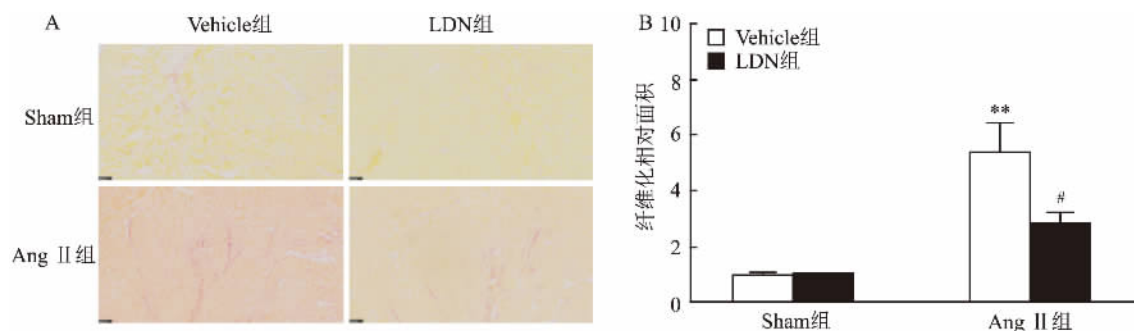
图1 各组小鼠尾监测的收缩压($n=6$)

2.2 苦味酸天狼猩红染色心肌间质胶原测定 干预14d后处死各组小鼠,取出心脏组织进行天狼猩红染色,心肌间质内胶原纤维呈红色,正常心肌组织呈黄色。结果显示Ang II组心肌间质胶原含量最多,与Sham组相比,Ang II+LDN组左心室切片天狼猩红染色显示心肌纤维化程度降低,差异有统计学意义($F=29.42, P<0.05$)。见图3。

2.3 心肌成纤维细胞的生理学特性 经培养的心肌成纤维细胞90min开始贴壁生长,培养24h后CFs多呈梭形等形态,细胞排列紧密。培养至5代后,细胞逐渐开始衰老,细胞开始变大,增殖能力变弱,并可观察到多核细胞。分离纯化得到的CFs行波形蛋白免疫荧光染色阳性率>90%。见图4。

图2 各组小鼠超声心动图评价心脏结构和功能变化($\bar{x} \pm s, n=6$)

A: 各组小鼠心脏彩超; B: 射血分数; C: 心脏质量/体重比; D: 左心室短轴缩短指数; E: 舒张期室间隔厚度; F: 左室舒张期内径; G: 舒张期左室后壁厚度; H: 收缩期室间隔厚度; I: 左室收缩期内径; J: 收缩期左室后壁厚度; 与 Sham 组比较: * $P < 0.05$; 与 Sham + LDN 组比较: # $P < 0.05$

图3 天狼猩红染色分析小鼠左心室血管周围和心脏间质纤维化变化($\bar{x} \pm s, n=6, \times 200$)

与 Sham 组比较: ** $P < 0.01$; 与 Sham + LDN 组比较: # $P < 0.05$

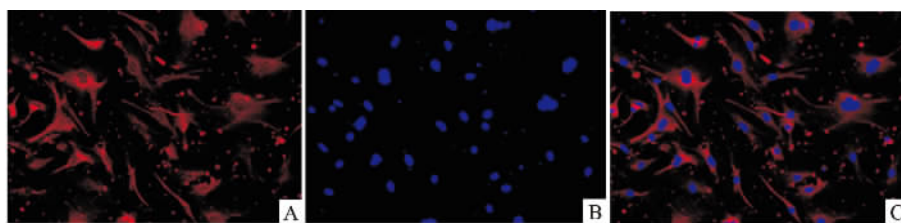


图4 光镜下原代心肌成纤维细胞形态及鉴定

A: 心肌成纤维细胞原代培养 2 代后荧光显微镜下观察波形蛋白免疫荧光染色 $\times 200$, vimentin 蛋白呈现红色荧光; B: 细胞核 DAPI 染色 $\times 200$; C: Merge

2.4 心肌成纤维细胞中各组荧光定量 PCR 检测结果 心肌成纤维细胞原代培养 3 代后, UCH-L1 抑制剂 LDN 减轻 PDGF-DD 诱导的心肌纤维化, q-PCR 进一步检测结果显示 LDN 组 PI3K、AKT、I κ B、UCH-L1 的 mRNA 水平相对于 PDGF 组没有降低, LDN 组的 Col I 的 mRNA 水平相对于 PDGF 组降低 ($F = 13.67, P < 0.05$)。见图 5。

2.5 Western blot 检测结果 Western blot 结果显示 LDN 组 UCH-L1 的蛋白表达量相对于 PDGF-DD 组没有变化, 检测 PI3K/AKT 信号通路中显示蛋白水平和磷酸化水平相对于 Vehicle 组增高, 其中 LDN 组 p-PDGFR β /PDGFR β 、pPI3K/PI3K、pRB/RB、Col I 的蛋白表达量相对于 PDGF-DD 组降低 ($P < 0.05$)。见图 6。

2.6 心肌成纤维细胞中加入 NF- κ B 活化特异性抑制剂后 UCH-L1 蛋白表达水平 体外培养心肌成

纤维细胞后给予 20 ng/ml PDGF-DD 诱导, 继续培养 48 h 后加入不同浓度的 NF- κ B 活化特异性抑制剂吡咯烷二硫代氨基甲酸铵 (PDTC), Western blot 法检测 UCH-L1 的蛋白表达量降低, 差异有统计学意义 ($F = 30.58, P < 0.01$)。见图 7。

2.7 染色质免疫共沉淀结果 TNF- α 处理心肌成纤维细胞 1 h 后, 分别加入 p65 抗体和对照 IgG 抗体沉淀后行 PCR 定量分析, 使用引物扩增包含不同 κ B 结合位点 (KBS1 和 KBS2) 的 UCH-L1 启动子 DNA, 通过实时 PCR 分析对共沉淀的 DNA 和相应的输入 DNA 进行定量, NF- κ B 的结合序列 KBS1 和 KBS2 调控下游 UCH-L1 的表达。见图 8。

3 讨论

心肌纤维化发生的机制复杂, 心脏间质中活化的心肌成纤维细胞转化为肌成纤维细胞, 在多种细

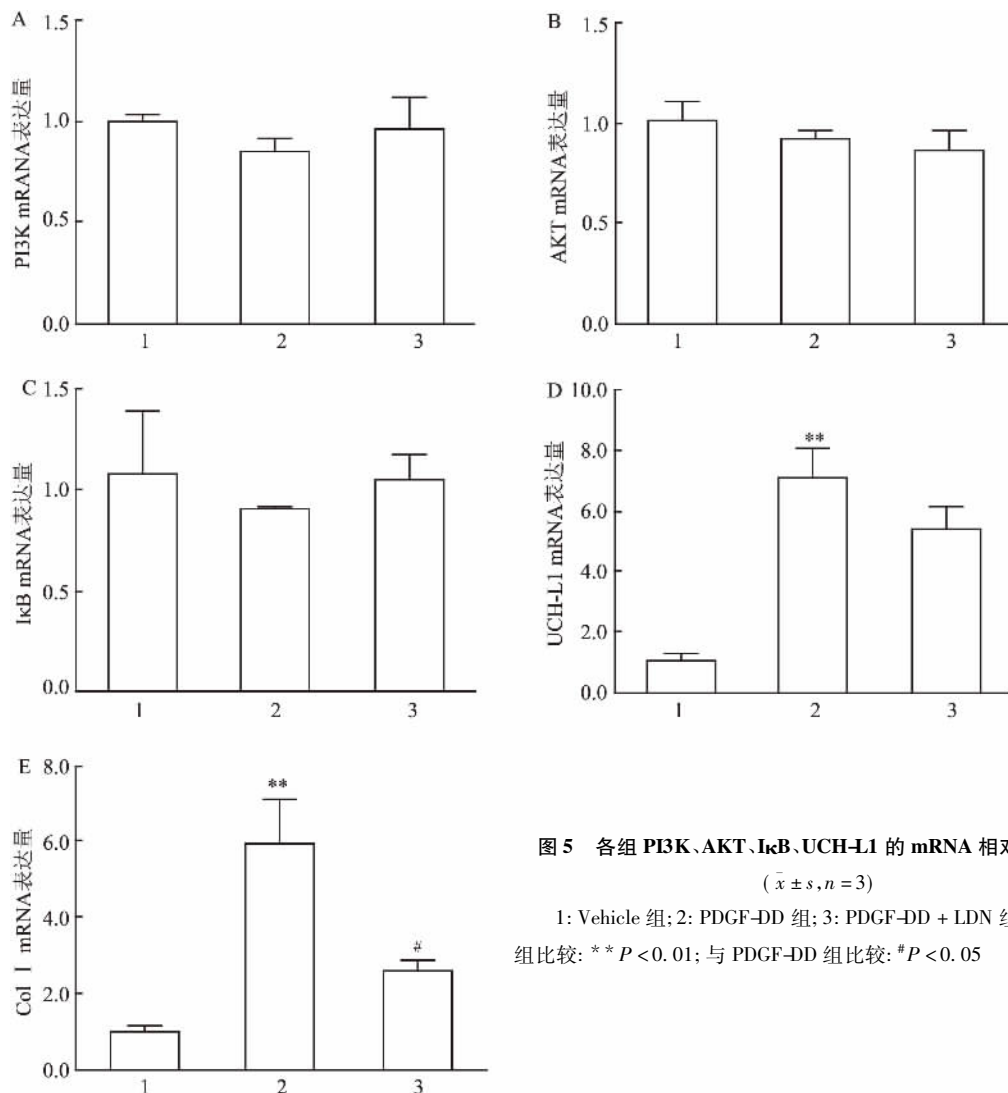
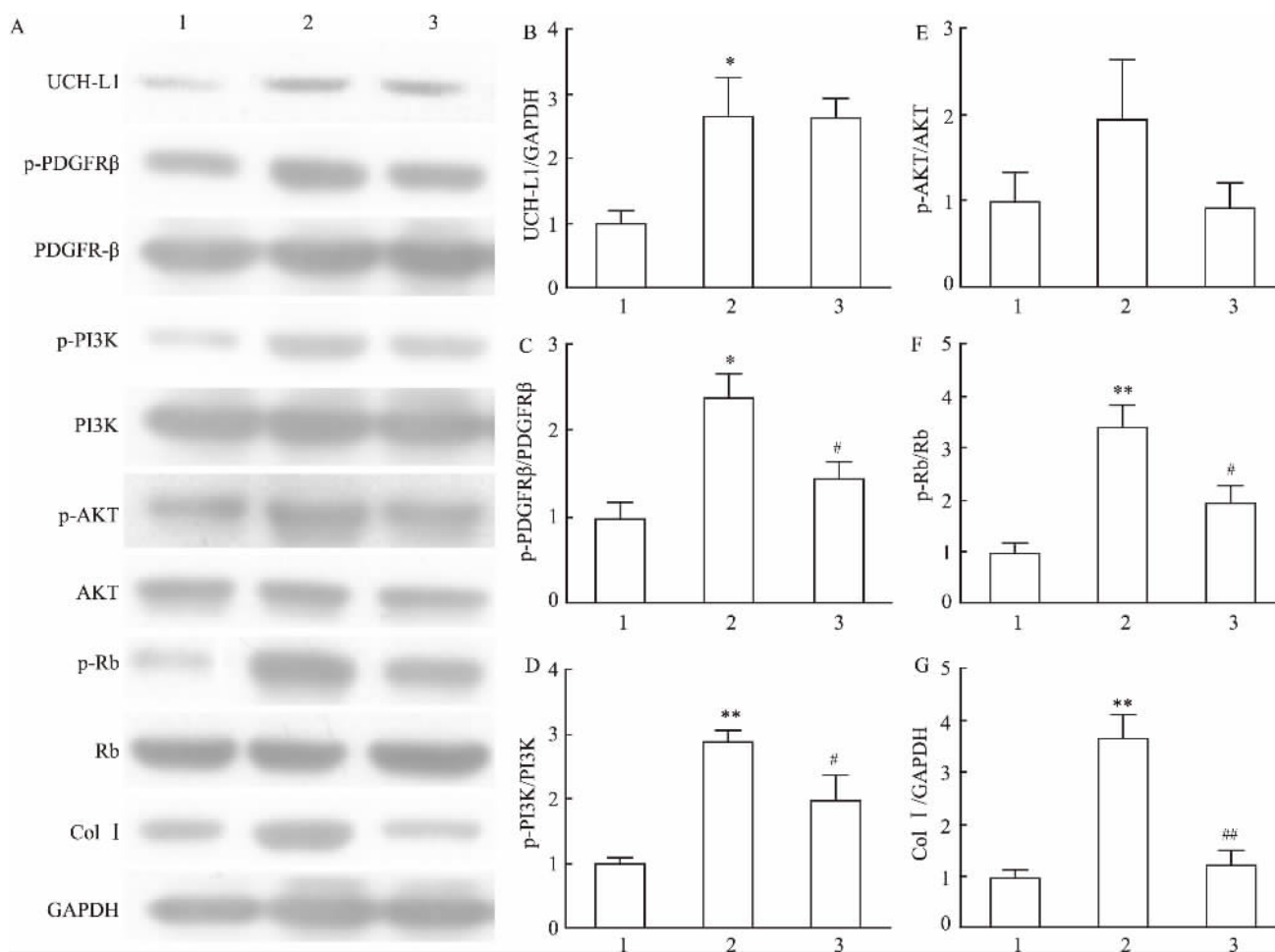


图5 各组 PI3K、AKT、I κ B、UCH-L1 的 mRNA 相对表达水平

($\bar{x} \pm s, n=3$)

1: Vehicle 组; 2: PDGF-DD 组; 3: PDGF-DD + LDN 组; 与 Vehicle 组比较: ** $P < 0.01$; 与 PDGF-DD 组比较: # $P < 0.05$

图6 各组蛋白相对表达水平($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

1: Vehicle 组; 2: PDGF-DD 组; 3: PDGF-DD + LDN 组; 与 Vehicle 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 PDGF-DD 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

胞因子的作用下主要分泌 I 型和 III 型胶原蛋白, 导致胶原沉积与分解失衡, 与心肌纤维化进展密切相关^[4]。UCH-L1 在心血管疾病中的研究^[5]甚少, 主要分布于神经系统、生殖系统和泌尿系统, 是调控细胞生物活动的重要调节剂, 然而在心血管疾病发生后, 心脏细胞发生炎症反应, 胶原沉积修复组织, 在心脏间质细胞中可检测到 UCH-L1 被上调, UCH-L1 可能在调节适应不良的心脏重塑和心脏肥大进而转变为心力衰竭, 最后发展成心肌纤维化^[6]。该研究在 Ang II 诱导的小鼠心肌纤维化模型中, 给予 UCH-L1 的特异性抑制剂 LDN57444 后小鼠的心功能和心脏结构改善, 说明 UCH-L1 确实参与心肌纤维化的进程, 且 LDN57444 可有效改善心脏功能。在 PDGF-DD 诱导的小鼠心肌成纤维细胞纤维化中, 通过 qRT-PCR 可检测到 UCH-L1 的 mRNA 相对常规培养的心肌成纤维细胞增高, 差异有统计学意义, 且给予 UCH-L1 的特异性抑制剂后, CFs 中胶原蛋白分泌减少, 纤维化指标减少, 这表明 LDN57444 确

实有减轻心肌纤维化的作用。

NF- κ B 是炎症和氧化应激的关键调节因子, 直接调节各种心脏疾病状态, 包括心肌梗死、缺血/再灌注损伤、肥厚和充血性心力衰竭, 过去积累的证据^[7]表明 NF- κ B 信号传导途径在心脏炎症中起重要作用。NF- κ B 对心肌肥厚有重要作用, 而阻断 NF- κ B 可使心肌肥厚减轻。NF- κ B 的阻断通过调节 ECM 蛋白阻止心肌肥厚, 提示 NF- κ B 在心脏纤维化中发挥重要作用^[8]。心肌纤维化过程中信号通路复杂, 其中 PDGFR- β /PI3K/Akt 信号通路是重要的细胞信号转导途径^[9], 心肌成纤维细胞向肌成纤维细胞转化与其密切相关。既往研究^[10-12]表明 PI3K/Akt 信号通路在心脏心梗后促进新生血管形成有重要作用。该研究表明通过 PDGF-DD 诱导心肌成纤维细胞增殖分化, 通过成纤维细胞膜上 PDGFR β 受体, 调节下游 PI3K/AKT/NF- κ B 信号轴, 给予 NF- κ B 活化抑制剂吡咯烷二硫代氨基甲酸铵 (PDTC) 后 UCH-L1 的蛋白表达量减少。PDTC 可通

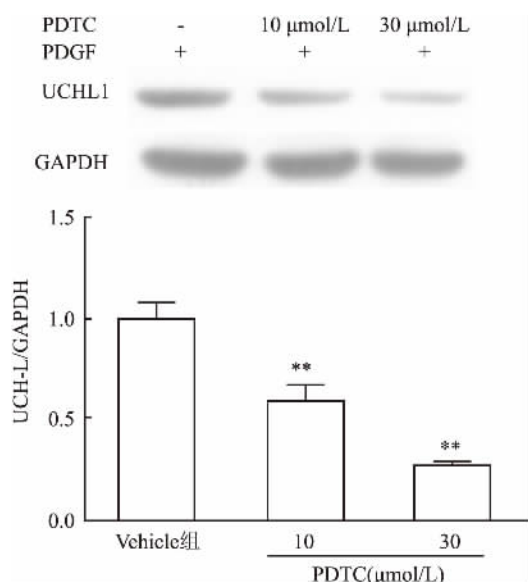


图7 在PDTC的不同浓度组
UCH-L1蛋白的相对表达水平($\bar{x} \pm s, n=3$)
与Vehicle组比较: ** $P < 0.01$

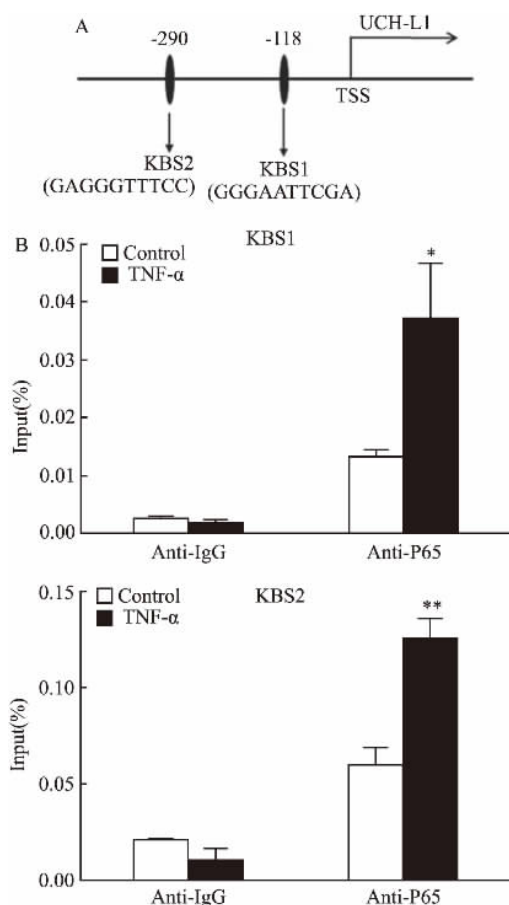


图8 UCH-L1基因的启动子区域存在NF-κB应答原件

A: UCH-L1基因相关的转录起始位点NF-κB结合序列(KBS1和KBS2)的位置被示出,转录起始位点显示为线箭头; B: TNF-α处理1h的细胞中加入抗p65抗体沉淀和对照IgG抗体沉淀染色质的定量PCR分析;与未用细胞因子处理的对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

过抑制IκB磷酸化来抑制NF-κB的作用,降低下游细胞因子的表达。生物信息学分析显示,UCH-L1的启动子区域具有公认的NF-κB结合元件,染色质免疫共沉淀实验结果也显示UCH-L1受上游-290 bp、-118 bp处启动子序列KBS1、KBS2调控,而KBS1、KBS2是NF-κB特异性结合的序列。

视网膜母细胞瘤抑制蛋白(Rb蛋白)是一种真正的多功能蛋白,不仅具有潜在的肿瘤抑制功能,还是控制细胞增殖的重要环节^[13]。不同的刺激信号最终通过Rb磷酸化和去磷酸化调节,进而引导其控制的E2F转录因子的活性^[14]。该研究表明UCH-L1参与Rb蛋白的翻译后调控来应对血小板源生长因子对心肌成纤维细胞的增殖反应。

该研究中PDGF-DD刺激心肌成纤维细胞后,UCH-L1的mRNA和蛋白表达增高,与对照组比较,下游胶原蛋白分泌增加,且信号轴通路上PDGFRβ、PI3K、AKT的mRNA和蛋白增加,说明PDGF-DD可促进UCH-L1的表达。UCH-L1是DUBs家族中重要一员,该研究中提示UCH-L1是心肌炎症向心肌纤维化转变的重要纽带,对于深入研究心肌炎症和心肌纤维化之间的关系有着重要的意义,药理学抑制剂(LDN 57444)具有特异抑制UCH-L1的功能,能够阻断预先建立的心肌纤维化的进一步发展。泛素系统在心脏疾病中的作用和肌成纤维细胞生物学功能对心肌纤维化的研究有重大意义,UCH-L1的药物靶向治疗也为心肌纤维化的防治提供一个新的研究方向。

参考文献

- [1] Leonard B L, Smaill B H, LeGrice I J. Structural remodeling and mechanical function in heart failure [J]. Microsc Microanal, 2012, 18(1): 50-67.
- [2] Critchley W R, Pellet-Many C, Ringham-Terry B, et al. Receptor tyrosine kinase ubiquitination and de-ubiquitination in signal transduction and receptor trafficking [J]. Cells, 2018, 7(3): 22-5.
- [3] Willis M S, Patterson C. Into the heart: the emerging role of the ubiquitin-proteasome system [J]. J Mol Cell Cardiol, 2006, 41(4): 567-79.
- [4] Ferrari S, Pesce M. Cell-based mechanosensation, epigenetics, and non-coding RNAs in progression of cardiac fibrosis [J]. Int J Mol Sci, 2019, 21(1): 28-30.
- [5] Papa L, Brophy G M, Welch R D, et al. Time course and diagnostic accuracy of glial and neuronal blood biomarkers GFAP and UCH-L1 in a large cohort of trauma patients with and without mild traumatic brain injury [J]. JAMA Neurol, 2016, 73(5): 551-60.
- [6] Gao X J, Wu L, Wang K, et al. Ubiquitin carboxyl terminal hydro-

- lase L1 attenuates TNF- α -mediated vascular smooth muscle cell migration through suppression of NF- κ B activation [J]. *Int Heart J*, 2018, 59(6): 1409–15.
- [7] Pateras I, Giaginis C, Tsigris C, et al. NF- κ B signaling at the crossroads of inflammation and atherogenesis: searching for new therapeutic links [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2014, 18(9): 1089–101.
- [8] Park M, Hong J. Roles of NF- κ B in cancer and inflammatory diseases and their therapeutic approaches [J]. *Cells*, 2016, 5(2): 15.
- [9] Olmedo I, Claudia M, Guzmán N, et al. EPAC expression and function in cardiac fibroblasts and myofibroblasts [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, 272(2): 414–22.
- [10] Chandler R L, Damrauer J S, Raab J R, et al. Coexistent ARID1A-PIK3CA mutations promote ovarian clear-cell tumorigenesis through pro-tumorigenic inflammatory cytokine signalling [J]. *Nat Commun*, 2015, 6(3): 11–30.
- [11] Yu X H, Zheng X L, Tang C K. Nuclear factor- κ B activation as a pathological mechanism of lipid metabolism and atherosclerosis [J]. *Adv Clin Chem*, 2015, 70(4): 1–30.
- [12] Sun X H, He S L, Wara A K, et al. Systemic delivery of microRNA-181b inhibits nuclear factor- κ B activation, vascular inflammation, and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Circ Res*, 2014, 114(1): 32–40.
- [13] Topacio B R, Zatulovskiy E, Cristea S, et al. Cyclin d-cdk4, 6 drives cell-cycle progression *via* the retinoblastoma protein's c-terminal helix [J]. *Mol Cell*, 2019, 74(4): 758–70.
- [14] Sanidas I, Morris R, Fella K A, et al. A code of mono-phosphorylation modulates the function of RB [J]. *Mol Cell*, 2019, 73(5): 985–1000.

Effect of inhibiting ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 on myocardial fibrosis in mice

Gong Zheng, Ma Likun, Ye Qing, et al

(Dept of Cardiology, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To investigate the role of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 (UCHL1) in the occurrence and development of myocardial fibrosis in a mouse model. **Methods** Male mice ($n = 6$ per group) were continuously perfused with angiotensin II (Ang II) for 14 days to establish a mouse myocardial fibrosis model. UCHL1 specific inhibitor LDN57444 was injected intraperitoneally into these mice. Blood pressure was measured at the tail. The change in cardiac structure was evaluated by M-mode echocardiography. The severity of myocardial fibrosis was assessed after sirius red staining. The primary mouse myocardial fibroblasts were randomly divided into 3 groups: control group, P group (PDGF-DD) and PL group (PDGF-DD + LDN57444). The mRNA and protein expressions were detected by qRT-PCR and Western blot. **Results** Compared with the control group, the mean systolic pressure increased significantly and the cardiac structure and function changed in the animals treated with Ang II. Treatment with UCHL1 specific inhibitor LDN57444 could significantly inhibit the above Ang II-induced effects, and the severity of myocardial fibrosis decreased markedly. The mRNA expression of type I collagen in the PL group was markedly lower than that in the P group, the mRNA expression of UCH-L1 in the P and PL groups was significantly higher than that in the control. The protein expression levels of PDGFR β /pPDGFR β , UCH L1, pRb/Rb, and Col I in the P group was significantly higher than those in the control group, the protein expression levels of PDGFR β /pPDGFR β , Col I and pRb/Rb in the PL group was markedly lower than those in the P group. Chromatin immunoprecipitation assay confirmed NF- κ B regulated the transcription of downstream UCH-L1. **Conclusion** UCH-L1 is involved in the regulation of mouse cardiac fibroblasts proliferation. In this process, the PI3K/AKT/NF- κ B pathway regulates the expression of UCH-L1 and then regulates downstream Rb protein expression, which subsequently regulates the cell cycle to affect the proliferation of cardiac fibroblasts. Inhibiting UCH-L1 can reduce myocardial fibrosis in mice.

Key words myocardial fibrosis; ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1; nuclear factor κ B; retinoblastoma tumor suppressor protein