DOI:10.16016/j.2097-0927.202204211

泛素 C 末端水解酶 1 抑制 CaMKⅡ泛素化促进心房颤动

李莉英,方 立,祁 珩,邹 斌,苑 聪,郭宇轩 410000 长沙,长沙市第一医院心血管内科二病区

［**摘要**］ **目的** 分析泛素 C 末端水解酶 1(ubiquitin C-terminal hydrolase 1,UCHL1)在促进心房颤动(atrial fibrillation,AF)发生中的作用和潜在分子机制。**方法** 40 只雄性 SD 大鼠(8 周龄,体质量 240~260 g)采用随机数字表法分为 4 组,每组 10 只:Sham+DMSO 组、Sham+LDN(UCHL1 抑制剂)组、AF+DMSO 组和 AF+LDN 组。分组后,AF+DMSO 组和 AF+LDN 组通过皮下植入血管紧张素Ⅱ(angiotensinⅡ,AngⅡ)渗透性微型泵诱导 AF 模型。4 周后,使用心电图记录监测 AF 的持续时间;Masson 三色染色左心房组织以观察纤维化水平;采用超声心动图检查心脏功能;从 1~3 日龄的 SD 大鼠心脏中分离新生大鼠心肌细胞(neonatal rat cardiomyocytes,NRCM),通过在 NRCM 细胞中过表达或敲低 UCHL1 验证其作用;进行免疫沉淀质谱分析,评估 UCHL1 对 NRCM 中钙/钙调素依赖性蛋白激酶Ⅱ(calcium/calmodulin-dependent protein kinaseⅡ,CaMKⅡ)的功能调节机制;采用蛋白质印迹分析纤维化蛋白表达。**结果** 在 AF 组大鼠心脏组织和 AngⅡ处理的 NRCM 中,UCHL1 蛋白表达增加。与 AF+DMSO 组相比,AF+LDN 组大鼠的心脏射血分数(ejection fraction,EF)和缩短分数(fractional shortening,FS)显著升高($P<0.01$),Masson 三色染色纤维化程度、促纤维化蛋白 α-SMA、Col Ⅰ表达和 AF 的持续时间显著降低($P<0.01$)。体外实验中,UCHL1 的敲低可减轻 AngⅡ诱导的 NRCM 纤维化($P<0.05$)。免疫沉淀质谱显示 UCHL1 与 AngⅡ刺激的 NRCM 中的 CaMKⅡ相互作用,并通过去泛素化促进其上调。CaMKⅡ过表达降低了 UCHL1 敲低对 AngⅡ刺激的 NRCM 中纤维化反应的抑制作用($P<0.05$)。**结论** UCHL1 与 CaMKⅡ相互作用,并通过去泛素化上调 CaMKⅡ,从而促进 AF 的心脏纤维化。

［**关键词**］ 泛素 C 末端水解酶 1;钙/钙调素依赖性蛋白激酶Ⅱ;心房颤动;纤维化
［**中图法分类号**］ R345; R363.21; R541.75 ［**文献标志码**］ A

Ubiquitin C-terminal hydrolase 1 inhibits the ubiquitination of CaMKⅡ and promots the occurrence of atrial fibrillation in rats

LI Liying, FANG Li, QI Heng, ZOU Bin, YUAN Cong, GUO Yuxuan Second Departmeat of Cardiology, First Hospital of Changsha, Changsha, Hunan Province, 410000, China

［**Abstract**］ **Objective** To analyze the role and molecular mechanisms underlying of ubiquitin C-terminal hydrolase 1 (UCHL1) in promoting atrial fibrillation (AF). **Methods** Forty 8-week-old male SD rats (240~260 g) were randomly divided into four groups, with 10 rats in each group: Sham+DMSO group, Sham+ LDN (the inhibitor of UCHL1) group, AF+DMSO group and AF+LDN group. AF model was induced by subcutaneously implanted osmotic micropump of angiotensin Ⅱ (AngⅡ) in both AF+DMSO group and AF+LDN group. After 4 weeks, the duration of AF was monitored and recorded by electrocardiography. The level of fibrosis was observed by Masson-trichrome staining of left atrial tissues. Heart function was evaluated by ultrasonic cardiography. Neonatal rat cardiomyocytes (NRCM) were isolated from the hearts of SD rats aged 1~3 d of which effect was verified by overexpression or knockdown of UCHL1 in NRCM cells. Immunoprecipitation mass spectrometry was used to evaluate the functional regulatory mechanism of UCHL1 on calcium/calmodulin-dependent protein kinaseⅡ (CaMKⅡ) in NRCM. The expression of fibrotic protein was analyzed by Western

［**基金项目**］ 湖南省自然科学基金(2018JJ6127)
［**通信作者**］ 方 立,E-mail:skyer200207@163.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

blot assay. **Results** The expression of UCHL1 protein was increased in cardiac tissues of AF rats and in Ang Ⅱ-treated NRCM. Compared with the AF+DMSO group, the cardiac ejection fraction (EF) and fractional shortening (FS) of the AF+LDN group were significantly increased ($P<0.01$), while the degree of fibrosis, expression of α-SMA and Col Ⅰ and duration of AF were significantly decreased ($P<0.01$). *In vitro*, inhibition and knockdown of UCHL1 attenuated Ang Ⅱ-induced fibrosis of NRCM ($P<0.05$). Immunoprecipitation mass spectrometry revealed that UCHL1 interacted with CaMK Ⅱ in NRCM simulated by Ang Ⅱ and promoted the upregulation of UCHL1 through deubiquitination. CaMK Ⅱ overexpression reduced the inhibitory effect of UCHL1 knockdown on the fibrotic response in Ang Ⅱ-induced NRCM ($P<0.05$). **Conclusion** UCHL1 interacts with CaMK Ⅱ and upregulates CaMK Ⅱ through deubiquitination, thereby promoting cardiac fibrosis in AF.

[**Key words**] ubiquitin C-terminal hydrolase 1; Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase Ⅱ; atrial fibrillation; cardiac fibrosis

Supported by the Natural Science Foundation of Hunan Province of China(2018JJ6127). Corresponding author: FANG Li, E-mail:skyer200207@163.com

心房颤动(atrial fibrillation,AF)是导致心血管疾病高发病率和高死亡率的主要原因之一。目前,传统的药物疗法在 AF 中的疗效有限,进一步研究 AF 的发病机制是必要的[1-2]。泛素-蛋白酶体系统是细胞内蛋白质降解的主要途径,在维持蛋白质稳态和心脏功能方面发挥着关键作用[3]。泛素化作为主要的蛋白质翻译后修饰形式,参与调节膜运输和蛋白质降解[4]。由于去泛素化酶的存在,泛素化是一个可逆过程,去泛素化酶可以从泛素修饰的蛋白质中切割泛素。泛素 C 末端水解酶 1(ubiquitin C-terminal hydrolase 1,UCHL1)是一种去泛素化酶,负责从靶蛋白中去除泛素或多聚泛素[5]。UCHL1 失调参与多种疾病的发病机制,包括肿瘤、神经退行性疾病和肝纤维化[5-6]。最近研究发现,心肌梗死后,心肌细胞中 UCHL1 的表达高度上调,并与泛素表达增加有关;此外,UCHL1 抑制剂通过调节成纤维细胞中的核因子-κB 信号传导减弱心脏纤维化[7]。关于 UCHL1 是否通过诱导心脏纤维化参与 AF 的病理过程尚不清楚。本研究观察 UCHL1 在 AF 大鼠心脏组织中的表达情况,通过过表达或敲低 UCHL1 探讨其在 AF 中的调节作用,旨在为 AF 心脏纤维化的治疗提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 实验动物

64 只健康成年雄性 SD 大鼠(8 周龄,体质量 240~260 g)和 10 只雄性 SD 大鼠(1~3 日龄,体质量 10~14 g)购自北京华阜康生物科技股份有限公司[SCXK(京)2019-0008]。在特定的无病原体条件下,大鼠可随意获取食物和水,并保持 12 h 的暗/光周期(室温 20~24 ℃,相对湿度 40%~70%)。将渗透性微型泵植入大鼠皮下前用 2%(体积分数)异氟醚/氧气吸入麻醉。为了考察 UCHL1 表达在 AF 发病中的作用,采用随机数字表法将 24 只大鼠分为 4 组,每组 6 只,然后建立 AF 模型。①假手术(Sham)组:将不含血管紧张素(angiotensin Ⅱ, AngⅡ)的渗透性微型泵植入大鼠皮下;②AF 1 周组:使用渗透性微型泵(2004 型;美国 Alzet 公司)通过慢性 AngⅡ输注 1 周(200 ng·kg^{-1}·min^{-1},美国 Sigma-Aldrich 公司)诱导大鼠心房纤维化;③AF 2 周组:使用渗透性微型泵通过慢性 AngⅡ输注 2 周(200 ng·kg^{-1}·min^{-1})诱导大鼠 AF;④AF 4 周组:使用渗透性微型泵通过慢性 AngⅡ输注 4 周(200 ng·kg^{-1}·min^{-1})诱导大鼠 AF。为了考察 UCHL1 抑制剂(LDN)对 AF 大鼠的改善作用,采用随机数字表法将 40 只大鼠分为 4 组,每组 10 只:①Sham+DMSO 组:将不含 AngⅡ的渗透性微型泵植入大鼠皮下,每天尾静脉注射 DMSO(1 mL/kg,美国 MCE 公司),持续 4 周;② Sham+LDN 组:将不含 AngⅡ的渗透性微型泵植入大鼠皮下,每天尾静脉注射 UCHL1 抑制剂 LDN-57444(LDN;40 μg/kg,美国 MCE 公司),持续 4 周。③AF+DMSO 组:参照文献[8]的方法,使用渗透性微型泵通过慢性 AngⅡ输注 4 周(200 ng·kg^{-1}·min^{-1})诱导大鼠 AF,每天尾静脉注射 DMSO(1 mL/kg),持续 4 周。④AF+LDN 组:参照 AF+DMSO 组诱导 AF 4 周。每天尾静脉注射 LDN(40 μg/kg),持续 4 周。

1.2 心电图记录与分析

在 AngⅡ输注结束时(4 周后),大鼠用戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉。将 12 导联心电图的肢体导联插入动物的四肢,记录心电图波形。造模成功标准:AngⅡ停药后心电图有典型的房颤波改变。房颤的持续时间定义为房颤发作后快速和不规则心房节律与第一次正常窦性心律发作之间的时间间隔。

1.3 超声心动图

在 AngⅡ输注结束时(4 周后),大鼠用戊巴比妥

钠(40 mg/kg)麻醉。使用 Vevo 1100 高分辨率超声成像系统(加拿大 Visualsonics 公司)进行超声心动图分析。分别在 B 模式和 M 模式下获得心脏的长轴和短轴视图。在两个乳头肌之间获取 M 模式图像。由超声心动图软件自动计算左心室射血分数(ejection fraction,EF)和缩短分数(fraction shortening,FS)。所有测量值为 3 个连续心动周期的平均值。

1.4 组织病理学检查

取出心脏并在 4%多聚甲醛(北京 Solarbio 公司)中固定 24~48 h,然后包埋在石蜡中。将样品切成 3 μm 切片,并使用 Masson 三色染色(美国 Sigma-Aldrich 公司),蓝色被染区域为纤维化区域。采用随机数字表法从每个样本选取 10 个随机场的图像进行拍摄,并通过 Image J 软件进行分析。

1.5 细胞培养和分组

参照文献[9]的方法,从 1~3 日龄的 SD 大鼠心脏中酶促分离新生大鼠心肌细胞(neonatal rat cardiomyocytes,NRCM)。NRCM 接种在含 10%胎牛血清的营养培养基 F-12(美国 Gibco 公司)中培养 18 h,用于后续实验。

实验 1 考察 LDN 对 NRCM 纤维化的影响。将细胞分为:对照组(control 组)、LDN 组、AngⅡ组、AngⅡ+LDN 组。为了抑制 LDN 组和 AngⅡ+LDN 组 UCHL1 活性,在 AngⅡ刺激前,加入 5 μmol/L LDN 处理 6 h。AngⅡ组和 AngⅡ+LDN 组加入 AngⅡ(100 nmol/L)刺激细胞 24 h。对照组和 LDN 组则加入等量 DMSO 处理细胞。

实验 2 考察 UCHL1 敲低对 NRCM 纤维化的影响。将细胞分为:对照组(control 组)、si-NC 组和 si-UCHL1 组。si-NC 组和 si-UCHL1 组在 AngⅡ刺激前,分别使用 Lipofectamine 2000(美国 Invitrogen 公司)将 si-NC 或 si-UCHL1 转染细胞 24 h,然后加入 AngⅡ(100 nmol/L)刺激细胞 24 h。对照组则加入等量 DMSO 处理细胞。

实验 3 考察 UCHL1 过表达对 NRCM 的钙/钙调素依赖性蛋白激酶Ⅱ(calcium/calmodulin-dependent protein kinaseⅡ,CaMKⅡ)表达影响。将细胞分为:Vector 组和 UCHL1 组。Vector 组和 UCHL1 组在 AngⅡ刺激前,分别使用 Lipofectamine 2000(美国 Invitrogen 公司)将 Vector 或 UCHL1 过表达质粒转染细胞 24 h,然后加入 AngⅡ(100 nmol/L)刺激细胞 24 h。

实验 4 考察 UCHL1 对纤维化的影响是否与 CaMKⅡ有关。将细胞分为:对照组(control 组)、AngⅡ+si-NC+Vector 组、AngⅡ+si-UCHL1 组、AngⅡ+si-UCHL1+CaMKⅡ组。除对照组外,其他组在 AngⅡ刺激前,分别使用 Lipofectamine 2000 将 si-NC、Vector、si-UCHL1 或 CaMKⅡ转染细胞 24 h,然后加入 AngⅡ(100 nmol/L)刺激细胞 24 h。对照组则加入等量 DMSO 处理细胞。

1.6 质粒构建和寡核苷酸转染

为了建立 UCHL1、CaMKⅡ稳定过表达的细胞系,将 UCHL1 和 CaMKⅡ的 cDNA 序列克隆到从上海 Hanbio Biotech 公司获得的 pHBLV-CMV-crRNA 质粒慢病毒载体中。用嘌呤霉素(2 μg/mL)选择转染的细胞。UCHL1 特异性 siRNA(si-UCHL1)及其对照(si-NC)由上海 GenePharma 公司设计和合成。

1.7 免疫共沉淀(co-immunoprecipitation,Co-IP)

使用 Pierce Classic Magnetic IP/Co-IP 试剂盒(美国 Thermo Fischer Scientific 公司)进行 Co-IP。使用裂解缓冲液从 NRCM 中提取样品。将样品与兔 UCHL1 抗体(1∶100,Proteintec)、兔 CaMKⅡ抗体(1∶100,Proteintech)或兔同种型对照 IgG(1∶250,美国 ABclonal 公司)在 4 ℃下搅拌旋转过夜。将 25 μL 蛋白 A/G 磁珠添加到样品中,并在 4 ℃下孵育 4 h。用裂解缓冲液洗涤珠子 3 次以去除未结合的蛋白质,并使用 20 μL 洗脱缓冲液洗脱结合的蛋白质,并在室温下摇动 10 min。使用洗脱的蛋白质进行质谱分析或蛋白质印迹分析。

1.8 蛋白质印迹分析

使用 RIPA 缓冲液(上海 Beyotime 公司)从心脏组织或 NRCM 中提取蛋白质。使用 BCA 试剂盒(上海 Beyotime 公司)对蛋白质浓度进行量化。对等量的蛋白质(50~100 μg)进行 6%~12% SDS-PAGE 电泳并转移到硝酸纤维素膜上。用 QuickBlock Blocking Buffer(上海 Beyotime 公司)封闭 30 min 后,将膜与针对 UCHL1(1∶2 000,美国 Proteintech 公司),Collagen Ⅰ(ColⅠ,1∶500,英国 Abcam 公司),α-SMA(1∶1 000,美国 Proteintech 公司),钙调素依赖性蛋白激酶Ⅱ(Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinaseⅡ,CaMKⅡ)(1∶1 000,美国 Proteintech 公司),泛素(1∶1 000,英国 Abcam 公司)和 α-微管蛋白(1∶1 000,美国 Proteintech 公司)孵育过夜。次日,将膜与各自的 HRP 偶联二抗(武汉 Boster 公司)一起孵育 2 h,并使用 Chemi-Doc Touch Imaging System(美国 Bio-Rad 公司)进行可视化。使用 Image J 分析特定条带。

1.9 免疫沉淀质谱分析(immunoprecipitation-mass spectrometer,IP-MS)

对洗脱蛋白的免疫沉淀剂进行 SDS-PAGE。在考马斯亮蓝染色后切除凝胶泳道,使用 Orbitrap Elite 质谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)进行质谱分析。

1.10 免疫荧光染色

将接种 NRCM 的切片于室温下在 QuickBlock Blocking Buffer 中封闭 1 h 后,与抗 α-SMA (1∶100)、UCHL1 (1∶200)和 CaMKⅡ(1∶200)的一抗在 4 ℃下孵育过夜。此后,在室温下使用二抗(山羊抗兔 Alexa Fluor 555 偶联抗体,山羊抗兔 Alexa Fluor 488 偶联抗体,均购自美国 Cell Signaling Technology 公司)进行荧光标记 1 h。用 DAPI (1∶2 000,美国 Sigma-Aldrich 公司)对细胞核进行复染。所有图像使用 LSM800 共聚焦显微镜(德国 Zeiss 公司)捕获。

1.11 泛素化测定

NRCM 用 si-NC 或 si-UCHL1 处理 24 h。在收获细胞前 12 h 加入蛋白酶体抑制剂 MG132 (10 μmol/L,英国 Abcam 公司)。用抗 CaMKⅡ抗体免疫沉淀全细胞裂解物,然后用抗泛素(Ub)抗体进行免疫印迹以评估 CaMKⅡ蛋白的泛素化水平。

1.12 统计学分析

使用 SPSS 22.0 进行统计分析。定量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,使用 Student's t 检验分析两个实验组之间的差异,并使用单向 ANOVA 分析多个组之间的差异,组间两两比较采用 Tukey 检验。$P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

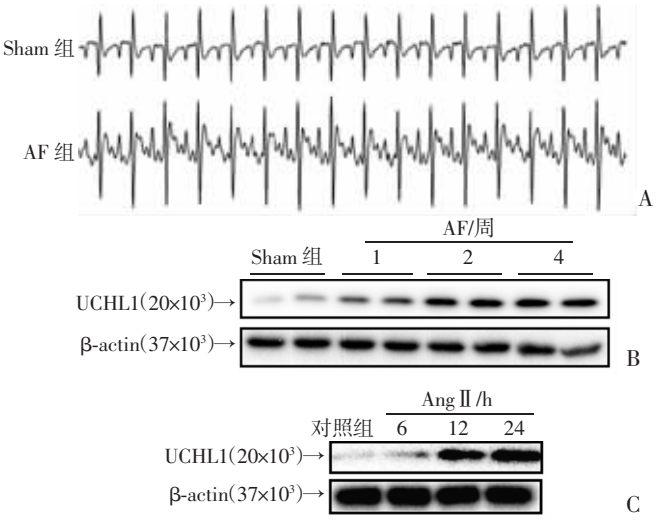
2 结果

2.1 UCHL1 表达在 AF 发病中的作用

通过向大鼠皮下注入 AngⅡ诱导 AF,发现大鼠在 4 周后心电图有典型的房颤波改变,表明大鼠 AF 模型建立成功(图 1A)。与 Sham 组相比,AF 组心脏组织中 UCHL1 蛋白表达以时间依赖性方式增加(图 1B)。此外,在 AngⅡ处理的 NRCM 中,UCHL1 的蛋白质水平表现出时间依赖性方式增加(图 1C)。这些结果表明 UCHL1 上调可能在 AF 发病中起关键作用。

2.2 UCHL1 的敲低可在体外减轻 NRCM 纤维化

采用 LDN 抑制 NRCM 中 UCHL1 的活性。与对照组比较,AngⅡ组 NRCM 中的促纤维化蛋白 ColⅠ和 α-SMA 表达显著增加($P<0.05$)。AngⅡ+LDN 组纤维化蛋白 ColⅠ和 α-SMA 表达较 AngⅡ组显著降低($P<0.05$,图 2A)。使用 siRNA 敲低 NRCM 中的 UCHL1(图 2B),结果发现,与 AngⅡ+si-NC 组比较,AngⅡ+si-UCHL1 组 ColⅠ和 α-SMA 表达显著降低($P<0.05$,图 2C)。免疫荧光染色显示,AngⅡ+si-UCHL1 组的 α-SMA 荧光强度显著低于 AngⅡ+si-NC 组($P<0.05$,图 2D)。结果表明 UCHL1 调节 NRCM 的纤维化反应。



A:AF 模型大鼠 ECG 表现;B:蛋白质印迹分析 AF 后第 1、2、4 周心脏组织中 UCHL1 蛋白水平;C:蛋白质印迹分析不同时间点暴露于 AngⅡ(100 nmol/L)的 NRCM 中 UCHL1 蛋白水平

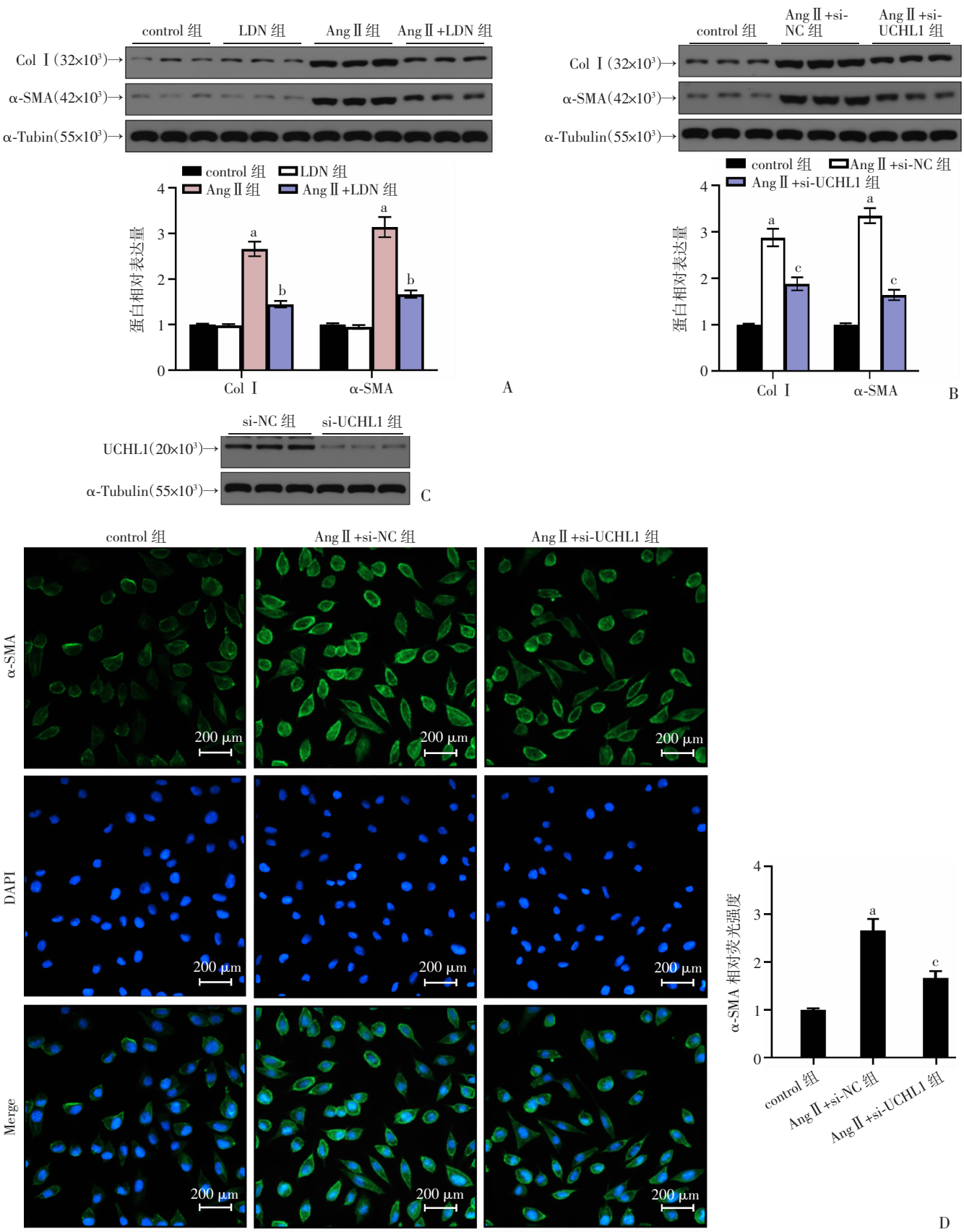
图 1 UCHL1 表达在 AF 发病中的作用

2.3 LDN 对 UCHL1 的抑制减轻了 AF 大鼠心脏纤维化并增强了心脏功能

为评估 UCHL1 是否在体内介导 AF 大鼠心脏纤维化,使用 LDN 抑制 UCHL1。与 Sham+DMSO 组相比,AF+DMSO 组心脏中的 EF 和 FS 显著降低($P<0.01$);间质纤维化面积和促纤维化蛋白 α-SMA 、ColⅠ表达显著增加($P<0.01$)。UCHL1 抑制剂 LDN 显著抑制 AF 诱导的相关变化(图 3A~C)。此外,与 AF+DMSO 组相比,AF+LDN 组 AF 的持续时间显著缩短($P<0.01$,图 3D)。

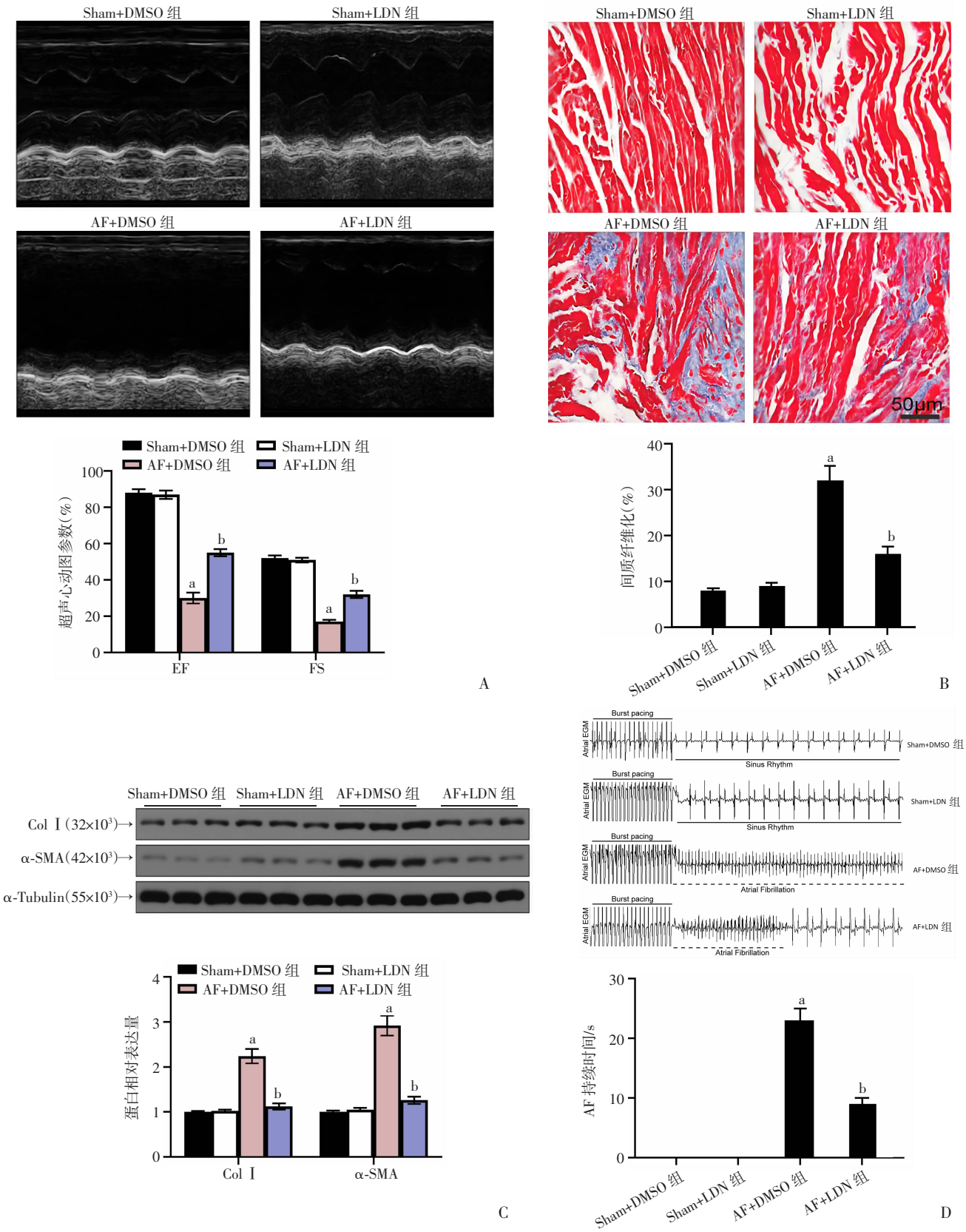
2.4 UCHL1 与 CaMKⅡ相互作用

为确定 UCHL1 对 AngⅡ介导的纤维化潜在机制,在 AngⅡ诱导的 NRCM 中进行免疫沉淀质谱(IP-MS)以发现 UCHL1 相互作用物。通过分析 MS 数据,列出 PSM 数量>20 的蛋白质作为与 UCHL1 发生免疫沉淀(immunoprecipitation,IP)的候选者,且 CaMKⅡ位居榜首(表 1)。检测 UCHL1 和 CaMKⅡ之间是否存在串扰,结果发现 UCHL1 与使用 Co-IP 的 AngⅡ刺激的 NRCM 中的 CaMKⅡ相互作用(图 4A)。为确定 CaMKⅡ是否受 UCHL1 调节,检测 CaMKⅡ蛋白水平,发现 NRCM 中 UCHL1 过表达提高了 CaMKⅡ蛋白水平(图 4B)。此外,UCHL1 过表达降低了 CaMKⅡ的多泛素化(图 4C)。结果表明 UCHL1 与 CaMKⅡ相互作用,并通过去泛素化促进其上调。



A：LDN 和 Ang Ⅱ 处理的 NRCM 中 Col Ⅰ 和 α-SMA 蛋白水平；B：si-UCHL1 敲低的 NRCM 中 UCHL1 蛋白水平；C：Ang Ⅱ 处理后 si-UCHL1 敲低的 NRCM 中 Col Ⅰ 和 α-SMA 蛋白水平；D：Ang Ⅱ 处理的 si-UCHL1 敲低的 NRCM 中 Col Ⅰ 和 α-SMA 蛋白表达 a：$P<0.05$，与 control 组比较；b：$P<0.05$，与 Ang Ⅱ 组比较；c：$P<0.05$，与 Ang Ⅱ +si-NC 组比较

图 2 UCHL1 的抑制敲低均下调 Ang Ⅱ 介导的 NRCM 中促纤维化蛋白的表达 （$\bar{x}\pm s$，$n=3$）



A:超声心动图的代表性 M 模式图像和 EF、FS 定量分析　实线:示突发起搏;虚线:示 AF;B:Masson 三色染色显示心肌边界区胶原沉积(×200);C: AF 大鼠心脏中 Col Ⅰ和 α-SMA 蛋白表达水平;D:AF 大鼠的代表性心房电图记录和总 AF 持续时间
a:$P<0.01$,与 Sham+DMSO 组比较;b:$P<0.01$,与 AF+DMSO 组比较

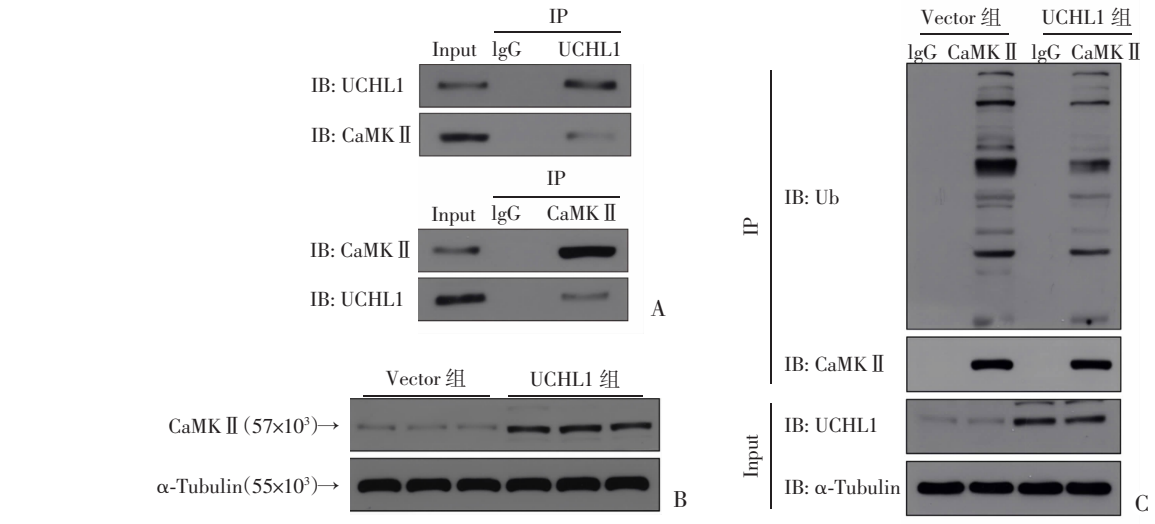
图 3　LDN 对 UCHL1 的抑制对 AF 大鼠心脏纤维化与心脏功能的影响　($n=10$,$\bar{x}\pm s$)

表 1　与 UCHL1 发生 IP 的候选蛋白质

与 UCHL1 发生 IP 的蛋白质	PSMs 数目
钙调素依赖性蛋白激酶Ⅱ	30
膜联蛋白 A6	27
O-棕榈酰转移酶 1	26
糖原磷酸化酶脑型	23
延伸因子 Tu,线粒体	22
富含半胱氨酸和甘氨酸的蛋白质 3	22

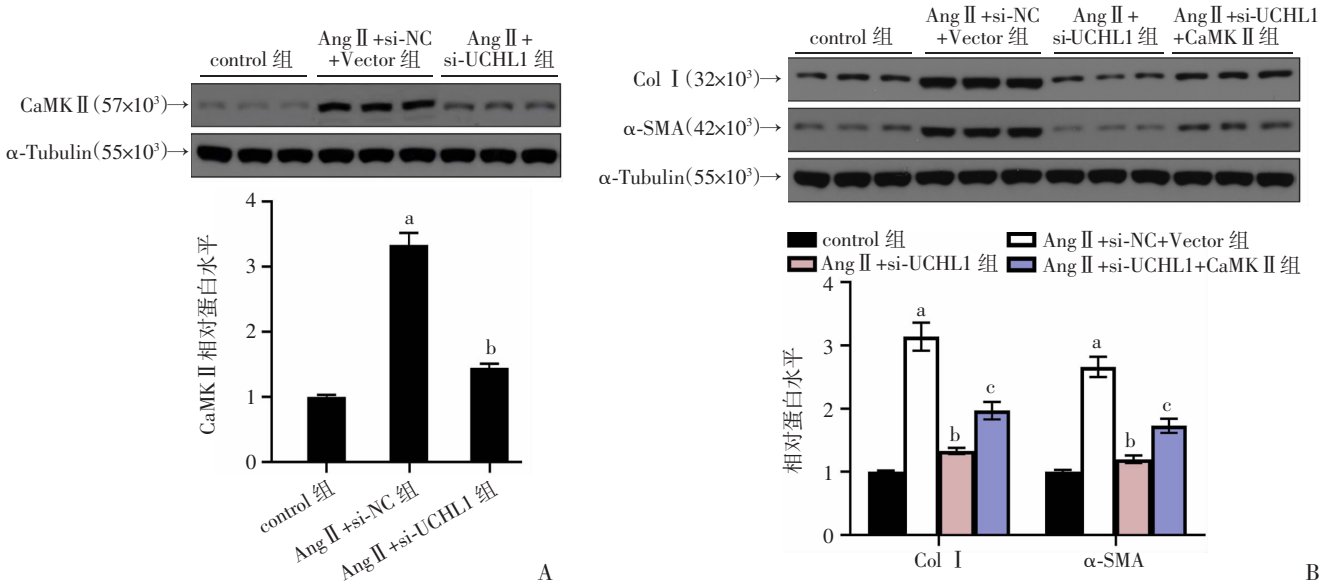
2.5　CaMKⅡ降低了 UCHL1 敲低对 AngⅡ刺激的 NRCM 中纤维化反应的抑制作用

考察 UCHL1 对纤维化的影响是否与 CaMKⅡ有关。免疫印迹和免疫荧光共同发现 NRCM 中 CaMKⅡ蛋白水平被 AngⅡ上调($P<0.05$),并且 UCHL1 的敲低导致 AngⅡ诱导的 CaMKⅡ水平下调($P<0.05$,图 5A、图 6)。此外,与 AngⅡ+si-UCHL1 组相比,AngⅡ+si-UCHL1+CaMKⅡ组 ColⅠ和 α-SMA 表达显著增加($P<0.05$,图 5B)。



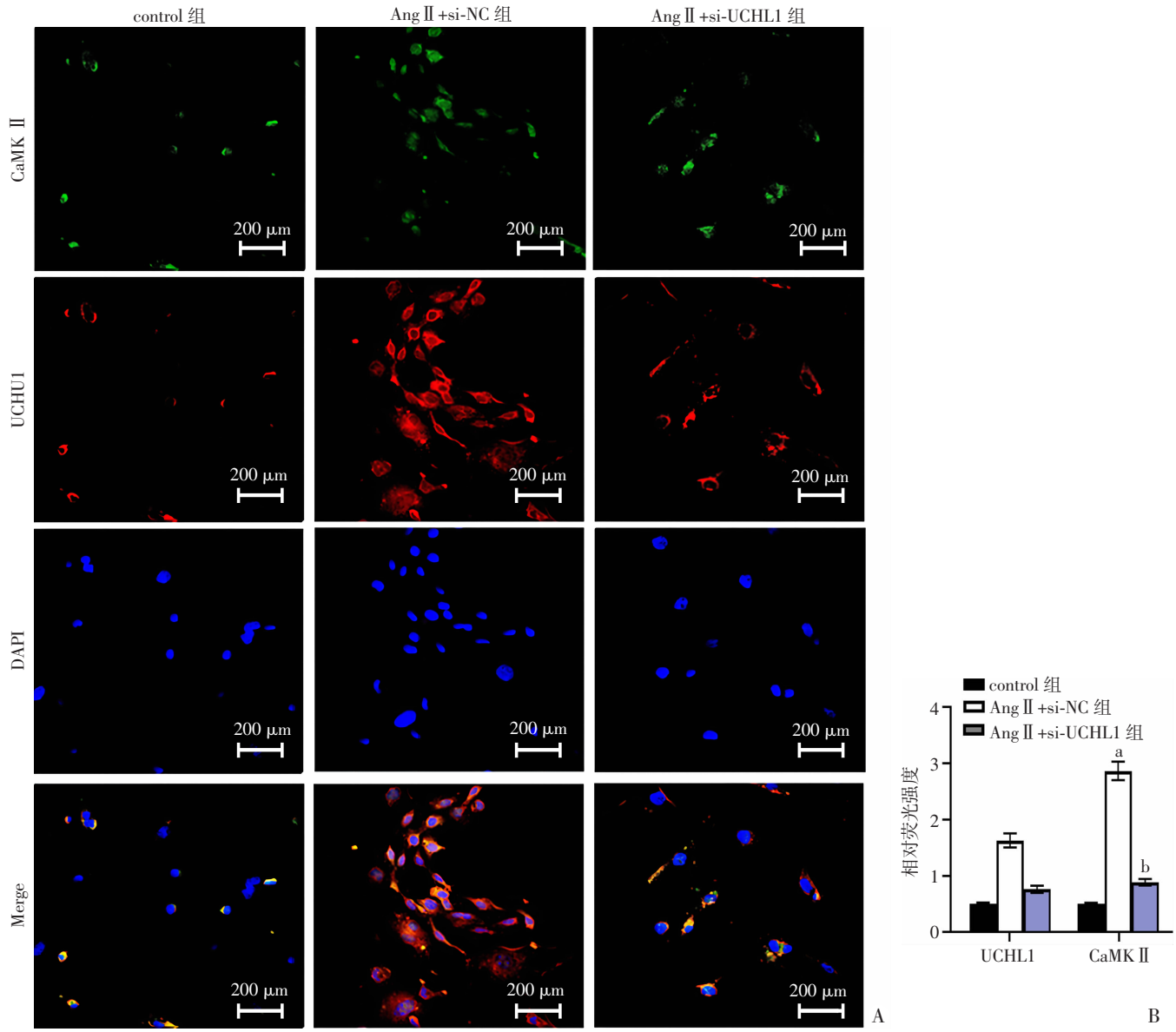
A:UCHL1 蛋白与 CaMKⅡ蛋白在 AngⅡ刺激的 NRCM 中的 Co-IP;B:UCHL1 过表达的 NRCM 中 CaMKⅡ蛋白水平的代表性免疫印迹分析;C:CaMKⅡ蛋白在 AngⅡ刺激 UCHL1 过表达的 NRCM 中的泛素化水平　IB:免疫印迹(immunoblotting)

图 4　UCHL1 与 CaMKⅡ相互作用



A: si-UCHL1 敲低的 NRCM 中的 CaMKⅡ蛋白水平; a:$P<0.01$,与 control 组比较;b:$P<0.01$,与 AngⅡ+si-NC 组比较;B: AngⅡ处理的 si-UCHL1 敲低和/或 CaMKⅡ过表达的 NRCM 中 ColⅠ和 α-SMA 蛋白水平　a:$P<0.01$,与 control 组比较;b:$P<0.01$,与 AngⅡ+si-NC+Vector 组比较;c:$P<0.05$,与 AngⅡ+si-UCHL1 组比较

图 5　CaMKⅡ降低了 UCHL1 敲低对 AngⅡ刺激的 NRCM 中纤维化反应的抑制作用　($\bar{x}\pm s$)



a:$P<0.01$,与 control 组比较;b:$P<0.01$,与 Ang Ⅱ +si-NC 组比较

图 6 免疫荧光检测 Ang Ⅱ 处理的 si-UCHL1 敲低的 NRCM 中 UCHL1 和 CaMK Ⅱ 蛋白表达 ($\bar{x}\pm s$)

3 讨论

近来,UCHL1 在心肌梗死、肥厚性心脏病、高血压等多种心血管疾病中的作用备受关注[10]。UCHL1 调节 AF 的具体机制尚不清楚。心房纤维化是诱导 AF 的关键。高活性和大量的内源性 Ang Ⅱ(肾素-血管紧张素系统的一个因子)参与了心肌纤维化的机制,并且通常认为 Ang Ⅱ 在心房纤维化中起重要作用[11]。ZHAN 等[12]报道,用 Ang Ⅱ 持续皮下刺激会导致大鼠间质心房纤维化和 AF 诱导率增加。有研究表明 Ang Ⅱ 可通过激活素 A/激活素受体样激酶途径引起心房纤维化[13]。本研究发现 Ang Ⅱ 治疗的大鼠心房纤维化显著增加,并且用 Ang Ⅱ 处理的 NRCM 细胞中 α-SMA、Col Ⅰ 上调。UCHL1 抑制剂可减轻 AF 后的心功能不全、房颤持续时间和纤维化。UCHL1 与 CaMK Ⅱ 相互作用,并通过去泛素化促进其上调。在 Ang Ⅱ 刺激和 UCHL1 抑制下,CaMK Ⅱ 过表达逆转了 UCHL1 敲低的抗纤维化作用。因此,UCHL1-CaMK Ⅱ 轴可能是 AF 心脏纤维化治疗的新靶点。

UCHL1 是一种去泛素化酶,其通过消除多种蛋白质的泛素化,包括 c-Jun 激活结构域结合蛋白-1、缺氧诱导因子 1α 和核因子 κB-α,在调节癌症、神经退行性

疾病和炎症反应中具有重要作用[7, 14-15]。既往研究表明,UCHL1 在健康组织中的表达水平较低,但在几种形式的癌症和肺肿瘤细胞系中表达上调且可能与肺高压及成肌细胞的增殖与分化相关[6,16-17]。此外,UCHL1 与调节 hIAPP-Tg 小鼠的 β 细胞凋亡和糖尿病进展有关[18]。本研究结果显示,在 AngⅡ输注后,心房中 UCHL1 的表达增加,表明 UCHL1 表达上调可能影响 AF 易感性。心房纤维化通常被认为是 AF 患者最显著的结构重塑类型,也是 AF 持续存在的结构基础[19]。细胞外基质蛋白过度沉积是心房纤维化相关病理变化的主要原因。本研究证明了抑制剂 LDN 和 siRNA 敲低对 UCHL1 活性的抑制减弱了 AngⅡ诱导的心脏纤维化并增强了心脏功能,表明 UCHL1 在 AF 病理发展中的重要作用。

为了找到 UCHL1 的潜在机制,本研究使用 IP-MS 筛选了它的相互作用蛋白,并将 CaMKⅡ确定为候选相互作用蛋白。这与 CaMKⅡ在 NRCM 细胞中与 UCHL1 共定位的发现一致。为了确定 UCHL1 和 CaMKⅡ之间是否存在直接相互作用,本研究通过共免疫沉淀验证了 UCHL1 和 CaMKⅡ的相互作用。CaMKⅡ是一种多功能丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶,在心脏中大量表达。CaMKⅡ是 Ca^{2+} 连接信号传导的主要调节剂,能够调节心肌细胞膜的兴奋性[20]。CaMKⅡ激活依赖于 Ca^{2+}/CaM 结合,然后诱导底物磷酸化和自磷酸化[21]。CaMKⅡ的功能障碍会增加 Ca^{2+} 处理异常。LIU 等[21]证明 CaMKⅡ的表达和活性在起搏引起的房性心动过速的狗模型中增加。GRANDI 等[22]发现 CaMKⅡ表达在患有 AF 的山羊模型中增加。本研究还证实,用 UCHL1 处理的 NRCM 中 CaMKⅡ显著增加,并且其上调是由于 UCHL1 过表达导致泛素化减少所致。为了解 UCHL1 是否通过上调 CaMKⅡ在心脏纤维化过程中发挥其促纤维化作用,使用 CaMKⅡ质粒过表达 NRCM 细胞中 CaMKⅡ,并发现 CaMKⅡ降低了 UCHL1 敲低对 AngⅡ刺激的 NRCM 中纤维化反应的抑制作用。本研究数据表明 UCHL1-CaMKⅡ复合物在 AF 心脏纤维化中起重要调节作用。

综上所述,UCHL1 与 CaMKⅡ相互作用并通过去泛素化上调 CaMKⅡ,从而促进 AF 的心脏纤维化。针对 UCHL1-CaMKⅡ相互作用的干预措施可能是针对 AF 心脏纤维化的潜在治疗策略。

参考文献:

[1] 李泰然, 陈桂英. 心外膜脂肪组织与心房颤动的分子机制研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2021, 48(9): 1016-1022. DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0428.
LI T R, CHEN G Y. Research progress on molecular mechanism of epicardial adipose tissue and atrial fibrillation[J]. Prog Biochem Biophys, 2021, 48(9): 1016-1022. DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0428.

[2] JANUARY C T, WANN L S, CALKINS H, *et al*. 2019 AHA/ACC/HRS focused update of the 2014 AHA/ACC/HRS guideline for the management of patients with atrial fibrillation: a report of the American college of cardiology/American heart association task force on clinical practice guidelines and the heart rhythm society[J]. J Am Coll Cardiol, 2019, 74(1): 104-132. DOI: 10.1016/j.jacc.2019.01.011.

[3] YUAN Y, ZHAO J, GONG Y T, *et al*. Autophagy exacerbates electrical remodeling in atrial fibrillation by ubiquitin-dependent degradation of L-type calcium channel[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(9): 873. DOI: 10.1038/s41419-018-0860-y.

[4] 刘志浩, 倪晶宇, 郭蕊, 等. 翻译后修饰对 SERCA2a 的作用在心血管疾病中的研究进展[J]. 中华心血管病杂志, 2020, 48(2): 164-167. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3758.2020.02.015.
LIU Z H, NI J Y, GUO R, *et al*. Advances in research on the effects of post-translational modification on SERCA2a in cardiovascular diseases[J]. Chin J Cardiol, 2020, 48(2): 164-167. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3758.2020.02.015.

[5] AHN H J, JUNG S, YOU Y, *et al*. The value of cerebrospinal fluid ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 protein as a prognostic predictor of neurologic outcome in post-cardiac arrest patients treated with targeted temperature management[J]. Resuscitation, 2020, 151: 50-58. DOI: 10.1016/j.resuscitation.2020.03.022.

[6] MAO R D, TAN X, XIAO Y, *et al*. Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 promotes expression of programmed cell death-ligand 1 in non-small-cell lung cancer cells[J]. Cancer Sci, 2020, 111(9): 3174-3183. DOI: 10.1111/cas.14529.

[7] GONG Z, YE Q, WU J W, *et al*. UCHL1 inhibition attenuates cardiac fibrosis *via* modulation of nuclear factor-κB signaling in fibroblasts[J]. Eur J Pharmacol, 2021, 900: 174045. DOI: 10.1016/j.ejphar.2021.174045.

[8] XIAO Z Z, REDDY D P K, XUE C Q, *et al*. Profiling of miR-205/P4HA3 following angiotensin II-induced atrial fibrosis: implications for atrial fibrillation[J]. Front Cardiovasc Med, 2021, 8: 609300. DOI: 10.3389/fcvm.2021.609300.

[9] USUI S, CHIKATA A, TAKATORI O, *et al*. Endogenous muscle atrophy F-box is involved in the development of cardiac rupture after myocardial infarction[J]. J Mol Cell Cardiol, 2019, 126: 1-12. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2018.11.002.

[10] MCMACKEN G, LOCHMÜLLER H, BANSAGI B, *et al*. Behr syndrome and hypertrophic cardiomyopathy in a family with a novel UCHL1 deletion[J]. J Neurol, 2020, 267

(12):3643-3649. DOI:10.1007/s00415-020-10059-3.

[11] LU L, CAO L, LIU Y H, *et al*. Angiotensin (ang) 1-7 inhibits ang II-induced atrial fibrosis through regulating the interaction of proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src (c-Src) and Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1 (SHP-1)[J]. Bioengineered, 2021, 12(2): 10823-10836. DOI: 10.1080/21655979.2021.1967035.

[12] ZHAN Y G, ABE I, NAKAGAWA M, *et al*. A traditional herbal medicine rikkunshito prevents angiotensin II-induced atrial fibrosis and fibrillation[J]. J Cardiol, 2020, 76(6): 626-635. DOI: 10.1016/j.jjcc.2020.07.001.

[13] WANG Q, YU Y, ZHANG P P, *et al*. The crucial role of activin A/ALK4 pathway in the pathogenesis of AngII-induced atrial fibrosis and vulnerability to atrial fibrillation [J]. Basic Res Cardiol, 2017, 112(4): 47. DOI: 10.1007/s00395-017-0634-1.

[14] LI X B, HATTORI A, TAKAHASHI S, *et al*. Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 promotes hypoxia-inducible factor 1-dependent tumor cell malignancy in spheroid models [J]. Cancer Sci, 2020, 111(1): 239-252. DOI: 10.1111/cas.14236.

[15] DOWNEY A, OLCOTT M, SPECTOR D, *et al*. Stable knockout of lanthionine synthase C-like protein-1 (LanCL1) from HeLa cells indicates a role for LanCL1 in redox regulation of deubiquitinating enzymes[J]. Free Radic Biol Med, 2020, 161: 115-124. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.10.006.

[16] GAO H B, HARTNETT S, LI Y F. Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 regulates myoblast proliferation and differentiation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 492(1): 96-102. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.08.027.

[17] WADE B E, ZHAO J R, MA J, *et al*. Hypoxia-induced alterations in the lung ubiquitin proteasome system during pulmonary hypertension pathogenesis [J]. Pulm Circ, 2018, 8(3): 2045894018788267. DOI: 10.1177/2045894018788267.

[18] COSTES S, BERTRAND G, RAVIER M A. Mechanisms of beta-cell apoptosis in type 2 diabetes-prone situations and potential protection by GLP-1-based therapies[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(10): 5303. DOI: 10.3390/ijms22105303.

[19] 李健兰, 陈灿. 心房颤动患者心房纤维化检测方式的研究进展[J]. 山东医药, 2020, 60(13): 85-88. DOI: 10.3969/j.issn.1002-266X.2020.13.025.
LI J L, CHEN C. Research progress on the detection method of atrial fibrosis in patients with atrial fibrillation [J]. Shandong Med J, 2020, 60(13): 85-88. DOI: 10.3969/j.issn.1002-266X.2020.13.025.

[20] 马婧, 刘晓莉, 乔德才. 钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶Ⅱ在突触可塑性和神经精神疾病中的作用[J]. 中国药理学通报, 2018, 34(11): 1485-1488. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1978.2018.11.002.
MA J, LIU X L, QIAO D C. Role of calcium/calmodulin-dependent protein kinase Ⅱ in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders[J]. Chin Pharmacol Bull, 2018, 34(11): 1485-1488. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1978.2018.11.002.

[21] LIU T, XIONG F, QI X Y, *et al*. Altered calcium handling produces reentry-promoting action potential alternans in atrial fibrillation-remodeled hearts[J]. JCI Insight, 2020, 5(8): e133754. DOI: 10.1172/jci.insight.133754.

[22] GRANDI E, DOBREV D. Non-ion channel therapeutics for heart failure and atrial fibrillation: are CaMKII inhibitors ready for clinical use? [J]. J Mol Cell Cardiol, 2018, 121: 300-303. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2017.10.010.

(**收稿**:2022-04-29;**修回**:2022-08-10)

(编辑 汪勤俭)